

2018



Reprodução em Equinos

Manual Prático

Elisa Maria Varela Bettencourt
Luís Antunes
Ana Rita Gonçalves
Sandra Branco
António Rocha

2018

Reprodução em Equinos

Manual Prático

Elisa Maria Varela Bettencourt
Luís Antunes
Ana Rita Gonçalves
Sandra Branco
António Rocha

Ficha Técnica

Título: Reprodução em Equinos - Manual Prático

Edição: Universidade de Évora

Autores: Elisa Maria Varela Bettencourt, Luís Antunes, Ana Rita Gonçalves, Sandra Branco, António Rocha

Fotografias da capa: Renata Skeie, Rita Fernandes

Impressão: Diana Gráfica

100 Exemplares

Depósito Legal: 463987/19

ISBN: 978-989-8550-75-0

Évora, 2018

Projeto ALT20-03-0246-FEDER-000020
cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER)
através do “Programa Operacional Regional Alentejo 2020”

Cofinanciado por:



Agradecimentos

A todos os colaboradores da Coudelaria de Alter, que participaram nas atividades relacionadas com a reprodução equina, por todo o apoio e simpatia nos anos em que preparamos este manual. Esperamos que esta colaboração se mantenha por muitos e longos anos.

Aos estagiários que passaram pela Coudelaria de Alter nos anos de 2017 e 2018, nomeadamente Joana Rodrigues, Maria, Catarina e Elisa, por todas as horas de serviço que nos permitiram preparar a componente prática do Manual.

A todos os alunos da Universidade de Évora que colaboraram connosco no desenvolvimento do trabalho prático.

A todos os funcionários da Universidade de Évora que colaboraram na gestão deste projeto permitindo a sua realização com sucesso.

Aos bolseiros da Universidade de Évora, Ana Sofia Ramos e António Pinto pela sua colaboração no trabalho prático e preparação de materiais.

A todas as pessoas que contribuíram com fotografias para este Manual: Maria José Vila-Viçosa, Alfredo Pereira, Ana Sofia Ramos, Miguel Blielbernickt, Ana Costa.

Ao revisor final deste Manual Luís Telo da Gama pelo cuidado que teve neste trabalho e pelo estímulo constante que sempre nos transmitiu.

Índice

1. Introdução e enquadramento	7
2. Garanhão	8
2.1. Anatomia e fisiologia reprodutiva do garanhão	8
Escroto	8
Testículos	9
Cordão espermático	10
Ducto deferente	11
Uretra	11
Pénis e prepúcio	11
Glândulas sexuais acessórias	12
Espermatogénese	13
Endocrinologia	13
2.2. Sazonalidade reprodutiva no garanhão	14
2.3. Exame reprodutivo do garanhão	14
Identificação	15
História clínica	15
Exame físico	16
Líbido e comportamento sexual	16
Exame da genitália externa	17
Pénis e prepúcio	17
Escroto e testículos	19
Colheita de sémen	24
Preparação do garanhão	24
Lavagem do pénis	24
Vagina artificial	25
Recolha de sémen	27
Escolha da égua para ser utilizada como manequim para recolha de sémen	28
Manequim	30
Colheita em estação	31
Avaliação do sémen	31
Cor, cheiro e consistência	32
Volume filtrado	33
pH	34
Concentração	34
Espectrofotometria	34
Contagem em hemocitómetro	
Técnica de utilização do hemocitómetro (Neubauer modificada)	36
NucleoCounter NC-100 (Chenometec, Dinamarca)	37
CASA (computer assisted sperma analysis)	38
Citometria de fluxo	38
Motilidade	38
Morfologia	39
Avaliação das glândulas sexuais acessórias	41

Critérios mínimos para aprovação de um garanhão como reprodutor	42
2.4. Técnicas complementares na avaliação de sémen	43
CASA (computer assisted sperm analysis)	43
Citometria de fluxo	46
2.5. Outras parâmetros a avaliar no exame do garanhão	46
Longevidade e resistência do sémen à refrigeração e criopreservação	46
	47
3. Égua reprodutora	47
3.1. Anatomia e fisiologia reprodutiva da égua	47
Períneo	47
Vulva	48
Clitóris	48
Vestíbulo	49
Vagina	49
Útero	50
Ovidutos	51
Ovários	52
Ciclo reprodutivo da égua	52
3.2. Sazonalidade reprodutiva	57
Transição primaveril (inverno/primavera)	58
Época de transição invernal (outono/inverno)	59
3.3. Exame reprodutivo da égua	59
História reprodutiva	60
Exame físico	60
Avaliação da genitália externa	61
Exame vaginal	64
Inspeção vaginal com espéculo	64
Palpação vaginal	66
Palpação transrectal	66
Avaliação ecográfica	67
3.4. Metodologias complementares de diagnóstico	75
Cultura microbiológica e teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA):	
útero e clitóris	75
Útero	75
Clitóris	77
Citologia	78
Presença de PMN	79
Presença de bactérias	80
Presença de fungos e leveduras	81
Biópsia do endómetro	81
3.5. Gestação precoce na égua	85
Diagnóstico de gestação	87
Conclusão	91
Referências bibliográficas	93

1. Introdução e enquadramento

A reprodução na espécie equina tem cada vez maior intervenção médico-veterinária em Portugal e no mundo. De modo a que o acompanhamento reprodutivo, de éguas e garanhões, possa ser efetuado de modo correto e permitindo uma maior eficácia, é indispensável assegurar uma adequada formação de todos os técnicos envolvidos no processo.

A base de todo o acompanhamento reprodutivo é o conhecimento da anatomia e fisiologia animal, o qual é indispensável para uma avaliação objetiva e eficaz de cada caso concreto, bem como para a decisão de qual é o melhor animal para o fim a que se destina. Este manual pretende ser um guia prático para estudantes e profissionais, de modo a uniformizar alguns critérios e metodologias de avaliação e de linguagem, que tantas vezes ocasionam erros de comunicação e diagnóstico.

A criação de cavalos tem vindo a crescer na região do Alentejo, sendo uma atividade fulcral para o desenvolvimento da região. Muitas explorações têm como objetivo a criação de reprodutores, tornando-se fundamental melhorar a eficácia do sistema de produção. A melhoria da fertilidade é essencial para assegurar a maior rentabilidade das explorações.

A realização deste Manual surgiu no âmbito de um projeto cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Alentejo 2020: ALT20-03-0246-FEDER-000020 “Maneio Reprodutivo e biotecnologias da reprodução em equinos da raça Puro Sangue Lusitano” que teve como principal objetivo a transferência de conhecimento e tecnologia na área da reprodução equina.

O manual pretende ser um guia prático, referindo-se sobretudo os principais aspetos da anatomia e fisiologia do garanhão e égua bem como o exame reprodutivo dos animais reprodutores.

2. Garanhão

2.1. Anatomia e fisiologia reprodutiva do garanhão

O sistema reprodutor no garanhão consiste em dois testículos (cada um suspenso internamente pelo cordão espermático e externamente pelo músculo cremáster), dois ductos deferentes com as respetivas ampolas do ducto deferente próximas da uretra, o pénis, a uretra, os músculos isquiocavernoso, bulbospongioso e o retrator do pénis, um par de glândulas vesiculares e bulbouretrais e a próstata, com um corpo central nodular e dois lobos laterais (Figura 1).

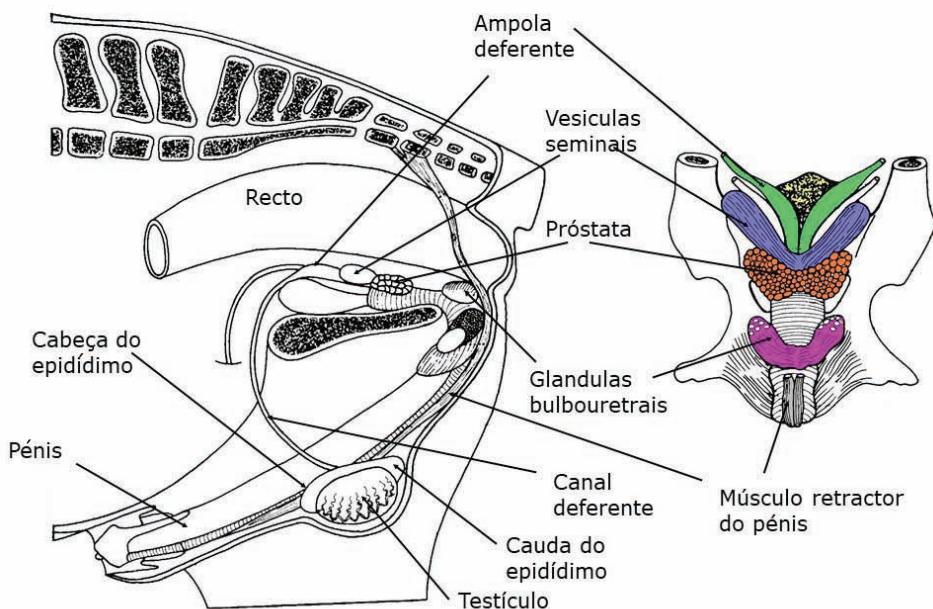


Figura 1: Anatomia do aparelho genital do garanhão (*adaptado por Maria José Vila-Viçosa de Hafez, 2016*).

Escroto

O escroto é uma evaginação da pele que é composta por duas bolsas escrotais, uma para cada testículo, separadas pelo septo do escroto. O escroto é composto por 4 camadas: pele, túnica dartos, fáscia escrotal e túnica vaginal. A túnica vaginal tem dois folhetos (parietal e visceral).

Testículos

Os testículos têm forma ovalada, são ligeiramente achatados lateralmente e o seu eixo mais longo é o horizontal. As medidas padrão para um testículo médio variam entre 80-140 mm de comprimento e 50-80 mm de largura. A idade e época do ano influenciam o tamanho testicular, com dimensões testiculares menores no inverno. O testículo é revestido externamente pela túnica albugínea.

O parênquima testicular é constituído por tubos seminíferos e tecido intersticial. Os tubos seminíferos estão revestidos pelo epitélio seminífero, formado por diferentes tipos de células germinativas que darão origem à formação dos espermatozoides. As células de *Sertoli*, que têm o papel principal na coordenação da diferenciação das células germinativas, formam o principal componente da barreira hemato-testicular. O tecido intersticial é composto por vasos sanguíneos, sistema linfático, terminações nervosas, tecido conjuntivo e células de *Leydig*. As células de *Leydig* são responsáveis pela produção de testosterona.

Os túbulos seminíferos convergem nos dois terços craniais do testículo numa área chamada *rede testis*. Cada uma das redes de túbulos fusionam-se com 13-15 túbulos eferentes que conduzem os espermatozoides ao ducto do epidídio. No garanhão, e ao contrário do que é frequentemente escrito e ensinado, existe um mediastino, visível macroscopicamente (figura 2) e em cortes histológicos, mas demasiado fino para ser detetável por ecografia.



Figura 2: Testículo de garanhão em secção onde é visível o mediastino.

O epidídimo está dividido anatomicamente em três partes: cabeça, corpo e cauda. A cabeça está intimamente ligada à porção cranial do testículo, o corpo é uma estrutura cilíndrica na parte dorsolateral do testículo e a cauda é comprida, bulbosa e localizada na porção caudal do testículo (figura 3). Do ponto de vista funcional a parte inicial da cabeça do epidídimo tem a função de reabsorver a maior parte dos fluidos e excretar alguns componentes, enquanto a restante parte da cabeça e corpo são responsáveis pela maturação dos espermatozoides e a cauda do epidídimo e parte proximal do ducto deferente tem como função o armazenamento dos espermatozoides.

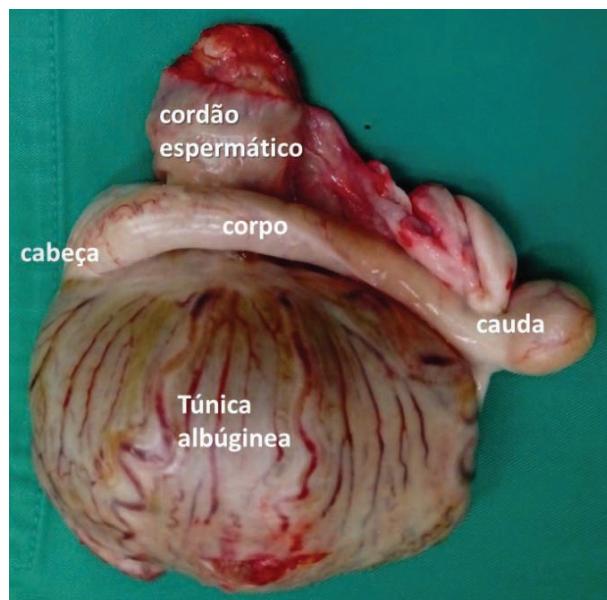


Figura 3: Disposição do epidídimo em relação ao testículo (cabeça, corpo e cauda do epidídimo).

Cordão espermático

O cordão espermático é constituído pelo ducto deferente, nervos e vasos sanguíneos associados ao testículo. O músculo cremáster, unido lateralmente ao cordão espermático, auxilia o suporte do testículo e o controlo da temperatura testicular aproximando ou distanciando o testículo do abdómen. O cordão espermático inclui a artéria testicular e as veias testiculares que saem dos testículos e formam uma rede intimamente ligada de pequenas veias ao redor da artéria testicular. Esta rede de veias é chamada plexo pampiniforme e é extremamente importante na termorregulação testicular.

Ducto deferente

O ducto deferente é a continuação do epidídimos que se estende desde a cauda do epidídimos e através do cordão espermático até à uretra. O ducto deferente de um garanhão tem a parede extremamente espessa, o que faz com que este possa ser palpado através do escroto. Antes da junção dos ductos deferentes à uretra ocorre uma dilatação do seu lúmen denominada de ampola.

Uretra

A uretra é um tubo longo que vai desde a bexiga até ao final do pénis, onde termina em uma porção livre denominada processo uretral. A porção pélvica da uretra está coberta por um espesso e estriado músculo denominado músculo uretral, que se contrai vigorosamente durante a ejaculação. A uretra peniana está rodeada pelo corpo esponjoso do pénis. A uretra serve como canal excretor para a urina e para o sémen.

Pénis e prepúcio

O pénis está dividido em três regiões: a base, o corpo e a glande (figura 4). Os principais constituintes do pénis são o corpo cavernoso, o corpo esponjoso, que é continuado pela glande do pénis, a uretra, músculo retrator do pénis e os vasos sanguíneos e nervos. O pénis do garanhão é do tipo músculo cavernoso e tem um considerável aumento em comprimento e diâmetro durante a ereção. O maior espaço cavernoso, o corpo cavernoso, encontra-se dorsalmente. Ventralmente ao corpo cavernoso está o corpo esponjoso do pénis que envolve a uretra e se continua distalmente na glande do pénis. A uretra termina no processo uretral no centro da glande do pénis e está rodeada por uma invaginação conhecida como fossa da glande, e tem dorsalmente um divertículo conhecido como *sinus* uretral (figura 5) e dois recessos ventrolaterais. Durante a copula a glande do pénis fica extremamente ingurgitada o que provoca que a vagina também se distenda, e permitirá que o processo uretral encaixe na cérvix aberto da égua e a ejaculação ocorra diretamente para dentro do útero. O prepúcio é constituído por uma dupla camada de pele que permite acomodar o aumento acentuado do tamanho do pénis durante a ereção.

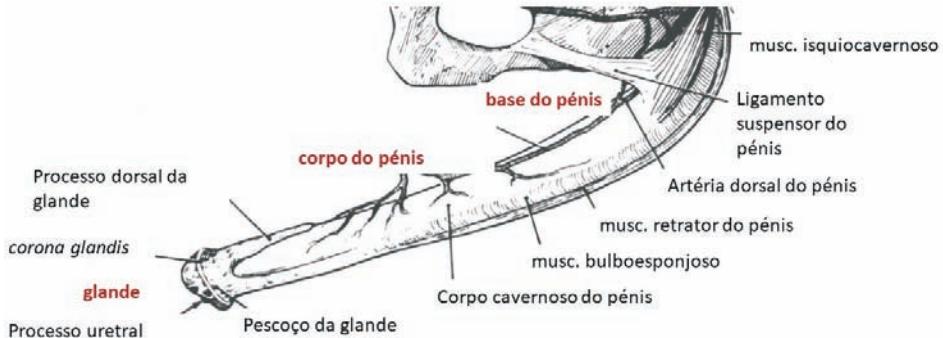


Figura 4: Pénis do Garanhão (*adaptado de Mckinnon et al., 2011*).

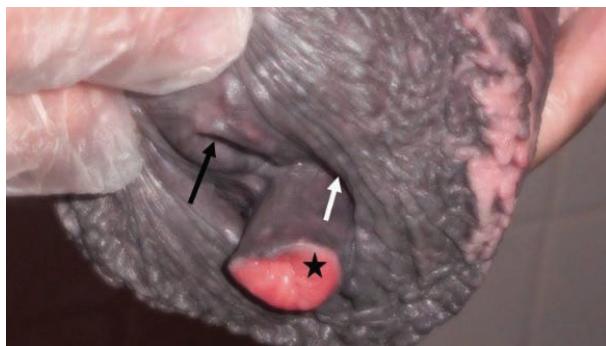


Figura 5: Glande do pénis: sinus uretral (seta preta), fossa da glande (seta branca), processo uretral (estrela).

Glândulas sexuais acessórias

As glândulas sexuais acessórias são as glândulas vesiculares, a próstata e as glândulas bulbouretrais (figura 1). As duas glândulas vesiculares, anteriormente denominadas de vesículas seminais, são alongadas, ocas, com comprimento de cerca de 15-20 cm e um diâmetro de 5 cm. A próstata é composta por um corpo nodular central ligado a dois lóbulos por um fino istmo. As duas glândulas bulbouretrais estão posicionadas à entrada da pélvis, de cada lado da uretra pélvica perto do arco isquiático.

Estas glândulas acessórias contribuem para a maior parte do fluido do ejaculado. Os espermatozoides da cauda de epidídimos e do ducto deferente estão imóveis até se misturarem com os fluidos das glândulas acessórias durante a ejaculação.

A secreção da próstata é aquosa e tem como função limpar a uretra, durante a ejaculação, constituindo a maior porção do plasma seminal. Dependendo

da época do ano e de cada garanhão, individualmente, a secreção de fluidos pode contribuir para uma maior ou menor porção de plasma seminal no ejaculado. A porção gelatinosa é produzida pelas glândulas vesiculares. As glândulas bulbouretrais também contribuem para o plasma seminal, ainda que em menor volume.

Espermatogénese

A espermatogénese é o conjunto de divisões e modificações celulares que conduz à formação dos gâmetas masculinos, os espermatozoides, nos tubos seminíferos. A espermatogénese dura aproximadamente 57 dias no garanhão e pode dividir-se em 3 fases: 1) espermatocitogénesis, caracterizada pela proliferação das espermatogónias, formação de espermáticos e divisão meiótica para formação das espermátides; 2) espermiogência, onde ocorre a diferenciação das espermátides em espermatozoides; e 3) espermiação, a libertação dos espermatozoides para o lúmen do tubo seminífero.

Endocrinologia

A GnRH (gonadotropin-releasing hormone; fator de libertação das gonadotrofinas), produzida pelo hipotálamo é libertada, de modo pulsátil, no sistema porta hipofisário. Atua na adeno-hipófise estimulando a libertação pulsátil de LH (luteining hormone, hormona luteinizante) e FSH (follicle-stimulating hormone, hormona folículo estimulante). A LH atua nas células de *Leydig* induzindo a produção de testosterona. Tem uma libertação pulsátil e uma semivida de aproximadamente 30 minutos. A FSH atua sobre as células de *Sertoli* e células germinativas induzindo a espermatogénese até à formação do espermátoco secundário. A testosterona é produzida nas células de *Leydig* e estimula o crescimento e função dos órgãos genitais e das glândulas sexuais acessórias, é responsável pelos caracteres sexuais secundários e influencia a libido e as fases finais da espermatogénesse. A testosterona atua de modo parácrino e endócrino, sendo transportada na corrente sanguínea por uma globulina de ligação.

A regulação hormonal implica mecanismos de retroação negativos e positivos. O aumento da testosterona induz um mecanismo de retroação negativo diminuindo a sínteses de GnRH. Quando a concentração de testosterona diminui, deixa de haver retroação negativa e aumenta a secreção pulsátil de GnRH e, consequentemente, de LH e testosterona. A libertação de FSH também é estimulada pela GnRH, mas é controlado por um mecanismo diferente da LH, pois as liberações de LH nem sempre são acompanhadas por libertação de FSH. Assim, a libertação de FSH está menos dependente da GnRH que a libertação de LH. A FSH atua ao nível das células de *Sertoli*, dentro dos tubos seminíferos, e as células de *Sertoli* produzem inibina, que inibe a produção de FSH.

2.2. Sazonalidade reprodutiva no garanhão

Os equinos apresentam sazonalidade reprodutiva, sendo denominados como reprodutores de dias longos, ou seja, a atividade reprodutiva está associada a dias de maior fotoperíodo. No caso do garanhão, apesar de existir alguma sazonalidade, a maior parte dos indivíduos não apresenta inatividade sexual. No entanto, de acordo com a época do ano, ocorrem alterações nas características seminais, hormonais (nomeadamente na secreção de LH e FSH) e no comportamento sexual. Durante as estações de primavera e verão verifica-se um aumento no tamanho e peso testicular, produção de espermatozoides, produção da fração gelatinosa das glândulas vesiculares, libido e concentração plasmática de LH, FSH, testosterona, E2, inibina e prolactina.

O principal fator que controla a existência de sazonalidade reprodutiva é o fotoperíodo, sendo o seu efeito mediado pela melatonina. A melatonina é produzida durante a noite e, como tal, diminui nas fases de fotoperíodo crescente, correspondendo ao período de maior atividade reprodutiva nos equinos. A prolactina também influencia a atividade reprodutiva, sendo produzida pela pituitária, associada ao aumento da exposição à luz.

Outros fatores como a temperatura, a alimentação e pluviosidade podem também influenciar a existência de sazonalidade reprodutiva.

O tamanho e a atividade testicular atingem o pico nos meses de maio, junho e julho, com valores mínimos registados nos meses de novembro a janeiro.

Em garanhões Puro Sangue Lusitano, da Coudelaria de Alter, verificou-se que existem diferenças individuais significativas na manifestação de sazonalidade reprodutiva, ou seja, alguns garanhões apresentam uma sazonalidade muito marcada enquanto outros apresentam poucas variações na produção espermática ao longo do ano. Em casos extremos as variações são muito acentuadas, sendo disso exemplo o caso de um garanhão Sela Francês adulto examinado no CRAV, que tinha um diâmetro testicular de ambos os testículos de 50 mm em novembro, com produção negligenciável de espermatozoides, e, no entanto, em maio tinha um diâmetro testicular de 90 mm com produção adequada de espermatozoides (António Rocha, comunicação pessoal).

2.3. Exame reprodutivo do garanhão

O exame reprodutivo do garanhão (ERG) permite avaliar o potencial de fertilidade de um garanhão. As principais indicações para o realizar são: a) exame em ato de compra; b) confirmar a fertilidade potencial do garanhão, antes do início da época reprodutiva; c) registar o garanhão em livros genealógicos para inscrição no livro de reprodutores e d) suspeita de infertilidade/subfertilidade. O exame reprodutivo do garanhão tem uma grande componente clínica e, como tal, só deve ser efetuado por um médico veterinário (MV). Permite identificar proble-

mas congénitos ou adquiridos, que possam diminuir a taxa de sucesso reprodutivo do garanhão, o que pode influenciar a fertilidade de um número maior ou menor de fêmeas. Além de permitir avaliar o potencial reprodutivo do garanhão, pode dar indicações sobre o melhor manejo para cada garanhão específico, nomeadamente número de éguas a cobrir, exequibilidade de uso para monta natural, ou para inseminação com sémen fresco, refrigerado ou congelado.

O ERG pode contemplar uma grande variedade de exames complementares, dependendo do objetivo a que se destina o garanhão, bem como da disponibilidade de meios complementares e custos que o proprietário está disposto a pagar. Como passos fundamentais no exame reprodutivo do garanhão realça-se: identificação, história clínica, exame físico, avaliação da libido, exame da genitália externa e espermograma. Na sua componente mais reduzida o ERG deve pelo menos incluir: exame da genitália externa do garanhão, medição do diâmetro de ambos os testículos e espermograma. Os métodos adicionais serão referidos em cada um destes pontos, sempre que aplicáveis.

Identificação

Cada garanhão deve ser identificado antes de começar o exame reprodutivo. Os requisitos necessários para que não surjam dúvidas sobre o garanhão examinado são: nome, número de *microchip*, idade, raça, proprietário, criador e um resenho do animal.

História clínica

Além da história clínica reprodutiva, é importante o conhecimento do manejo geral do garanhão, nomeadamente, alimentação, vacinações, desparasitações, ferração, história de problemas em outros sistemas, nomeadamente locomotor, visual, cardiovascular e respiratório, bem como, medicações utilizadas e doenças anteriores.

No que concerne à história reprodutiva, a informação sobre os resultados das épocas reprodutivas anteriores representa um bom indicador da fertilidade real do garanhão. Também é relevante saber o número e tipo de éguas em que foi utilizado, idade das éguas, número de gestação das mesmas, éguas alfeiras ou éguas com poldro, assim como o método reprodutivo em que foi utilizado anteriormente: cobrição natural a campo, monta dirigida, inseminação artificial com sémen fresco, refrigerado ou congelado. De facto, apesar de um dos mais fidedignos indicadores de fertilidade do garanhão ser o número de éguas que pariram um poldro após cobrição/inseminação, muitos fatores condicionam o sucesso do processo, nomeadamente, como referido, fatores relacionados com a fertilidade da égua e com o próprio manejo reprodutivo praticado. Outro dado importante é saber se há resultados de microbiologia da genitália para bactérias de potencial

transmissão venérea, sabendo, no entanto, que uma única cobrição de uma égua infetada pode tornar um portador negativo, em positivo. Também é necessário estar ciente de que história pregressa não documentada pode não corresponder à realidade.

O objetivo a que se destina o garanhão, bem como, o número de éguas que deverá deixar gestantes é fundamental na escolha das metodologias a utilizar na sua avaliação.

Exame físico

Deve realizar-se um exame físico completo, que implica a avaliação do estado geral e condição corporal, constantes vitais: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR) e hidratação; auscultação torácica e abdominal (motilidade gastrointestinal). Devem ser identificados defeitos músculo-esqueléticos, que possam eventualmente afetar a monta do garanhão, como problemas no dorso ou membros assim como problemas neurológicos. Deve ser também realizado um exame do sistema visual.

Líbido e comportamento sexual

A existência de líbido é essencial para que um garanhão possa ser considerado apto como reprodutor. A líbido deve avaliada utilizando uma égua em cio. Um garanhão com boa líbido manifesta-se através do aumento da agitação, vocalização, raspar dos membros, procurar a égua, *flehmen* (figura 6), exteriorização do pénis, ereção e monta. Para alguns autores, a observação do garanhão a montar a égua, introduzir o pénis e ejacular é essencial para a sua aprovação, no entanto, não é feito por rotina na maioria das vezes, dadas as dificuldades inerentes. É importante ter atenção ao manejo do garanhão na sala de recolha, já que, muitos garanhões alteram o seu comportamento por erros na sua condução ou manejo. O animal deve ser deixado com alguma liberdade e devem ser evitados movimentos bruscos ou agressivos. É considerado um comportamento sexual normal o garanhão fazer as primeiras montas sem ereção e por vezes lateralmente, e tal comportamento não deve ser reprimido.



Figura 6: Flehmen.

Exame da genitália externa

A pessoa que segura e dirige o garanhão deve ser experiente e conhecer o garanhão, para que assim possa prever comportamentos do mesmo e não se comprometa a integridade física dos operadores e dos animais. O garanhão deve ser controlado com serralhão, ou apenas cabeção se for calmo. O MV deve estar protegido com capacete e colete protetor.

Ambos, quem contém/conduz e quem avalia o garanhão devem colocar-se do mesmo lado do animal, normalmente do lado esquerdo. O exame deve ser efetuado onde o garanhão esteja mais tranquilo, seja na *box*, picadeiro, área de duche ou aparelhar, ou mesmo na zona de colheitas.

O exame da genitália externa implica a avaliação dos testículos, pénis e prepúcio. Se o tamanho do garanhão o permitir, a avaliação deve começar com o examinador a segurar a crina na base do garrote, com a mão esquerda, enquanto começa a palpar os testículos e prepúcio com a mão direita. O MV deve ficar sempre em contacto com o ombro esquerdo no garanhão, inclinando-se para alcançar a área inguinal. Deve ter o cuidado de manter a cabeça erguida com o peso do corpo centrado nas pernas. Muitas vezes a palpação testicular é feita apenas depois da recolha de sémen, de modo a que o garanhão esteja mais tranquilo.

Pénis e prepúcio

Para poder fazer um exame completo ao pénis o garanhão deve fazer a sua exteriorização completa, sendo, o ideal, obter uma ereção por exposição do garanhão a uma égua. Uma possível alternativa consiste na utilização de sedativos. Devem ser evitados os derivados fenotiazínicos como a acepromazina pois os garanhões podem desenvolver priapismo ou paralisia do pénis.

Deve ser observada a fossa da glande e *sinus uretral* que contém frequentemente acumulações de smegma (figura 7) Podem igualmente apresentar ulcerações as quais podem ser causa de hemospermia. O processo uretral deve ser cuidadosamente examinado em busca de lacerações ou escoriações.



Figura 7:

Acumulação de smegma sólido ("beans") na fossa uretral.

Para se poder observar a mucosa peniana deve ser feita a lavagem do pénis cuidadosamente, usando luvas, apenas com água morna (temperatura de aproximadamente 38°C), e papel humedecido de forma a eliminar os detritos e smegma acumulados A mucosa peniana deve estar íntegra sem sinais de ulceração ou qualquer lesão vesicular, inflamatória ou proliferativa. Não devem existir massas neoplásicas como sarcoides ou carcinoma das células escamosas. Outra situação recorrente é a existência de habronemiase, vulgarmente denominada como ferida de verão (figura 8).



Figura 8: Habronemiase na mucosa peniana.

Deve ser feita a pesquisa de doenças venéreas como parte do ERG, que nas nossas condições deve incluir, pelo menos, a pesquisa de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Taylorella equigenitalis*, sendo a última agente da metrite contagiosa equina, que é uma doença de declaração obrigatória. O ganhão positivo para estas bactérias é quase sempre um portador assintomático. A recolha de amostras deve ser feita com zaragatoa estéril na fossa da glande, processo uretral, *sinus* uretral mucosa peniana e prepúcio e enviada refrigerada para laboratório de microbiologia. É importante contactar com antecedência o laboratório para o qual as amostras serão enviadas, para saber de especificidades sobre preferências de meios de transporte. No caso da *Taylorella equigenitalis*, as amostras têm de ser transportadas em meio de *Aimes Carvão* (figura 9). Sempre que se justifique deve também ser feita a pesquisa do herpes vírus equino tipo 3 e do vírus da arterite equina.



Figura 9: Recolha de amostras para pesquisa de *Taylorella equigenitalis*.

Escroto e testículos

O escroto e os testículos devem ser avaliados por palpação e, se necessário, por ecografia (ver abaixo condições que sugerem necessidade de ecografia). O escroto situa-se na região inguinal do garanhão e é, geralmente, simétrico e ligeiramente pendular. A pele do escroto deve ser lisa e fina e não deve apresentar nenhum tipo de lesões traumáticas, cicatrizes, dermatites ou sarcoides. O escroto deve ser de espessura uniforme, e em contacto direto com os testículos. O escroto está dividido em duas bolsas escrotais, direita e esquerda, pela rafe intermédia, que pode ser visualizada externamente na parte ventral.

Os testículos têm forma elíptica e devem ser sensivelmente simétricos em tamanho, terem a mesma forma e ter uma consistência firme e resistente. Ambos devem estar na bolsa escrotal e serem móveis dentro da mesma. A não observação de um, ou de ambos os testículos, na bolsa escrotal é indicativo de criotorquidismo uni - (figura 10) ou bilateral e implica a não aprovação do garanhão como reprodutor, uma vez que pode ser uma afeção de carácter hereditário. Outra alteração que pode ser identificada é a existência de hérnia inguinal, em que ocorre evaginação de uma porção do intestino através dos anéis inguinais (figura 11).

Os testículos devem ser comparados entre eles, pois certas afeções afejam apenas um testículo. Quando o escroto distendido, o eixo maior do testículo está posicionado horizontalmente ou ligeiramente oblíquo. A posição do testículo pode ser avaliada pela palpação da cauda do epidídimo, a qual deve estar caudal, sendo palpável também o ligamento caudal do epidídimo.



Figura 10: Criotorquidia do testículo unilateral esquerdo (Foto de Sofia Ramos).



Figura 11: Hérnia escrotal.

A existência de alterações de consistência ou volume testicular bem como limitações de mobilidade testicular intra-escrotal, são indicadores para a realização de ecografia. Lesões agudas e inflamatórias estão geralmente associadas a diminuição da ecogenecidade e aumento de volume, enquanto lesões degenerativas estão muitas vezes associadas a atrofia testicular com aumento da ecogenecidade do parênquima ou alteração da textura homogénea do parênquima testicular (Figura 12). No caso de ser detetado um testículo(s) de pequeno volume, a avaliação do tamanho da cauda do epidídimo permite distinguir entre hipoplasia e atrofia testicular. No primeiro caso a cauda do epidídimo apresenta também um volume diminuído, indicando uma situação congénita (e provavelmente hereditária) e que implica a reprovação do garanhão. Na atrofia testicular (figura 13) a cauda do epidídimo apresenta dimensão fisiológica. A atrofia está geralmente associada a problemas degenerativos adquiridos sendo que no caso de ser unilateral, o restante ERG, em particular no que se refere à produção de sémen, condicionará a decisão final.



Figura 12: Ecografia de testículo com atrofia testicular e alteração da ecogenecidade do parênquima



Figura 13: Atrofia testicular unilateral do testículo direito.

O peso e o volume do parênquima testicular têm uma correlação alta e significativa com a produção de espermatozoides. A produção diária por grama de parênquima testicular é de aproximadamente 16×10^6 espermatozoides.

Frequentemente, dada a facilidade de mensuração e sua relação com o volume testicular, o diâmetro testicular (de ambos os testículos na porção mais larga) é utilizado para avaliar o desenvolvimento testicular. O diâmetro testicular pode ser medido utilizando um *caliper* ou compasso (figura 14) ou por ecografia (figura 15). O diâmetro bilateral mínimo aceitável é de 8 cm num garanhão adulto.



Figura 14: Caliper ou compasso para medição do diâmetro testicular.

Na medida em que o volume testicular (VT) está diretamente relacionado com a produção diária de espermatozoides (DSO: *daily sperm output*), idealmente, o VT deve ser calculado, através da medição da altura, do comprimento e do diâmetro/largura, o que é facilmente executado por ecografia (figura 15).

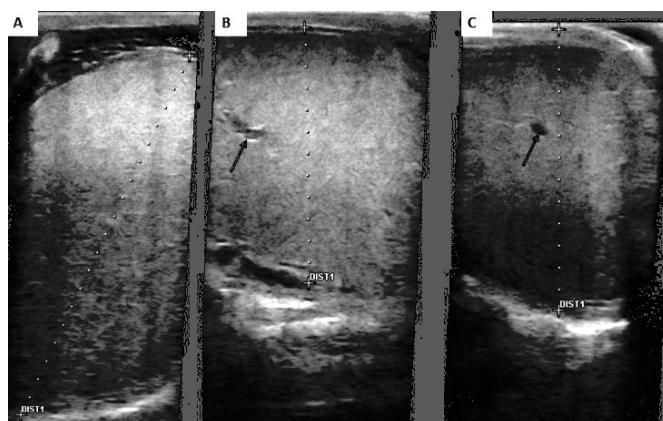


Figura 15: Avaliação do volume testicular por ecografia (A: comprimento; B: altura; C: largura. As setas indicam a veia central. Notar a textura homogênia típica de um testículo normal).

Usando como unidade métrica o centímetro e medindo a altura (A), comprimento (C) e diâmetro (D, largura) de cada testículo podemos calcular o volume testicular através da seguinte equação:

$$\text{Volume de cada testículo} = 0.523 \times (A \times C \times D) \text{ em cm}^3$$

Somamos o volume de ambos os testículos para obter o volume total.

A produção diária de espermatozoides esperada (DSO) pode ser estimada usando o volume testicular e aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{DSO esperado } (\times 10^9) = (\text{volume testicular} \times 0.024) - 1,26$$

A produção diária de espermatozoides média pode também ser calculada realizando colheitas diárias ao longo de 10 dias. A comparação da produção diária real de espermatozoides e da produção esperada segundo a equação em cima, deve ser realizada em garanhões com problemas de fertilidade, já que, um DSO real (produzido) consideravelmente menor que o estimado pela fórmula, indica um decréscimo de funcionalidade do parênquima testicular. O cordão espermático deve ser palpado e, se possível, avaliado por ecografia, com ou sem doppler (figura 16).

A cabeça e corpo do epidídimo são menos fáceis de identificar por palpação, do que a cauda. O corpo do epidídimo localiza-se na porção dorso-lateral do testículo, e a cauda do epidídimo está localizada na porção caudal do mesmo. Quando se palpa o testículo deve-se prestar atenção à localização de todas as estruturas do mesmo e também ao ligamento da cauda do epidídimo, pois se houver uma rotação de 180º do mesmo esta é facilmente identificada. Esta rotação pode ser intermitente ou permanente e acontecer em um ou ambos testículos, e pode ser diferenciada de uma torção do cordão espermático, pois nesta última o garanhão demonstraria sinais de cólica com dor aguda e tumefação na área testicular. A rotação testicular ocorre em várias raças de garanhões e pode ter um componente hereditário.



Figura 16: Ecografia com doppler do cordão espermático.

Colheita de sémen

O método mais seguro e eficaz para a colheita de sémen é utilizando a vagina artificial (VA), mas o sucesso deste método depende tanto da experiência e líbido do garanhão, como da experiência de quem efetua a colheita. A vagina artificial pode ser usada para colheitas em estação, usando uma égua em cio ou utilizando um manequim.

Preparação do garanhão

O garanhão deve ser dirigido por alguém experiente, de preferência que o conheça, para que possa prever possíveis comportamentos indesejados do mesmo. Deve ser levado para o local de colheita com o mínimo de contenção adequada a cada indivíduo, de forma a evitar estímulos negativos – serrilhão para uns, cabeção para outros dependendo do seu temperamento.

Lavagem do pénis

Antes da monta ou colheita de sémen o pénis do garanhão deve ser limpo para remover o smegma ou detritos que possa conter (figura 17). Este procedimento permite minimizar o risco de contaminação do sémen e posterior infecção das éguas cobertas/inseminadas. A remoção dos detritos é essencial também para minimizar os erros associados à leitura da concentração por espectrofotometria, bem como para avaliar a qualidade do sémen.

A lavagem do pénis deve ser feita com água morna (aproximadamente a 38°C) e com papel humedecido. Em primeiro lugar o pénis deve ser molhado abundantemente com água morna para amolecer e soltar os detritos e smegma que se encontram aderidos ao pénis. Após este procedimento, o pénis deve ser lavado com papel humedecido, tendo o cuidado de evitar traumatizar a mucosa peniana. Este procedimento deve ser iniciado na base do pénis e terminado na glande sem esquecer a fossa da glande que é um local de concentração de smegma, onde o mesmo chega a formar fragmentos sólidos (“beans” – Figura 17). Para terminar deve secar-se o pénis do garanhão. Este procedimento deve ser feito com papel absorvente e deve iniciar-se na fossa da glande passando depois para a glande, corpo do pénis e base do pénis.



Figura 17: Lavagem do pénis do garanhão antes da recolha de sémen.

Vagina artificial

O método mais usado para efetuar colheitas de sémen é através do uso de vagina artificial (VA). Existem diferentes modelos de vagina artificial (figura 18), mas, a base de funcionamento de todas é idêntica, ou seja, existe um corpo de borracha ou plástico rígido externo, e um “liner” de borracha suave ou látex interno, com água aquecida entre as duas partes. O “liner” interno pode ter forma cónica (figura 18) permitindo acoplar o frasco de recolha. Noutros modelos como o modelo INRA (figura 18 B) e Hannover (figura 18 A) é necessário colocar um outro “liner” (também designado como bainha sanitária), de plástico, onde se acopla o frasco de colheita. Alguns dos diferentes modelos de vagina artificial (VA) que podemos encontrar são Colorado, Missouri, INRA e Hannover (figura 18). Os vários modelos têm características diferentes e muitas vezes existe preferência de um garanhão por determinado modelo. Características como o modelo de VA, a temperatura e a pressão utilizadas durante colheitas com sucesso, devem ser registadas para cada garanhão. Ao frasco de recolha de sémen, normalmente de material plástico, pode adicionar-se um filtro de gel. O ejaculado também pode ser filtrado pós-colheita, mas a contaminação bacteriana é maior no último caso.

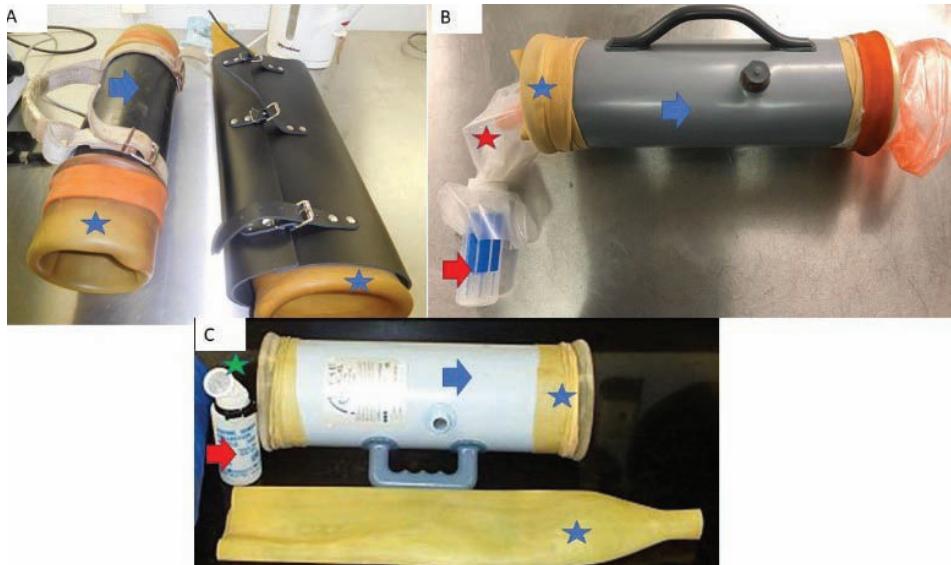


Figura 18: Vaginas artificiais. **A:** Hannover e Missouri; **B:** INRA; **C:** Colorado. Corpo: seta azul; *liner* interno de borracha: estrela azul; *liner* plástico ou bainha sanitária: estrela vermelha; copo de recolha: seta vermelha; filtro: estrela verde.

Após a VA montada enche-se com água quente, para se obter uma temperatura interna em contacto com o “liner” entre os 45°C e os 48°C. Estes valores dependerão de garanhão para garanhão e a temperatura pode ser moderadamente aumentada. Para garanhões com renitênciam a aceitar a VA, as primeiras modificações aconselhadas consistem em tentar aumentar a temperatura, incrementar a lubrificação ou utilizar “liner” interno de borracha ou látex, evitando o de plástico. A adição de água quente deve ser feita com cuidado porque temperatura em excesso pode danificar /derreter o “liner” interno. A pressão da vagina artificial também vai depender das preferências de cada garanhão, mas a pressão deve estar adequada para que o pénis entre sem dificuldade e para que possa haver ingurgitação da glande durante a excitação sexual e a ejaculação. Para avaliar a pressão e temperatura deve colocar-se uma luva de palpação transrectal estéril, ou pelo menos virada ao contrário de modo a minimizar a contaminação e utilizar um termómetro em contacto com a parede interna da vagina. Após a vagina artificial estar montada e cheia, pode colocar-se uma pequena quantidade de gel lubrificante não espermicida na entrada da mesma (aproximadamente o volume de uma colher de sobremesa), para que seja facilitada a penetração pelo pénis do garanhão na altura da colheita de sémen. Excesso de gel, mesmo não espermicida, pode provocar choque osmótico aos espermatozoides, entre outros possíveis impactos.

Recolha de sémen

Após a exteriorização e limpeza do pénis, o garanhão é dirigido para o manequim ou égua para se realizar a colheita (Figura 19).



Figura 19: Recolha de sémen em égua peada e em manequim.

Tanto o operador que conduz o garanhão como quem vai fazer a colheita devem estar sempre do mesmo lado do cavalo. Montas iniciais sem ereção e ejaculação à terceira monta, devem ser considerados comportamentos normais e não se deve reprimir o garanhão até que tenha uma ereção, para o deixar montar. Uma vez que o cavalo tenha realizado a monta, o pénis deve ser desviado para o lado e introduzido dentro da vagina artificial que deve ser colocada numa posição semi-horizontal com a porção distal – do tubo coletor – ligeiramente elevada, mimetizando a anatomia da vagina da égua. Se a extremidade distal da vagina estiver para baixo provocará desconforto ao garanhão e este poderá desmontar. Se a temperatura e pressão da vagina artificial estiverem adequadas estimularão o garanhão a fazer os movimentos pélvicos. O pénis deve estar introduzido ao máximo dentro da vagina artificial para que quando ocorra a ejaculação o sémen esteja o menor tempo possível em contacto com a vagina artificial, pois a temperatura elevada é prejudicial aos espermatozoides. Em VA longas como o modelo Colorado, ou em vaginas com a extremidade distal semi-ocluída como o modelo Hannover, é essencial retirar a água quente logo após a colheita para evitar choque térmico dos espermatozoides. A vagina artificial deve estar bem segura com uma mão, enquanto que a outra mão deve ser colocada na base do pénis do garanhão para confirmar os pulsos uretrais ejaculatórios. Após a ejaculação a vagina artificial é retirada, colocada na vertical (figura 20) e, como referido, dependendo do modelo, a água quente tem de ser retirada imediatamente após a colheita, e o sémen recolhido deve ser levado imediatamente para o laboratório para ser processado. O ejaculado do garanhão é emitido em jatos (6-8) sendo que os últimos contêm a fração pós-espermática gelatinosa, com origem nas glândulas vesiculares, que deverá ser depois filtrada. Fora da época reprodutiva (fotoperíodo menor) esta fração pode estar totalmente ausente do ejaculado.



Figura 20: Posição da vagina na vertical após a recolha (tirar a água) (foto de Alfredo Pereira).

Escolha da égua para ser utilizada como manequim para recolha de sémen

Se se optar por utilizar uma égua para realizar a colheita de sémen esta deve ser escolhida com alguma precaução. A égua escolhida deve apresentar sinais evidentes de cio, para não rejeitar o garanhão e para que este possa montar sem problemas. Deve também ser uma égua calma e de bom maneio. Deve então ser preparada para a monta com um protetor de pescoço e garrote para evitar lesões provocadas pelo garanhão, deve ser também peada, para que não possa escoicear o garanhão (figura 21) ou o operador e na rabada deve ser colocada uma ligadura para evitar lesões no pénis do garanhão e diminuir probabilidade de contaminação (figura 22). Convém também que os quartos posteriores da égua sejam limpos. Frequentemente éguas ovariectomizadas também aceitam monta do garanhão. A rabada da égua pode também ser atada de modo a que possa tapar a entrada da vagina, evitando assim a penetração por parte do garanhão.

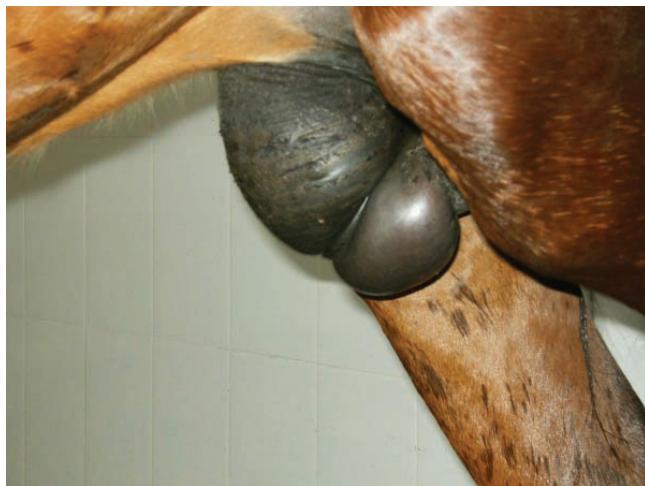


Figura 21: Trauma da região do pénis e prepúcio em garanhão escoceado por égua não peada.



Figura 22: Égua peada e limpa para ser utilizada como manequim para recolha de sémen.

Manequim

Na ausência de égua em cio ou para garanhões treinados e com boa líbido, a melhor opção para realizar a colheita de sémen é o manequim, já que quando este é construído corretamente, reduzem-se consideravelmente os riscos inerentes para o garanhão e operador durante as colheitas de sémen. O manequim deve estar forrado com um material resistente, não abrasivo e fácil de limpar. A altura e ângulo do manequim devem ser ajustados para cada garanhão de forma a que este se sinta o mais confortável possível, o que é particularmente importante para garanhões com problemas no dorso e curvilhões.

Os garanhões podem ser treinados e ensinados a montar no manequim (figura 23) e muitos passam a reconhecer o manequim com objeto sexual e realizam a monta sem necessidade de égua nas proximidades. No entanto, para a maioria dos garanhões, ter uma égua em cio nas proximidades do manequim, aumenta a estimulação sexual e facilita a monta e ejaculação. Um dos riscos da utilização do manequim é a ocorrência de ferimentos ou lesões no pénis se este não for desviado rapidamente no início da monta pois o cavalo empurra vigorosamente contra o manequim. Corre-se igualmente o risco de contaminação do pénis, se os manequins não forem devidamente lavados entre colheitas.



Figura 23: Treino do garanhão para recolha em manequim.

Colheita em estação

Por vezes, devido a problemas físicos do garanhão que impossibilitem a monta ou em que esta seja bastante dolorosa para o cavalo, opta-se por realizar a colheita em estação, devendo ser mostrada ao cavalo uma égua em cio para que este exteriorize o pénis. O pénis deve ser bem limpo e seco, como anteriormente descrito. Para realizar a colheita em estação introduz-se uma vagina artificial no pénis ereto e numa posição paralela ao abdómen e a mão direita deve ser colocada na base do pénis para aumentar a estimulação. A pessoa que segura o garanhão deve fornecer algum suporte a este, empurrando com o ombro esquerdo, e do lado direito do garanhão deve estar uma parede para evitar deslocações laterais. À medida que o garanhão faz os movimentos de penetração na vagina artificial adota uma postura de cabeça baixa e dorso arqueado. As colheitas em estação tendem a ser caracterizadas por um sémen com menor volume do ejaculado, menor número total de espermatozoides e mais tempo até à ejaculação quando comparado com o sémen colhido em égua/manequim. Entre os dois métodos não há diferença no peso exercido sobre os membros posteriores.

Avaliação do sémen

A avaliação do sémen é parte integrante do ERG. O valor preditivo desta avaliação é extremamente importante, podendo ser vantajosa a utilização de metodologias de avaliação mais objetivas e completas, de modo a ser possível identificar marcadores fidedignos da fertilidade do garanhão. De facto, se a existência de sémen de aparente má qualidade em avaliações laboratoriais está frequentemente associada a subfertilidade, a existência de sémen de boa qualidade não é garantia de boa fertilidade. Não é, assim, fácil de identificar um único teste que tenha um bom valor preditivo da capacidade fertilizante do sémen. O desenvolvimento de novas metodologias, bem como a associação de vários testes parece ser a melhor opção. Para se saber se os ejaculados obtidos são fisiológicos, devem realizar-se duas recolhas com intervalo de 1 hora. Para que ambos os ejaculados sejam representativos devem ter sensivelmente o mesmo volume e motilidade espermática, o segundo ejaculado deve ter entre 50 a 60% do número de espermatozoides do primeiro e poderá, eventualmente, ter um pH ligeiramente mais elevado.

Logo após a colheita, o sémen deve ser rapidamente levado para o laboratório sem exposição à luz e sem sofrer mudanças de temperatura. Todos os materiais que entram em contacto com o sémen devem estar aquecidos e a uma temperatura de 37°C.

Cor, cheiro e consistência

O sémen puro deve ter uma cor acinzentada ou branca e é ligeiramente turvo. A turbidez está diretamente relacionada com a concentração espermática, mais turvo significa maior concentração. Os ejaculados de baixa concentração têm uma aparência mais aguada e os mais concentrados tem uma apariência mais cremosa. A urospermia pode ser detetada pela cor amarelada do ejaculado e o cheiro a urina. Uma cor rosa ou vermelha é indício de presença de sangue – hemospermia (Figura 24 e 25). Um ejaculado avermelhado e com aglomerados purulentos pode indicar a existência de vesiculite.



Figura 24: Coloração avermelhada do ejaculado indicativa de hemoespermia.



Figura 25: Aspetto macroscópico e microscópico de sémen com hemospermia após massagem transrectal para desobstrução de ampola ocluída (foto cedida por *Miguel Bliebournicht*).

Volume filtrado

Se não foi utilizado filtro acoplado ao liner interno durante a colheita de sémen, o primeiro procedimento a fazer no laboratório será filtrar o sémen (figura 26) para remoção dos detritos e da fração de gel. A determinação do volume é feita após filtração. O método mais utilizado para medir o volume é a colocação do ejaculado num tubo cilíndrico graduado e realização da leitura. Outro método também usado, e considerado por alguns autores como mais objetivo é a pesagem em balança de precisão, em que se considera que cada grama de sémen equivale a 1 mililitro (figura 27).



Figura 26: Filtração do sémen para remoção da fração gelatinosa.

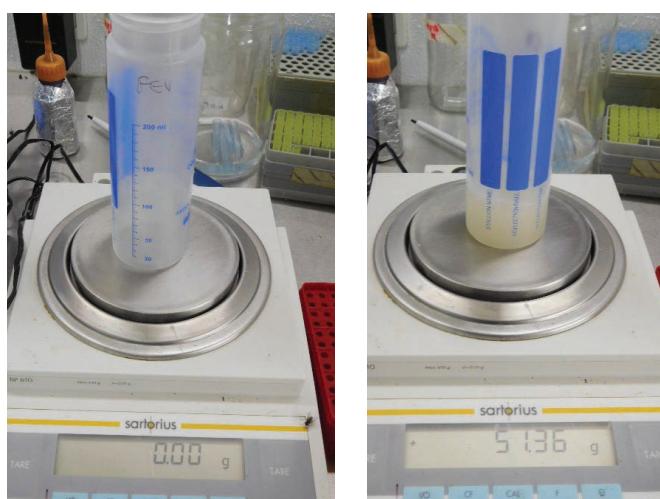


Figura 27: Avaliação do volume filtrado com balança de precisão.

A determinação do volume é necessária para calcular o número de espermatozoides totais no ejaculado. O volume do ejaculado varia entre 50 e 120 mL dependendo de vários fatores como a sobrercitação, tempo de colheita, época do ano, frequência das colheitas, raça e idade do garanhão. O volume médio calculado em garanhões Alter Real foi de $57,1 \pm 24,1$ mL ($n=227$). Numa análise de 449 ejaculados no Centro de Reprodução Animal de Vairão obteve-se um volume médio de $68,7 \pm 46,5$ mL em cavalos Puro Sangue Lusitano (PSL).

pH

O pH normal do ejaculado de um garanhão varia entre 7.2 a 7.7 e pode ser medido com qualquer aparelho medidor de pH. O pH pode ser influenciado pela época de ano, concentração e frequência de ejaculação. Existe uma correlação negativa entre a concentração de espermatozoides e o pH, assim uma menor concentração de espermatozoides está relacionada com pH mais elevado do ejaculado. Um pH acima dos valores de referência pode estar associado a urospermia ou infecção do trato genital masculino.

Concentração

A avaliação da concentração é essencial para determinar o número de espermatozoides totais no ejaculado, o que por sua vez é também fundamental para a preparação de doses para inseminação artificial ou para refrigeração e congelação de sémen. Existem vários métodos de avaliação da concentração de sémen.

Espectrofotometria

Provavelmente este é o método mais prático e rápido de avaliar a concentração de um ejaculado, mas também o menos preciso pois não diferencia espermatozoides dos restantes tipos de células que podem existir num ejaculado, podendo também ser influenciado pela sujidade do sémen. O método de análise com espectrofotómetro consiste em fazer passar um feixe de luz pela amostra que é analisado posteriormente por um fotodetector. A absorvância da amostra é então convertida pelo próprio leitor em concentração de espermatozoides, sendo a quantidade de luz que atravessa a amostra inversamente proporcional à concentração espermática. É importante referir que estes aparelhos são adequados apenas para medir a concentração espermática em amostras de sémen puro, pois os diluidores, sendo opacos diminuem a absorção da luz, daí resultando numa leitura da concentração artificialmente mais elevada. Por outro lado a inadequada limpeza do pénis pode conduzir a erros na medição da absorvância, pois os detritos orgânicos aumentam a opacidade da amostra. Existem vários modelos co-

mercias de espectrofotómetro com diferentes *softwares* disponíveis. Deve ter-se em atenção o correto enchimento da célula de contagem pois a existência de bolhas de ar ou sujidade pode prejudicar a leitura (figura 28).



Figura 28: Enchimento incorreto da cuvete de medição com presença de bolha de ar que altera a leitura no espectrofotómetro.

Contagem em hemocitómetro

Existem vários tipos de hemocitómetro, sendo que os mais frequentemente utilizados são a câmara de *Burker* e a câmara de *Neubauer* (geralmente *Neubauer* modificada). O hemocitómetro apresenta duas câmaras centrais retangulares alinhadas na vertical. Dentro das câmaras é gravada a laser uma grelha de linhas e, para determinar a concentração, devem ser contados ao microscópio os espermatozoides presentes dentro dessa grelha. A câmara de contagem tem uma área e profundidade pré-determinadas, sendo assim possível determinar o volume da amostra a analisar. Utilizando como modelo a câmara de *Neubauer* modificada, os 25 quadrados de cada lado da câmara, representam uma área de 1 mm quadrado. A profundidade do hemocitómetro é de 0,1 mm. Portanto, o volume é de 0,1 μ L (1x1x0.1).

Devido a variações na amostra, para que a contagem seja o mais exata possível, deve-se idealmente fazer contagem nas duas câmaras. Se a diferença da contagem entre as câmaras for igual ou superior a 15% conclui-se que houve erros na preparação da amostra ou enchimento da câmara e repete-se o procedimento. Para avaliar a concentração espermática com hemocitómetro existem vários passos a ter em atenção, como se descreve em seguida.

Técnica de utilização do hemocitómetro (*Neubauer* modificada)

A diluição mais frequente é de 1:100. No entanto se o sémen for muito concentrado pode aumentar-se a diluição, e inversamente, se o sémen for pouco concentrado pode diminuir-se a concentração, ou mesmo utilizar sémen puro, sendo apenas necessário colocar na fórmula de cálculo a diluição utilizada.

1. Diluir o sémen puro a 1:100 (10 µL: 990 µL) em formalina tamponada a 10% ou água da torneira que imobiliza os espermatozoides por choque osmótico; homogeneizar a amostra.
2. Montar a câmara; após homogeneizar a amostra diluída encher por capilaridade ambos os lados da câmara (figura 29) e esperar 5 minutos.
3. Observar com objetiva de 10 a 20 ×, para localizar a grelha central. A grelha central é formada por um conjunto de quadrados 5x5, cada quadrado subsequentemente dividido em 4x4 quadrados menores (figura 30).
4. Contar todos os espermatozoides com mais da metade da cabeça do espermatozoide dentro da área sombreada. Para espermatozoides que se encontram exatamente com metade da cabeça na borda da área sombreada, conta-se apenas as cabeças que se encontram nas linhas superior e direita do retângulo, isso impede a contagem do mesmo espermatozoide duas vezes em quadrados adjacentes.
5. Contar os espermatozoides nos 5 quadrados em diagonal com objetiva de 20 ou de 40 em ambos os lados da câmara e calcular a média. Multiplicar por 5 para termos o n.º de espermatozoides nos 25 quadrados. Como antes diluímos a 1:100 temos ainda de multiplicar por 100.
6. Na medida em que o volume da câmara é de 0.1 µL para termos o n.º de espermatozoides em 1 mL temos de multiplicar o valor obtido por 10 000.

Exemplo:

Média de espermatozoides contados nas duas câmaras em 5 quadrados: 50
 $50 \times 5 = 250$ espermatozoides em 0.1 µL;
 $250 \times 100 = 2500$ spz (diluição da amostra)
 $2500000 \times 10\,000 = 250 \times 10^6 / \text{mL}$ para termos a concentração por mL

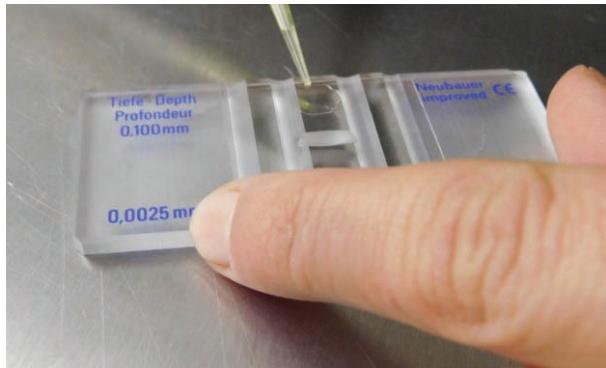


Figura 29: Enchimento por capilaridade da câmara de *Neubauer*.

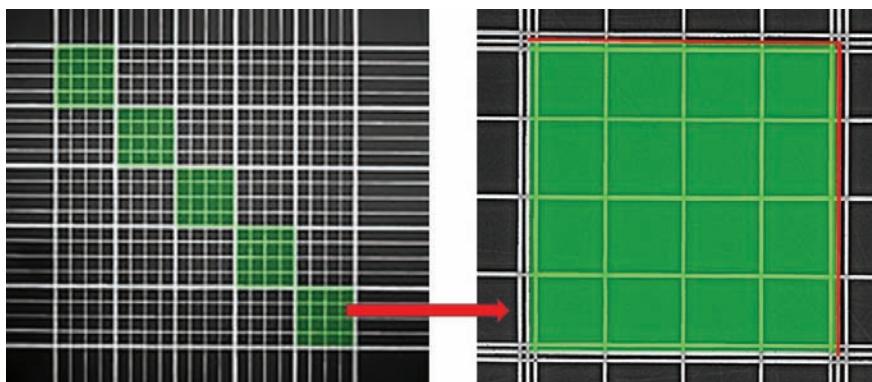


Figura 30: Câmara de *Neubauer* modificada. Contam-se os espermatozoides que estão na linha superior e direita (linhas vermelhas).

A contagem das células espermáticas em câmara é fundamental para amostras menos concentradas ($<100 * 10^6$) ou após adição de diluidores ao sêmen, o que invalida o uso de espectrofotômetro.

NucleoCounter NC-100 (ChemoMetec, Dinamarca)

Este equipamento, desenvolvido recentemente, permite avaliar rapidamente a concentração e, com base na ligação do iodeto de propidium com o ADN das células espermáticas, estimar a viabilidade dos espermatozoides. Oferece, assim, elevada especificidade e repetibilidade, não sendo influenciado pela utilização de diluidores, células somáticas ou detritos. Apesar do custo associado do aparelho e despesa com cuvetes para cada leitura, é extremamente útil, sobretudo em amostras muito ou pouco concentradas e após a adição de diluidor. O processo é rápido, o que constitui uma enorme vantagem relativamente à utilização do hemocitómetro, permitindo uma diluição e processamento rápido das amostras.

CASA (*computer assisted sperm analysis*)

Os sistemas computorizados de análise de sémen também podem ser utilizados para avaliar a concentração. Apresentam, no entanto, várias limitações técnicas, nomeadamente a dificuldade de padronizar o volume e a profundidade das câmaras, na medida em que o hemocitómetro utilizado para a contagem manual, tem excesso de altura para poder ser utilizado como câmara para avaliação com estes sistemas. Assim, apesar de podermos ter uma ideia da concentração pelos valores indicados por estes sistemas, os mesmos acabam por, de um modo geral, não ser utilizados para esta determinação.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, permite a contagem de células após a sua marcação com um flurocromo, podendo ser usada para determinar a concentração de uma amostra de sémen. A complexidade da preparação das amostras bem como o elevado custo do equipamento impede a sua utilização por rotina (ver 2.4.).

Motilidade

A avaliação da motilidade do sémen é, sem dúvida, um dos fatores mais importantes na avaliação da capacidade fertilizante do mesmo. A motilidade é apontada por muitos autores como um dos principais fatores que se correlaciona com a fertilidade, sendo, no entanto, um dos parâmetros medido com maior subjetividade. A avaliação da motilidade é feita em microscópio com platina aquecida (37°C) colocando-se uma gota de sémen entre lâmina e lamela, utilizando-se uma ampliação de 200X a 400X. Deve ter-se o cuidado de deixar estabilizar a amostra e de utilizar sempre o mesmo volume (5 a 10 μl) e concentração seminal ($50\text{-}100 * 10^6$ espermatozoides/mL). Isto porque, diferentes volumes e diferentes concentrações podem induzir o avaliador em erro. A utilização de microscópio com contraste de fases aumenta a equidade da observação visual. Devem observar-se 5-6 campos e ter em atenção a manutenção da temperatura e não deixar secar a amostra, utilizando preferencialmente a região central da lamela. No entanto, recomenda-se a utilização de um diluidor, pois o sémen puro tem tendência a aglutinar-se e, se o ejaculado for demasiado concentrado, os espermatozoides podem ter dificuldade em movimentar-se ou pode ser impossível a correta avaliação da sua trajetória.

A motilidade pode classificar-se em motilidade total, motilidade progressiva e velocidade. A motilidade total consiste na percentagem de espermatozoides móveis independentemente da trajetória efetuada. A motilidade progressiva, consiste na percentagem de espermatozoides que têm um movimento linear

ou ligeiramente curvilíneo, progressivo. No caso do garanhão muitas vezes pode ser subestimada na medida em que dada a inserção abaxial da cauda do espermatozoide, o movimento tem tendência a ser ligeiramente curvilíneo. A velocidade é medida numa escala arbitrária de 0 a 4 em que 0 é imóvel e 4 muito rápido.

Sendo a motilidade uma das características que pode ser mais subjetiva na avaliação visual, é um dos principais parâmetros que é considerado na avaliação computorizada de sémen (CASA, ver 2.4. Técnicas complementares na avaliação de sémen).

A motilidade dos espermatozoides pode ser artificialmente afetada por diferentes fatores, nomeadamente fatores associados à sua manipulação como a utilização de excesso de gel na vagina artificial, temperatura da platina e do diluidor, e modo de preparação da amostra. Garanhões na puberdade ou garanhões no início da época que não estão a ejacular regularmente podem apresentar diminuição da motilidade. Outras alterações que podem também afetar a motilidade podem ser a existência de doença noutros sistemas que, originando febre, podem conduzir a alteração da espermatogénese. A existência de processos degenerativos associados à idade ou a alterações inflamatórias ou trauma testicular pode também estar associada a alteração da motilidade.

Morfologia

A avaliação da morfologia é parte integrante do espermograma, podendo o aumento de formas anormais estar associado a subfertilidade e mesmo infertilidade.

A morfologia espermática é analisada no microscópio ótico a uma ampliação de 1000x com imersão em óleo, em esfregaços de sémen corados (ex. eosina-negrosina ou MG Quick por exemplo figura 31 e 32), podendo ser também avaliada sem coloração, com recurso a microscopia de contraste de fases. Neste último caso, os espermatozoides são imobilizados diluindo uma gota do ejaculado em formol salino ou numa solução de glutearaldeído a 0.2% em solução tampão e colocando uma gota numa lâmina, coberta por uma lamela. Devem ser observados entre 200 a 300 espermatozoides e classificados de acordo com o defeito morfológico que apresentem. Os defeitos encontrados normalmente podem ser categorizados em cabeças soltas, defeitos da cabeça, perda ou anomalia de acrosoma, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, vários defeitos de peça intermédia, cauda enrolada (figura 31 e 32). Podem ser estabelecidas diferentes categorias, com maior grau de precisão das anomalias detectadas, e que permitem uma informação mais precisa da qualidade do ejaculado. Existem várias fichas modelo (anexo 1) que podem ser utilizadas para registo dos dados. Se ocorrerem múltiplas anomalias por célula espermática, estas anomalias podem ser registadas de duas formas: apenas uma anomalia por espermatozoide, registrando-se a que se considere mais grave, (normalmente defeitos de

cabeça tomam precedência sobre defeitos da peça intermédia e da cauda, e defeitos da peça intermédia tomam precedência sobre defeitos da cauda), ou, mais corretamente registar todos os defeitos da célula espermática. Neste caso, para além da percentagem de células normais, os números mostram o número de defeitos não o número de células anormais o que torna a interpretação mais complexa. Independentemente da forma de registar anomalias, é necessário estar ciente de que uma elevada incidência de múltiplas anomalias por célula espermática sugere alteração grave da espermatogénese. Devemos ter especial cuidado na preparação das amostras pois uma manipulação incorreta pode induzir alterações à morfologia, por exemplo com excesso de cabeças soltas, por elaboração incorreta do esfregaço, ou caudas enroladas associadas a soluções hiposmóticas.

Os defeitos na cabeça e cauda do espermatozoide afetam a sua motilidade, o que compromete o seu movimento dentro do útero da égua. Estudos *in vitro* revelaram que espermatozoides com defeitos na cabeça podem apresentar dificuldades na fecundação. As alterações da morfologia podem estar também associadas a alterações da espermiogénese, degeneração testicular, inflamação do testículo ou epidídimos e stress térmico.

Alguns autores classificam as alterações de morfologia em alterações primárias (alterações ocorridas na espermatogénese), secundárias (associadas ao armazenamento extragonadal, principalmente no epidídimos) e terciárias, devidas à manipulação. Dado existirem algumas alterações que podem estar enquadradas em qualquer uma destas categorias (como por exemplo cabeças soltas) esta classificação não é, atualmente, muito utilizada. O potencial efeito das diferentes anomalias na capacidade fertilizante e o seu significado biológico deve ser avaliado caso a caso, mas na generalidade considera-se que um ejaculado “normal” não deve ter mais do que 30% de formas anormais nem mais do 10% da mesma anomalia.

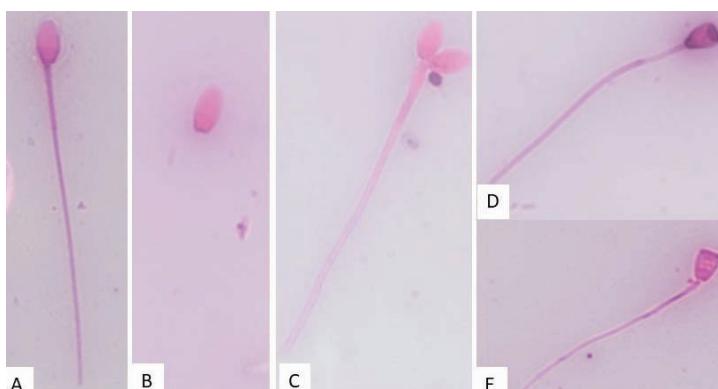


Figura 31: Alterações da morfologia dos espermatozoides. **A** espermatozoide normal; **B** cabeça destacada; **C** cabeça dupla; **D** e **E** anomalia da acrossoma (Coloração MGQuick ampliação 1000X).

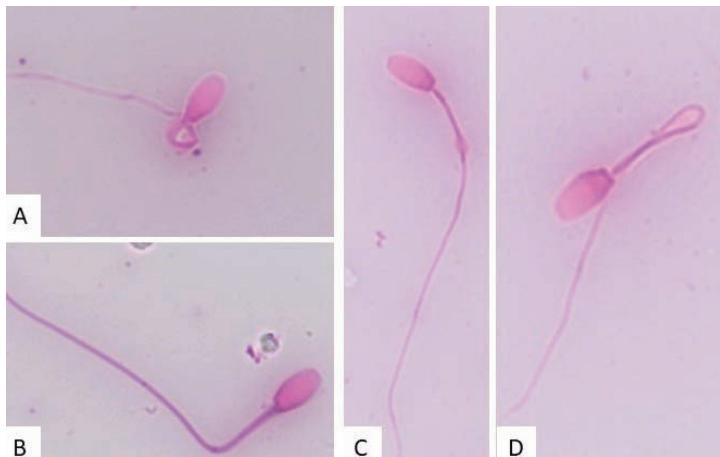


Figura 32: Alterações da morfologia dos espermatozoides. **A** Peça intermédia enrolada; **B** peça intermédia dobrada; **C** gota citoplasmática distal; **D** cauda enrolada/dobrada (Coloração MGQuick ampliação 1000X).

Avaliação das glândulas sexuais acessórias

As glândulas sexuais acessórias podem ser avaliadas por palpação e ecografia transrectal. Apesar da sua avaliação não ser incluída por rotina deve ser equacionada quando se encontram células polimorfonucleares ou sangue no sêmen sem origem óbvia na genitália externa, e em situações da azoospermia, falha na ejaculação ou ejaculações intermitentes em particular se existir elevada percentagem de cabeças soltas ou sinais clínicos sugestivos de ampola ocluída (figura 25). Em regra, visualiza-se a próstata (figura 33) e as vesículas (estas apenas após estimulação sexual), podendo também observar-se na ecografia transretal as ampolas, nomeadamente quando dilatadas (figura 34).



Figura 33: Ecografia transretal: próstata.

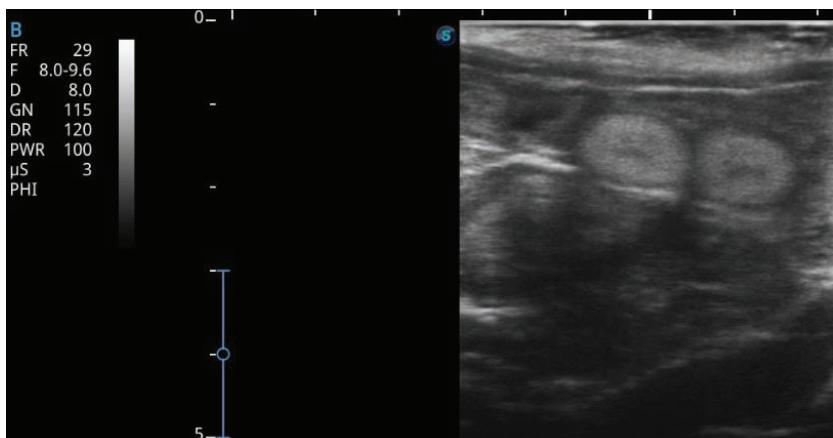


Figura 34: Ecografia transretal: ampolas em seção transversal.

Critérios mínimos para aprovação de um garanhão como reprodutor

Para emitir um relatório/parecer sobre o potencial fértil de um garanhão devem integrar-se os vários parâmetros referidos. De modo resumido o garanhão deve:

- Ter capacidade de cópula;
- Estar livre de afecções hereditárias;
- Ter os dois testículos na cavidade escrotal e um diâmetro bitesticular total mínimo de 8 cm;
- Ter uma produção mínima de $1,1 \times 10^9$ SPZ móveis e normais.

Deve ainda ser livre de *Klebsiella pneumoniae*, de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Taylorella equigenitalis* (cultura obtida a partir do pénis e uretra) bem como de artrite viral equina. Note-se que, embora as duas primeiras bactérias sejam, por regra, resistentes a diversos antibióticos, existem formas de utilizar garanhões portadores, entre elas a inseminação artificial e técnicas de contaminação mínima. A *Taylorella equigenitalis* responde a antibióticos e antissépticos, mas como anteriormente referido, o isolamento desta bactéria implica declaração obrigatória às autoridades veterinárias e tratamento dos reprodutores afe-tados. Estes animais podem voltar a ser utilizados após 3 testes negativos para pesquisa da bactéria, confirmado por autoridade competente.

2.4. Técnicas complementares na avaliação de sémen

CASA (*computer assisted sperm analysis*)

Consiste num sistema que projeta imagens sucessivas de uma suspensão de sémen, para uma matriz de detetores que identifica as células de acordo com a intensidade de *pixels* através de captação de imagens sucessivas. O sistema inclui um microscópio de contraste de fases e com platina aquecida, acoplado a uma câmara que, posteriormente, está ligada a um computador que possui um *software* específico para extrair informação (figura 35). Apesar de ser um sistema de avalia-ção objetivo é extremamente importante partir do princípio que, para que pos-sam ser feitos estudos comparativos, é imprescindível a utilização de amostras obtidas de forma idêntica e analisadas com definições semelhantes. Consequen-temente, resultados obtidos por diferentes laboratórios, mesmo com equipa-mento idêntico, não são comparáveis.

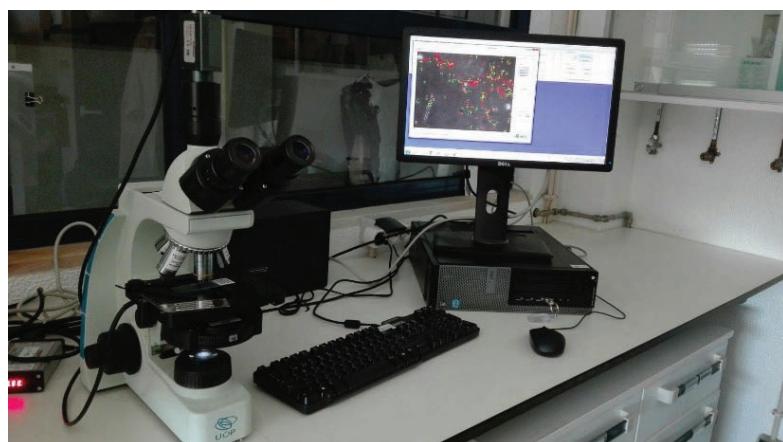


Figura 35: Sistema computerizado de avaliação de sémen (CASA).

Uma das principais indicações para a utilização destes sistemas computadorizados é avaliação da cinética espermática. A câmera de alta resolução realiza vídeos de tempo definido, sendo geralmente captados cerca de 200 espermatozoides por imagem. Este sistema permite a obtenção de uma imagem tridimensional sendo a resolução lateral definida pelos eixos X e Y (alterações ao longo do campo na horizontal) e resolução axial definida pelo eixo Z (alterações ao longo do campo em profundidade).

Para uma correta interpretação dos dados é imprescindível ter cuidados na preparação da amostra nomeadamente diluições/concentrações semelhantes. As amostras a avaliar devem ter o mesmo volume e deve a utilizar-se o mesmo suporte físico (câmera, lâmina lamela). Devem utilizar-se concentrações entre os 25 e os 100 milhões por mL, dependendo a diluição da concentração inicial do ejaculado. Como suporte físico para a amostra podem utilizar-se as câmaras próprias dos fabricantes (Leja, ISA, WHO) ou lâmina e lamela tendo neste último caso de se ter atenção à utilização de um volume fixo, entre 5 a 10 µL e o cuidado de se observar no centro da lamela, utilizando sempre lamelas da mesma dimensão. A seleção dos campos a observar pode ser automática ou manual. A imagem deve ser focada pela imagem que se vê no monitor do computador e não pela observação da ocular.

Deve utilizar-se sempre o mesmo contraste e intensidade de luz, de modo a podermos comparar amostras entre si. Idealmente recomenda-se um tempo de exposição: < 0,02 segundos e uma frequência de captação de imagens ≥ 50 imagens por segundo (*frame rate*).

Este sistema permite a avaliação de vários parâmetros de motilidade que se prendem não só com o tipo de movimento (progressivo ou não, percentagem de linearidade), mas também com a velocidade dos espermatozoides (Figura 36).

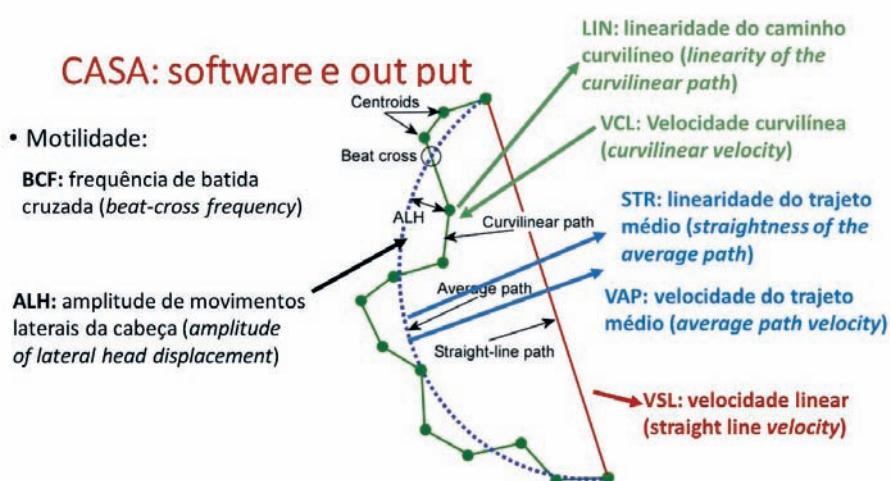


Figura 36: Parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA (adaptado de Amann, e Waberski, 2014).

Quando se faz a avaliação da motilidade obtém-se imagens (figura 37) que permitem visualizar o trajeto dos espermatozoides, de tal forma que as cores diferentes indicam diferentes velocidades (amarelo: estáticos, verdes: lentos, azuis: velocidade média e vermelho: rápidos). Deve esperar-se até que a imagem estabilize, já que a existência de movimentos de arraste dos espermatozoides provoca erros na interpretação dos dados obtidos.

A partir do relatório do CASA pode obter-se informação sobre a percentagem total de espermatozoides móveis e móveis progressivos, bem como as velocidades (expressas em média \pm desvio padrão). O sistema permite igualmente estabelecer classes de espermatozoides em função do tipo de motilidade e da velocidade (figura 38). Para que possamos interpretar corretamente estas informações é essencial definir muito claramente os padrões de avaliação, nomeadamente a linearidade e as classes de velocidade (alta, média ou baixa), já que só com estas definições se podem comparar resultados. Dada a elevada percentagem de trajetórias curvas dos espermatozoides de equino, e devido à ausência de qualquer relação entre motilidade progressiva medida por CASA e fertilidade, e ao facto de resultados indicarem que a motilidade total foi o parâmetro com a maior correlação com a taxa de gestação por ciclo, vários laboratórios só reportam a motilidade total, e não a progressiva.

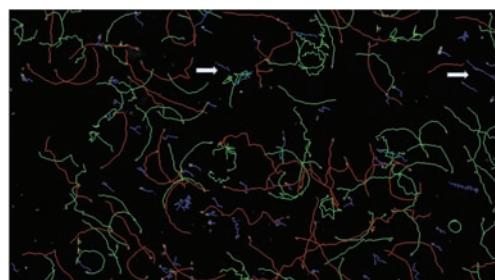


Figura 37: Imagem obtida por avaliação com o CASA. As setas brancas indicam movimentos de arraste por não estabilidade da amostra.

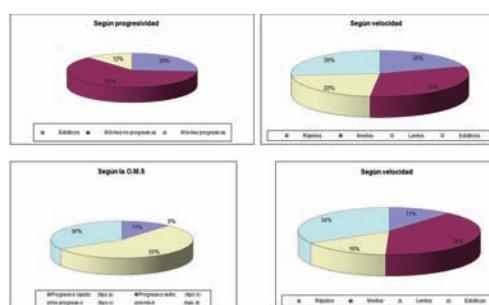


Figura 38: Avaliação por CASA: classes de espermatozoides em função da velocidade e linearidade do movimento.

Citometria de fluxo

De modo resumido a avaliação do sémen por citometria de fluxo implica:

1. Preparação da amostra e incubação com um fluorocromo/sonda (corante fluorescente) que se irá ligar a diferentes componentes das células espermáticas em função do que pretendemos avaliar; por exemplo, o iodeto de propidium vai corar as membranas dos espermatozoides mortos.
2. Um sistema de injeção que cria um fluxo de células.
3. Um sistema ótico que inclui sensores, um ou mais *lasers* e vários fotodetectores.
4. Um sistema digital que fará a análise de dados.

A grande vantagem deste sistema é que permite avaliar um grande número de células (cerca de 10 000) aumentando grandemente a precisão e objetividade da avaliação. Por outro lado, possibilita uma grande rapidez na análise das amostras e uma enorme precisão, já que os flurocromos ligam-se a organelos e componentes celulares específicos. Globalmente, em termos de avaliação de sémen este sistema permite determinar a concentração e também a viabilidade do mesmo. As diversas sondas podem ser utilizadas individualmente ou combinadas, permitindo detetar a **viabilidade** (os espermatozoides não viáveis ou alterados – SYBR14, Yo-Pro1), detetar indiretamente o potencial de **motilidade** através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial (JC-1, Mitotracker); verificar a **fragmentação do ADN**, e a **integridade do acrosoma** (PNA).

Uma vantagem adicional desta técnica poderá ser a sexagem do sémen. No entanto, no garanhão esta não é ainda uma opção de rotina.

2.5. Outros parâmetros a avaliar no exame do garanhão

Longevidade e resistência do sémen à refrigeração e criopreservação

Em situações em que o garanhão se destine a utilização com sémen criopreservado, é extremamente importante avaliar a sua resistência à criopreservação, descongelando uma palhinha e observando a taxa de motilidade, já que de facto uma percentagem elevada (mais de 30%) dos garanhões são maus “congeladores”.

No que concerne ao sémen refrigerado, geralmente é avaliado para a motilidade às 24, 48 e 72 horas após refrigeração, tendo em consideração que o sémen de muitos garanhões é sensível a esta refrigeração.

Alternativamente pode avaliar-se sémen mantido à temperatura ambiente, protegido da luz, fresco ou diluído, sendo avaliada a motilidade de hora a hora. Neste caso, deve ter idealmente mais de 10% de motilidade 6 horas após a colheita.

3. Égua reprodutora

3.1. Anatomia e fisiologia reprodutiva da égua

O trato reprodutivo da égua pode dividir-se em duas partes: externa, constituída pelo períneo, vulva e vestíbulo; e interna, composta pela vagina, cérvix, útero, ovidutos e ovários (figura 39).

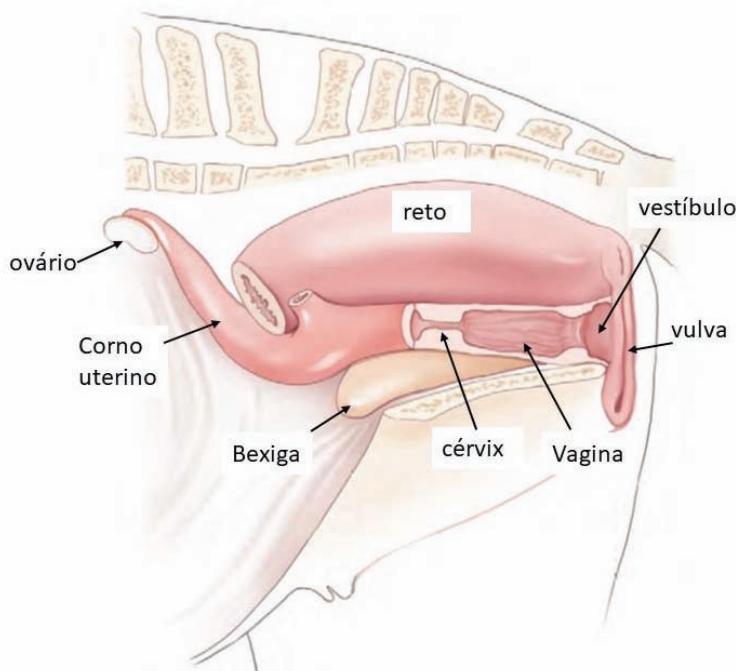


Figura 39: Anatomia do trato reprodutivo da égua (adaptado de Brinsko, 2011).

Períneo

O períneo ou região perineal estende-se da região da sínfise púbica até à base da cauda (figura 40).

Vulva

É a terminação caudal do trato genital e representa a primeira barreira de proteção do trato reprodutivo feminino. Tem, aproximadamente, 12-15 cm de altura e é composta por lábios vulvares, comissura dorsal, comissura ventral e junção mucocutânea.

Clitóris

É composto pelos músculos retrator do clitóris, constrictor vulvar e constrictor vestibular (que atuam na contração durante estro) e pelas glândulas sebáceas clitorianas. Divide-se em glande do clitóris, prega frenular transversa, fossa do clitóris, seios clitorianos lateral e medial e recessos lateral e medial.



Figura 40: Genitália externa na égua: períneo.

Vestíbulo

Encontra-se situado ao longo do assoalho pélvico e tem aproximadamente 10-12 cm de comprimento e orientação ventrodorsal. É composto por mucosa, glândulas vestibulares e pelos músculos constrictores vestibulares. Apresenta, na sua porção mais cranial, uma prega transversa vestíbulo-vaginal, que constitui a segunda barreira anatómica de proteção do trato genital. Em éguas virgens a prega prolonga-se em ambos os lados formando o hímen. Ocasionalmente o hímen rodeia toda a prega vestíbulo-vaginal e mantém-se imperfurado (hímen persistente). Caudalmente à prega vestíbulo-vaginal, localiza-se a abertura externa da uretra.

Vagina

É um órgão tubular, com aproximadamente 10 a 20 cm, que se estende cranialmente à prega vestíbulo-vaginal. Normalmente, encontra-se colapsado, exceto aquando da cobrição, parto ou inseminação. O fórnix vaginal é um recesso anular formado pela junção das paredes vaginais cranialmente, onde se localiza a porção vaginal da cérvix (orifício externo da cérvix).

Útero

Encontra-se suspenso na cavidade pélvica e abdominal pelo ligamento largo e tem uma estrutura tubular em forma de "Y".

O útero pode dividir-se em 3 porções: **a cérvix**, na parte cranial da cavidade pélvica, com aproximadamente 5-7 cm, composta por tecido muscular e conjuntivo, que constitui a terceira barreira anatómica do trato genital, **o corpo** com aproximadamente 18-20 cm, que se bifurca em **2 cornos uterinos** com aproximadamente 20-25 cm de comprimento e unidos pelo ligamento intercornual (figura 41). Internamente o útero é revestido por 3 camadas: perimetrio, mio-metrio e endometrio. A porção do ligamento largo que se une ao útero denomina-se de mesometrio e, na égua, insere-se dorsalmente, impedindo a retração do útero para a cavidade pélvica durante a palpação transretal.

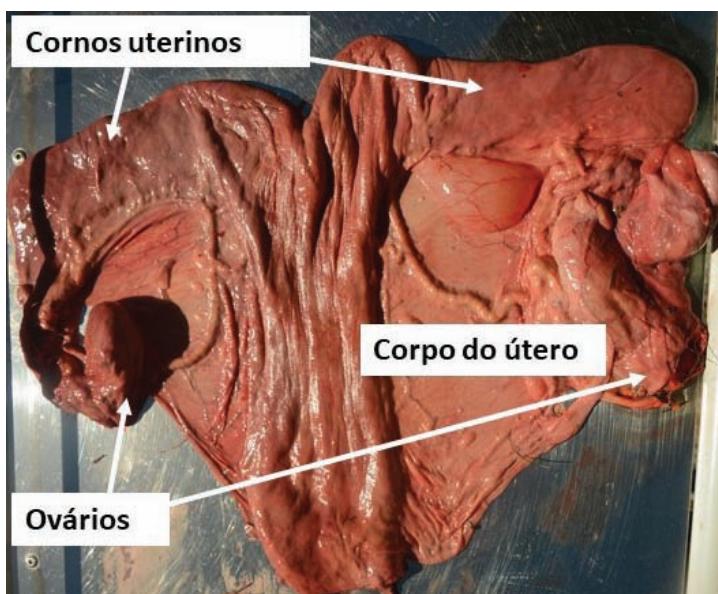


Figura 41: Trato reprodutivo da égua: porção interna.

A porção serosa mais externa (perimétrio) e camada muscular longitudinal possuem uma vascularização que é contínua com o ligamento largo. O miométrio inclui uma porção circular interna e uma porção longitudinal externa, contínua com a porção muscular do oviduto, sendo responsável pelo aumento do tônus uterino. A porção mais interna, endométrio, tem uma função glandular e secretora, sendo que o seu lúmen está geralmente oculto na égua não gestante, pelas paredes uterinas colapsadas e pregas endometriais (figura 42), as quais se dispõem longitudinalmente na parede uterina.



Figura 42: Pregas endometriais (foto de Maria José Vila-Viçosa).

A cérvix é revestida internamente por um epitélio contendo células secretoras responsáveis pela produção de muco, mais fluído durante o estro para facilitar a lubrificação, e mais espesso durante o diestro para funcionar como barreira de defesa. As pregas longitudinais da cérvix são contínuas com as do útero. A existência apenas de pregas longitudinais na cérvix facilita o acesso transvaginal ao útero, ao contrário do que se passa nos ruminantes.

Ovidutos

São tubos longos e tortuosos com 20-30 cm de comprimento, que se dividem em 3 partes: o istmo (porção mais estreita que se liga aos cornos uterinos), a ampola (porção intermédia onde ocorre a fecundação e as fases iniciais do desenvolvimento embrionário) e o infundíbulo (porção em forma de funil, mais perto do ovário, que capta o ovócito aquando da ovulação).

O oviduto abre-se no útero através da papila ovidutal, sendo que o sémen chega ao oviduto através da junção uterotubárica, localizada no centro da papila ovidutal, a qual se projeta na extremidade dos cornos uterinos.

Ovários

A sua posição é variável, mas, geralmente estão situados ventralmente à 4.^a e 5.^a vértebra lombar. O ovário direito está, geralmente, em posição mais cranial e dorsal. Numa égua adulta, os ovários apresentam tamanho variável consoante a época do ano, entre os 2-4 cm de comprimento no período de anestro e 6-8 cm na época reprodutiva. Possuem uma superfície convexa, aderida ao mesovário por onde se estabelece a irrigação e inervação, e uma superfície côncava livre, onde se situa a fossa de ovulação (figura 43 e 44).

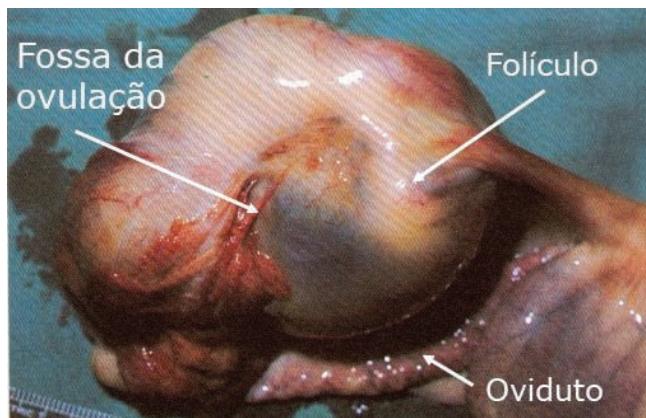


Figura 43: Ovário da égua (foto de Maria José Vila-Viçosa).



Figura 44: Ovário da égua: fossa de ovulação (foto de Ana Costa).

Todo o ovário, exceto a fossa de ovulação é revestido por uma camada de proteção, a túnica albugínea. Contrariamente ao que se passa nas outras espécies, apresentam uma zona cortical mais interna, onde se encontram estruturas foliculares e luteínicas, e uma zona medular ou vascular, mais externa, composta por células intersticiais (estroma) que fornecem suporte à porção cortical (figura 45). O ovário tem simultaneamente uma função endócrina (produção de hormonas) e não endócrina (gametogénese).

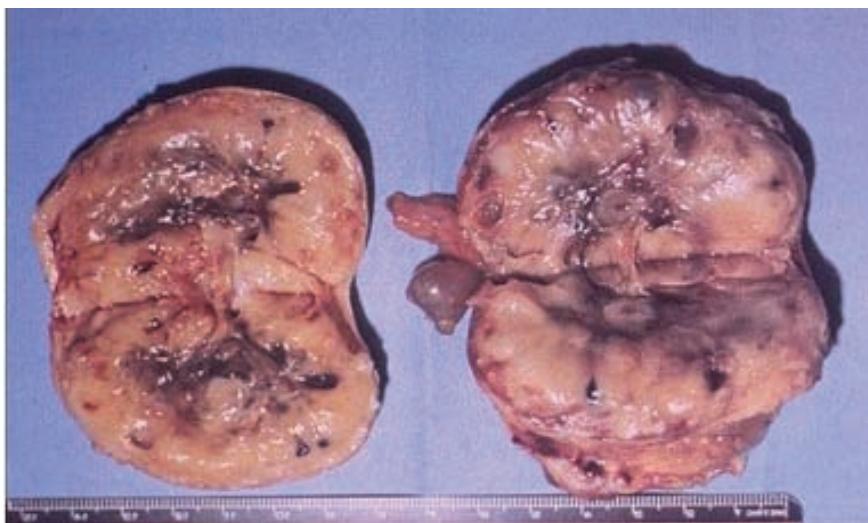


Figura 45: Ovários da égua: zona medular e cortical (foto de *Maria José Vila-Viçosa*).

Ciclo reprodutivo da égua

Os equinos são uma espécie poliéstrica sazonal, ou seja, as éguas apresentam ciclos éstricos consecutivos durante a estação reprodutiva, a qual corresponde à época de fotoperíodo crescente (primavera e verão).

O ciclo éstrico, definido como o intervalo entre duas ovulações consecutivas, tem a duração de 21-24 dias. De um modo geral, considera-se a existência de quatro fases distintas ao longo do ciclo éstrico: estro, metaestro, diestro e proestro. Na égua, na medida em que não existem proestro e metaestro bem definidos, considera-se, frequentemente, em termos práticos, a existência apenas da fase de estro e de diestro.

Durante o estro, correspondendo a nível ovárico à fase folicular, a égua apresenta sinais comportamentais de cio e o trato reprodutivo apresenta condições favoráveis ao transporte de gâmetas masculinos e ocorrência de fecundação. O aumento da concentração de estradiol, produzido pelos folículos em crescimento, associado a baixas concentrações de progesterona (<1 ng/ml), é responsável pelo comportamento de estro/cio, o qual, na égua, se caracteriza pela aceitação do macho, recetividade sexual, abaixamento da garupa, afastamento da cauda e micção frequente, com movimentos do clitóris e eversão vulvar (figura 46). O estro tem a duração de 5 a 9 dias, daí resultando a variabilidade encontrada na duração do ciclo éstrico na égua, que é mais longo no início e final da época reprodutiva (menos horas de luz) e mais curto no pico da época (mais horas de luz).

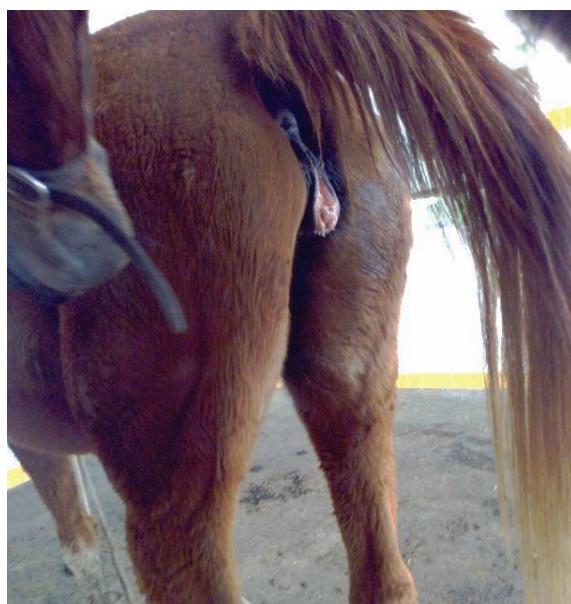


Figura 46: Eversão vulvar e afastamento da cauda: sinais de cio na égua.

A ovulação (dia 0) ocorre, em geral, 24-48 horas antes do fim do estro, formando-se então o corpo lúteo (CL) e iniciando-se a fase luteínica, que corresponde à fase de diestro na égua. Durante a fase luteínica a égua não está recetiva ao garanhão e o útero, sobre a influência da progesterona produzida pelo corpo lúteo, desenvolve condições para o estabelecimento de gestação, caso tenha ocorrido fecundação. A fase luteínica dura cerca de 14 a 15 dias, sendo a sua duração menos variável que a da fase folicular. Assim, entre o dia 13 e o dia 16, se não houver fecundação, vai haver produção de prostaglandina F2 alfa (PGF_{2α}) pelo endométrio, a qual induz a luteólise e subsequente diminuição da concen-

tração de progesterona. O CL da égua parece ter maior sensibilidade à ação da PGF_{2α} e, ao contrário dos ruminantes, a PGF_{2α} na égua atinge o ovário através da circulação sistémica, não existindo o mecanismo de contracorrente (entre as veias uterinas e artérias ováricas) típico dos ruminantes. O tempo entre a luteólise e o início do cio e ovulação do ciclo subsequente depende do diâmetro do folículo dominante aquando da luteólise.

A regulação hormonal do ciclo éstrico envolve o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e o endométrio (Figura 47). A GnRH (fator de libertação de gonadotrofinas) é secretada de modo pulsátil pelo hipotálamo, induzindo a libertação de LH (hormona luteinizante) e FSH (hormona folículo-estimulante) pela adenohipófise. A LH e FSH são libertadas na circulação sanguínea e atuam a nível ovárico. Durante o estro aumenta a frequência da secreção pulsátil de GnRH e consequentemente de LH e FSH, sendo que cada pulso de GnRH induz um pulso de LH. Mais de 80% dos pulsos de LH são acompanhados por pulsos de FSH, indo esta hormona estimular o recrutamento e crescimento folicular, multiplicação das células da granulosa e formação de receptores para LH. A LH é responsável pela maturação folicular, produção de estrogénios, ovulação e luteinização.

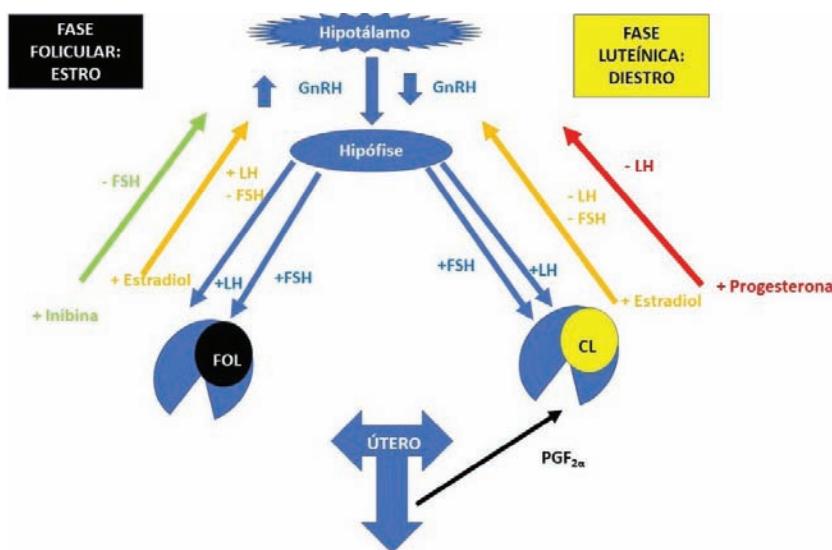


Figura 47: Ciclo éstrico: regulação hormonal.

Na égua existe alguma divergência nos padrões de secreção da FSH e LH ao longo do ciclo éstrico, o que poderá estar relacionado com diferentes padrões de regulação e secreção. Durante a fase folicular ocorre um aumento da frequência da secreção pulsátil de GnRH, o qual conduz ao aumento da secreção pulsátil de LH e FSH. O aumento da LH, na fase periovulatória, é acompanhado por um pequeno aumento de FSH, a qual declina rapidamente enquanto a concentração de LH atinge o seu máximo. Ao contrário das outras espécies, não há propriamente uma onda pré-ovulatória de LH, sendo que a sua concentração se mantém alta durante o estro e ao longo de vários dias, atingindo mesmo a maior concentração após a ovulação. Uma segunda elevação de FSH, mais proeminente, ocorre durante a fase luteínica, sem estar associada a nenhum aumento de LH e sendo variável de égua para égua.

O crescimento folicular na égua ocorre por ondas, podendo existir uma a duas ondas ao longo do ciclo éstrico. Cada onda de crescimento folicular implica o recrutamento de novos folículos (desencadeado pela FSH), seleção do folículo dominante e estabelecimento de dominância.

Em éguas com uma onda de crescimento folicular esta emerge cerca do dia 10 do ciclo, resultando na identificação de um folículo dominante mais ou menos sete dias antes da ovulação. Em éguas com duas ondas de crescimento folicular, uma primeira onda pode emergir ainda no final do estro ou muito precocemente no início do diestro, podendo originar um folículo anovulatório. No entanto, ao contrário de outras espécies, este folículo pode ovular mesmo na presença de um corpo lúteo funcional e concentração elevada de progesterona (ovulação de diestro). A frequência destas ovulações de diestro é variável entre raças, não se sabendo a sua prevalência nas raças portuguesas.

Como referido, a emergência de cada onda de crescimento folicular está associada a uma elevação de FSH, sendo que o aumento da FSH ocorre até que o folículo dominante atinja um diâmetro aproximado de cerca de 13 mm, diminuindo subsequentemente, o que condiciona o crescimento dos folículos subordinados. A concentração de FSH diminui pela existência de um mecanismo de retro-ação negativo (*feedback* negativo), devido ao aumento da concentração de estradiol e inibina produzidos pelos folículos em crescimento, particularmente pelo folículo dominante. As alterações no folículo dominante, que permitem que este mantenha o seu crescimento mesmo com a diminuição da concentração de FSH, incluem o aumento da sensibilidade à FSH e o aumento do IGF I livre (fator de crescimento semelhante à insulina). A LH não influencia a seleção do folículo dominante, mas sim o seu crescimento subsequente.

Após o estabelecimento da dominância, o folículo dominante vai crescer, em média, cerca de 3 mm por dia até um diâmetro pré-ovulatório de cerca de 35 mm, cerca de 4 dias antes da ovulação. Daí em diante continua a crescer até cerca dos 2 dias antes da ovulação, altura em que estabiliza (cerca dos 40 mm durante a época reprodutiva, podendo atingir os 50-55 mm, dependendo de cada égua e da

época do ano). Após a luteólise, e diminuição subsequente da concentração de progesterona, o estradiol exerce um mecanismo de retroação positivo (*feedback* positivo) aumentando a secreção de LH, que é a responsável pela ovulação.

Como referido, a ovulação na égua ocorre através de um local específico, a fossa de ovulação, implicando alterações histológicas, funcionais e moleculares ao nível das células da teca e da granulosa no folículo dominante. Durante a ovulação o ovócito e corona radiata são libertados ocorrendo a libertação rápida do fluido folicular para a cavidade peritoneal. A absorção rápida de estradiol folicular para a circulação sanguínea leva ao aumento pronunciado da inibina em circulação no dia da ovulação.

Podem existir ovulações duplas, dependendo a sua frequência da raça, estado reprodutivo, idade e manipulação farmacológica do ciclo éstrico.

O corpo lúteo formado após a ovulação desenvolve-se para o interior do ovário, não sendo por isso detetável por palpação. O corpo lúteo inclui células luteínicas e não luteínicas, sendo que as células luteínicas derivam na égua exclusivamente de células da granulosa. O desenvolvimento do corpo lúteo implica uma intensa angiogénese e aumento da vascularização, a qual pode ser detetada pela avaliação por *doppler*. A concentração de progesterona aumenta muito rapidamente após a ovulação, sendo máxima cerca do dia 8 e regredindo lentamente aquando da luteólise entre o dia 13 e o dia 16. De modo a assegurar a produção de PGF_{2α} na égua não gestante, verifica-se o aumento da expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) no endométrio, sendo a mesma inibida em éguas gestantes, razão pela qual é considerado como um dos eventos fundamentais para o reconhecimento materno da gestação na égua. Como em outras espécies, a produção de PGF_{2α} é estimulada pela oxitocina, que normalmente é segregada pela hipófise, sendo que na égua, ao contrário de outras espécies, não existe produção de oxitocina pelo corpo lúteo. Por outro lado, a égua é a única espécie onde existe secreção de oxitocina pelas células endometriais, existindo assim um efeito parácrino (oxitocina produzida pelas células endometriais) e autócrino (oxitocina produzida pela hipófise) de regulação da síntese de PGF_{2α} e oxitocina.

As alterações hormonais ao longo do ciclo éstrico traduzem-se em alterações anatómicas na égua, as quais podem ser identificadas no exame do trato reprodutivo (ponto 2.3.). Durante o estro, a alta concentração de estradiol e baixa concentração de progesterona, induzem o desenvolvimento de edema uterino (visível ecograficamente) e o aumento do sistema de *clearance* uterina, aumentando a presença de polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos, a atividade secretora do endométrio e a contratilidade do miométrio. A abertura e relaxamento da cérvix são indispensáveis para um eficaz sistema de defesa uterino, e durante o estro esta apresenta-se relaxada, aberta e caída no assoalho vaginal com mucosa mais vascularizada. Nesta fase, o muco cervical aumenta em quantidade, mas, torna-se mais translúcido, e os folículos em desenvolvimento podem ser visualizados por ecografia. Durante o diestro, em que ocorrem níveis elevados de

progesterona, diminuem as células secretoras no endométrio, aumentando o número de células ciliadas. Nesta fase, diminui o edema uterino, a cérvix apresenta-se fechada e com maior tonicidade e o muco cervical apresenta-se mais espesso, esbranquiçado e em menor quantidade. O desenvolvimento do corpo lúteo para o interior do parênquima ovárico impede a sua deteção por palpação transrectal, pelo que a ocorrência de ovulação apenas pode ser detetada por palpação nos primeiros 3 dias, em que se verifica a existência de uma pequena depressão onde antes estava o folículo ovulatório.

3.2. Sazonalidade reprodutiva

A sazonalidade reprodutiva na égua corresponde às mudanças fisiológicas e morfológicas que ocorrem, de acordo com a mudança no período de horas de luz (fotoperíodo) ao longo do ano. Como referido, a espécie equina é uma espécie poliéstrica sazonal, sendo que a época reprodutiva ocorre aquando do fotoperíodo crescente, i.e., quando os dias são mais longos. Desta forma, no hemisfério Norte a época reprodutiva ocorre, geralmente, entre abril e outubro, enquanto no hemisfério Sul decorre de outubro a março. Assim, a incidência da ovulação diminui de forma transitória durante o outono (período de transição invernal) e é mínima ou ausente no inverno (período anovulatório) ao mesmo tempo que, de forma inversa, aumenta de forma transitória um pouco antes da primavera (período de transição primaveril) e é máxima durante o verão.

Os mecanismos envolvidos na sazonalidade reprodutiva da égua estão relacionados com a atividade dos fotorreceptores de retina, que captam as mudanças de luz diária e enviam a informação à glândula pineal. Esta glândula atua como *pacemaker* circadiano, regulando a resposta hormonal necessária à atividade reprodutiva, através da produção de melatonina, durante o período de escuridão. A síntese de melatonina na primavera diminui, com o aumento da duração das horas de luz, e aumenta no outono com a diminuição das horas de maior luminosidade. Desta forma, a sua atuação está implicada numa cadeia de respostas que envolvem o hipotálamo, a produção de GnRH, FSH e LH, de tal maneira que, nos dias de menor fotoperíodo, o aumento da produção de melatonina induz a diminuição da produção de GnRH e LH (período anovulatório) e, por outro lado, nos dias de maior duração do fotoperíodo a produção de melatonina diminui, verificando-se o desenvolvimento da atividade folicular com aumento das hormonas GnRH, LH e estrogénios (período ovulatório).

Durante a estação de anestro, a égua não apresenta ovulações nem manifesta cio por um período superior a 21 dias. Os ovários apresentam folículos pequenos, com cerca de 10 a 15 mm de diâmetro, estando o conteúdo hipofisário de LH diminuído. As éguas apresentam-se indiferentes ou agressivas em relação ao garanhão.

Fatores como a latitude, condições ambientais (temperatura), nutrição, idade e raça influenciam também o padrão de sazonalidade reprodutiva, de tal forma que éguas com baixa condição corporal tendem a atrasar o início da época reprodutiva e éguas muito jovens ou mais velhas (a partir dos 15 anos de idade) tendem a diminuir a duração do período reprodutivo. Por outro lado, existem algumas éguas (cerca de 20 a 30%) que mantêm atividade reprodutiva ao longo do ano.

Além do anestro sazonal, correspondente ao período de dias curtos, outros fatores como a idade avançada da égua, gestação e lactação, condição corporal, retenção de tecido luteal, deficiência hormonal, presença de tumores ou corpo lúteo persistente idiopático podem levar à existência de anestro na égua.

Transição de primavera (inverno/primavera)

Do ponto de vista hormonal, com o aumento de horas de luz há uma resposta com diminuição da produção de melatonina pela glândula pineal, o que leva ao aumento da produção de GnRH pelo hipotálamo, e consequentemente ao aumento da produção de LH, estrogénios e inibina. Dá-se assim um aumento na estimulação da atividade ovárica e começam a surgir folículos de maior tamanho, mas que, no entanto, são anovulatórios. Os ovários ficam com uma imagem eco-gráfica típica da época de transição, com muitos folículos anovulatórios de tamanho considerável, sendo vulgarmente chamados de “cacho de uva” (figura 48). Surgem ondas foliculares maiores (anovulatórias) e menores. Os folículos são responsivos a FSH, podendo alcançar tamanhos de 20-30 milímetros, mas não ocorrendo, muitas vezes, diferenciação num folículo dominante. Antes que uma onda maior ovulatória aconteça, torna-se difícil diferenciar os folículos dominantes anovulatórios dos ovulatórios, uma vez que ambos alcançam velocidades de crescimento e tamanhos similares. A nível uterino, em resposta às mudanças hormonais, começam a surgir pequenas variações a nível de textura. O aumento dos estrogénios induz o comportamento de cio, que se prolonga por vários dias. Este período culmina com o aparecimento de uma onda maior ovulatória, como resultado do aumento de LH e estrogénios, permitindo a diferenciação de um folículo dominante (maior que 30 mm), e ocorrendo posteriormente a ovulação. A chave para o início da ocorrência de ovulações é o reinício da produção de RNA mensageiro para as sub-unidades de LH.



Figura 48: Imagem ecográfica do ovário em fase de transição onde se podem observar numerosos folículos de grande dimensão “cacho de uva”.

Época de transição invernal (outono/inverno)

Esta fase é bastante menos marcada do que a transição de primavera. A diminuição das horas de luz induz o aumento da produção de melatonina e consequente menor produção de GnRH pelo hipotálamo. A concentração de FSH praticamente não se altera, mas há uma diminuição progressiva de LH e também de estradiol, o que impossibilita a diferenciação do folículo dominante em pré-ovulatório e, consequentemente, a ovulação. Nesta fase, há também uma diminuição de ondas maiores anovulatórias (folículos com mais de 30 mm) e um aumento de ondas menores (folículos com menos de 30 mm de diâmetro) e os folículos resultantes começam a regredir gradualmente, tornando-se por vezes hemorrágicos, até que no inverno a atividade folicular é mínima ou inexistente, ocorrendo apenas ondas foliculares menores.

3.3. Exame reprodutivo da égua

Idealmente este exame deveria realizar-se a todas as éguas reprodutoras antes da época reprodutiva, mas, na maioria dos casos apenas se faz quando existem problemas, tal como se referiu para o caso do garanhão. Uma boa prática será, nas éguas que ficaram alfeiras do ano anterior, realizar-se o exame reprodutivo em outubro/novembro, o que permitirá fazer os tratamentos necessários e programar o manejo reprodutivo da égua atempadamente. Além das éguas problema (não gestantes na época anterior, não gestantes ao fim de 3 cobrições/inseminações, ou que apresentem sinais de doença reprodutiva), esta avaliação reprodutiva deve ser sempre parte integrante do exame em ato de compra de uma égua reprodutora e em todas as éguas com mais de 10 anos.

O exame da égua reprodutora inclui a história clínica, exame de estado geral, exame da genitália externa, vaginoscopia, palpação transrectal e ecografia e, sempre que necessário, citologia, microbiologia e biópsia.

História reprodutiva

Numa primeira abordagem deverá recolher-se, sempre que possível, toda a informação relativa à história reprodutiva da égua, isto é, a condição atual (se primípara, alfeira ou gestante), número de ciclos seguidos, número de poldros nascidos em anos anteriores, técnica reprodutiva utilizada, número de vezes coberta ou inseminada, data de parto, tipo de sémen utilizado (fresco, refrigerado ou congelado), número de garanhões, número de abortos, alterações assinaladas, exames laboratoriais realizados, etc.

Exame físico

Tal como para o garanhão, é importante a realização de um exame físico completo, incluindo a condição corporal, FC FR, TR, hidratação e auscultação torácica e abdominal (motilidade gastrointestinal) de forma a obter informação relativa ao estado geral da égua e identificar alguma doença que possa interferir na sua capacidade reprodutiva (figura 49).



Figura 49: Auscultação cardíaca.

Avaliação da genitália externa

No exame reprodutivo, a avaliação da genitália externa é imprescindível, devendo avaliar-se a conformação perineal e vulvar. Para tal, a égua deve ser contida no tronco para garantir condições de segurança e a cauda deve ser atada ou vendada e posteriormente elevada, para permitir melhor visualização (figura 50).

Uma correta conformação vulvar deverá englobar o bom encerramento dos lábios vulvares. Uma má coaptação vulvar está associada a maior risco de contaminação vaginal e uterina, na medida em que a vulva é a primeira barreira física de proteção. É frequente a existência de má coaptação vulvar em éguas mais velhas e com várias gestações (figura 51). A pressão digital na comissura vulvar é um bom indicador da existência de uma boa coaptação vulvar (figura 52).

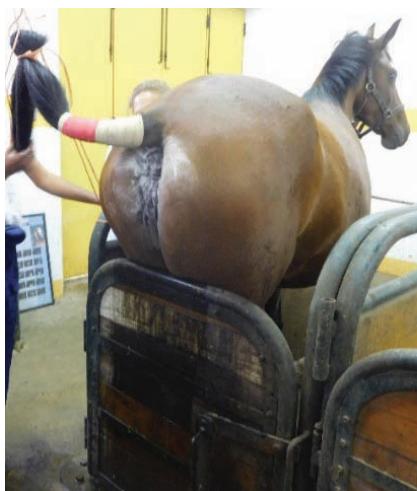
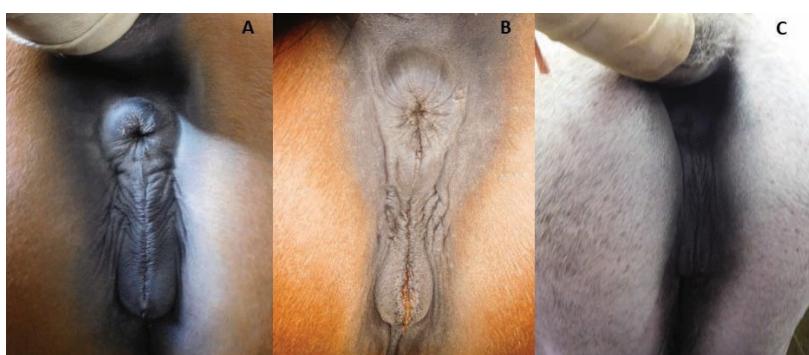


Figura 50: Contenção em tronco para exame ginecológico.



A: boa conformação B: Má coaptação vulvar C : mau índice de Caslick

Figura 51: Conformação vulvar e perineal.

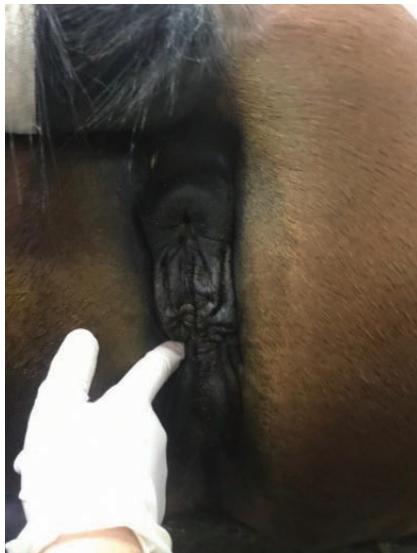
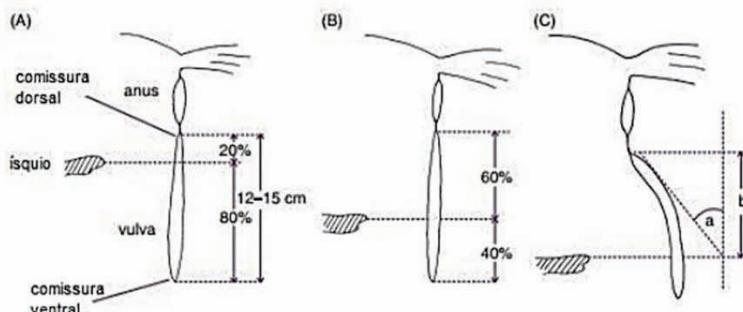


Figura 52: Avaliação da coaptação vulvar: pressão digital.

A conformação perineal pode ser classificada pelo índice de Caslick (IC = altura da vulva x ângulo de inclinação com a vertical), sendo que uma boa conformação requer que pelo menos 80% da abertura vulvar esteja situada abaixo do assoalho pélvico, com não mais que 4 cm acima deste e uma inclinação com a vertical de não mais que 10 graus (figura 53).

Uma má conformação perineal predispõe a um maior risco de infecção vaginal e uterina, uma vez que, permite uma maior passagem de ar, acumulação de urina ou entrada de material fecal para a vagina (figura 54). Pode também observar-se a existência de lacerações perineais, muitas vezes consequência de partos distócicos (figura 55).



A) tipo I boa conformação perineal: $IC < 50$, $b=2-3$ cm, $a<10-20^\circ$; B) tipo II reduzida conformação perineal: $IC > 50$, $b=6-7$, $a<10-20^\circ$; C) tipo III má conformação perineal: $IC > 150$, $b= 5-9$, $a \geq 30^\circ$

Figura 53: Índice de Caslick
https://sigarra.up.pt/icbas/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=597925



Figura 54: Má conformação perineal e má coaptação vulvar predispondo para contaminação uterina aquando da palpação transretal.



Figura 55: Laceração perineal.

Exame vaginal

Tanto no caso da palpação vaginal como no exame com espéculo vaginal, a égua deverá ser devidamente contida e a cauda deverá ser atada para evitar contaminação e facilitar o procedimento. Após retirar as fezes da ampola retal, a zona perineal/vulvar deverá ser lavada, usualmente com uma solução de pH neutro, começando da zona central para a periferia, sendo que a mão que vai ao balde com o antisséptico não toca na região perineal da égua, de modo a não conspurcar a solução de limpeza. Em seguida, para manter a região limpa, esta deve ser seca com compressas estéreis. De modo a minimizar a contaminação vaginal com o antisséptico ou detritos, pode utilizar-se uma compressa ou penso dentro da comissura vulvar (figura 56).



Figura 56: Colocação de penso dentro da comissura vulvar para minimizar a conspurcação interna aquando da lavagem.

Inspeção vaginal com espéculo

Existem vários tipos de espéculo vaginal, alguns dos quais podem ser reutilizados, desde que seja possível a sua esterilização. Outros são descartáveis (figura 57).



Figura 57: Exemplos de espéculos vaginais.

Após a preparação da égua, o espéculo vaginal pode ser introduzido gentilmente com a ajuda de gel lubrificante estéril, no sentido ventrodorsal, colocando-se de seguida uma fonte de luz (figura 58).



Figura 58: Inserção e observação com espéculo vaginal.

Uma vez introduzido o espéculo, pode observar-se toda a vagina e a porção externa da cérvix, verificando-se se existe alguma anormalidade como hímen persistente, vaginite, cervicite, varicose vaginal, lacerações vaginais e cervicais e a presença de urina, exsudado ou sangue no assoalho vaginal (figura 59). A visualização de conteúdo espumoso é indicadora de pneumovagina.

O exame com o vaginoscópio deve ser interpretado e avaliado conforme a fase do ciclo éstrico em que se realiza. Durante o diestro a cérvix apresenta-se seca, com uma mucosa pálida, fechada e em posição dorsal na cavidade vaginal, enquanto que, durante o estro se apresenta edematosas, com a mucosa hiperémica, relaxada e caída no assoalho vaginal. Deve ter-se em consideração que a realização de vaginoscopia repetidas, especialmente em éguas velhas e em diestro, aumenta o risco de infecção uterina.



Figura 59: Observação de corrimento purulento aquando da colocação do espéculo vaginal em égua com metrite contagiosa equina.

Palpação vaginal

Deve ser feita com luva e lubrificante estéril. Permite avaliar a dilatação e relaxamento da cérvix e viscosidade do muco cervical. Em diestro a égua apresenta muco mais esbranquiçado e espesso (figura 60) e a cérvix está tónica e fechada, enquanto durante o cio o muco apresenta-se mais fluido e a cérvix relaxada e aberta, geralmente caída no assoalho vaginal. Este procedimento permite também identificar hímen persistente e a presença de pequenas lacerções na mucosa vaginal. Muitas vezes faz-se apenas quando da realização de recolha de amostras ou durante a inseminação artificial. A falha na dilatação cervical, que ocorre muitas vezes em éguas mais velhas, é fator predisponente para a ocorrência de endometrite pós-cobrição.



Figura 60: Palpação vaginal: muco esbranquiçado característico de diestro.

Palpação transrectal

Este procedimento permite a avaliação dos órgãos reprodutivos internos da égua por palpação. Deve ser feita de forma sistemática, sentindo a cérvix, útero e ovários. Desta forma, pode avaliar-se a tonicidade do útero e cérvix, textura e tamanho dos ovários, sinais de gestação ou fluido intrauterino.

Para proceder à palpação a égua deverá estar devidamente contida (figura 61), e deve utilizar-se uma luva de palpação, aplicando previamente gel lubrificante. As fezes devem ser retiradas da ampola rectal de forma cuidadosa de modo a evitar alguma lacerção. Uma vez introduzida a mão no reto da égua, deverá identificar-se a cérvix e avaliar a sua tonicidade, sendo que durante o cio a cérvix encontra-se relaxada e por isso pode ser mais difícil de palpar. Prosseguindo cranialmente, deverá identificar-se o corpo e cornos uterinos, seguindo depois a palpação de ambos os cornos uterinos, avaliando-se a consistência, tamanho e tonicidade. Durante o estro o útero poderá apresentar uma consistência mais “pastosa”, devido à presença de edema uterino, induzido pelo aumento de estrogénios. Na fase de diestro, uma vez que há aumento da progesterona, a tonicidade do útero, e em particular da cérvix, aumenta.

Os ovários da égua geralmente encontram-se no final do prolongamento do corno uterino correspondente, sendo que o ovário direito poderá encontrar-se ligeiramente mais cranial e dorsal que o esquerdo. Os ovários podem apresentar tamanhos variáveis dependendo da própria égua e também da fase reprodutiva em que se encontra, podendo alcançar tamanhos comparáveis a uma bola de golfe ou de ténis. A presença de ovários maiores pode sugerir alguma anormalidade, como por exemplo hematomas ou tumores.

Perto da ovulação, o folículo pré-ovulatório fica “mole” e a égua por vezes manifesta dor à sua palpação. Após a ovulação, que ocorre na fossa de ovulação, a cavidade folicular é preenchida com sangue e um corpo hemorrágico é formado em 6-12 horas, podendo permanecer até 3 dias e sendo possível de detetar à palpação, como uma pequena depressão no lugar do folículo dominante. Após este período, o corpo hemorrágico dá lugar ao corpo lúteo maduro e deixa de ser perceptível à palpação.



Figura 61: Palpação transretal.

Avaliação ecográfica

É realizada através de palpação transrectal, utilizando uma sonda linear transrectal (figura 62). Para iniciar o exame ecográfico devem aplicar-se os mesmos cuidados referidos para a palpação transrectal, e as fezes devem ser retiradas da ampola rectal. A sonda deve ser lubrificada com gel de palpação e deve manter contacto com as paredes do reto. A avaliação ecográfica deve realizar-se de forma sistemática, começando pela cérvix, seguindo o corpo uterino até a bifurcação, corno uterino e ovário direito, recuando novamente até a bifurcação e repetindo

o mesmo procedimento para o corno uterino esquerdo e ovário esquerdo (figura 63). A sonda deverá ser movida lentamente, garantindo que a imagem que pretendemos obter está centrada no monitor. Uma vez obtidas imagens de todo o trato reprodutivo, a sonda deve recuar-se novamente pelo corpo uterino e cérvix até ser retirada do reto, permitindo uma segunda visualização de todo o trato reprodutivo. Para a visualização dos cornos uterinos a sonda transrectal deve ser colocada de forma a obter um corte ou plano transverso, enquanto que o corpo uterino e a cérvix devem ser avaliados através da colocação da sonda longitudinalmente (figura 63).

Ao exame ecográfico os ovários podem ser facilmente identificados, sendo que o estroma ovárico se apresenta uniformemente ecogénico (coloração esbranquiçada) enquanto que os folículos, quando presentes, apresentam uma imagem ecográfica anecoica (preta) (figura 64). O corpo lúteo pode ser por vezes difícil de distinguir, pois pode adotar diferentes graus de ecogenicidade.



Figura 62: Ecógrafo e sonda linear transretal.

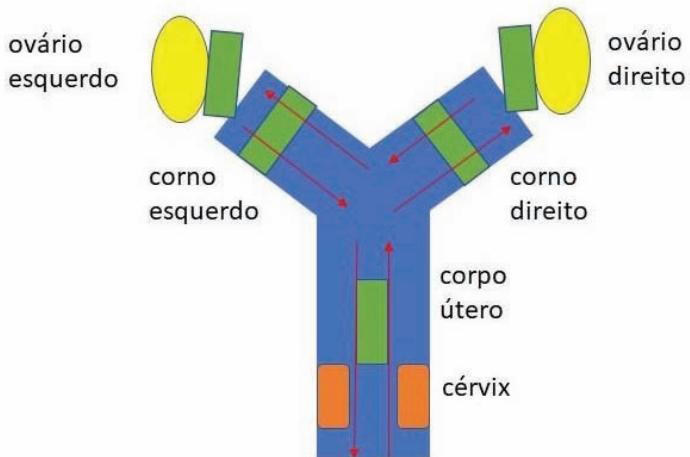


Figura 63: Exame ecográfico do trato genital da égua: colocação da sonda (verde).

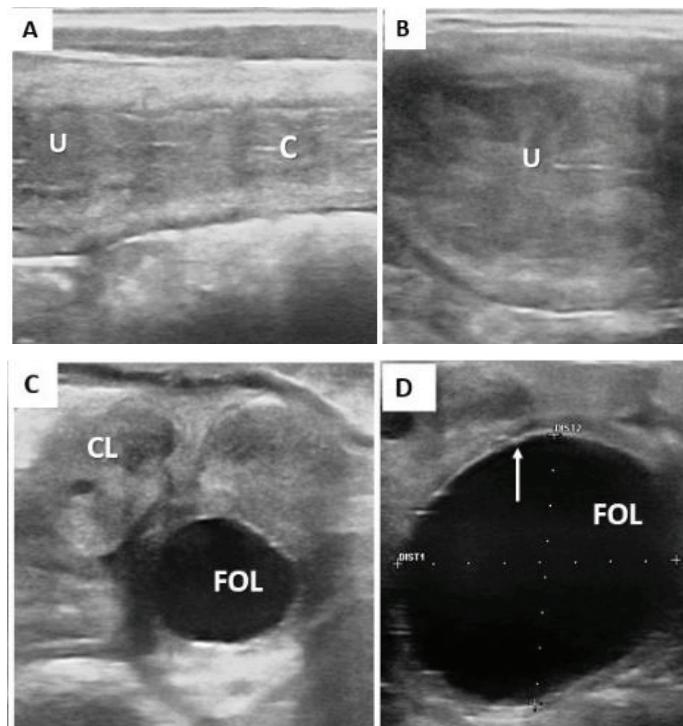


Figura 64: Exame ecográfico **A:** útero (U) e cérvix (C) em corte longitudinal; **B:** útero (U) em corte transversal; **C:** ovário com corpo lúteo (CL) e folículo (FOL); **D:** folículo pré-ovulatório; a seta indica espessamento da parede folicular.

Na estação de anestro os ovários apresentam-se pequenos e sem sinais de atividade, sendo que no período de transição se caracterizam por uma imagem ecográfica de múltiplos folículos de diferentes tamanhos, sem presença de corpo lúteo (figura 65).

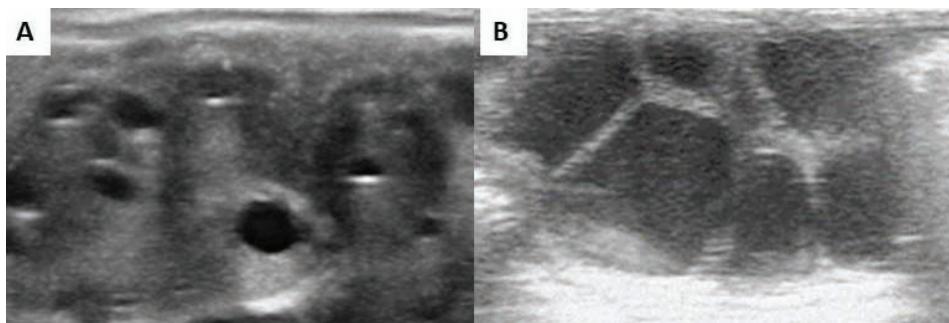


Figura 65: Imagem ecográfica **A**: ovário inativo; **B**: ovário em transição com vários folículos em desenvolvimento.

Além de permitir identificar a fase do ciclo éstrico em que a égua se encontra, o exame ecográfico do sistema reprodutor permite ainda avaliar o crescimento folicular e proximidade da ovulação, os diferentes graus de edema uterino e a existência de fluido intrauterino, bem como diferentes alterações tais como quistos uterinos, folículos anovulatórios, hematoma ovárico ou tumores ováricos. O exame ecográfico é fundamental para a implementação de um programa de inseminação artificial, mas pode também ser utilizada para o controlo reprodutivo e cobrição dirigida, permitindo reduzir o número de saltos do garanhão por ciclo.

Apesar do controlo ecográfico não substituir a palpação transretal na predição da proximidade da ovulação, é muitas vezes utilizado na prática clínica como um método auxiliar. Na avaliação ecográfica, para predição do momento de ovulação, observa-se o crescimento folicular e forma do folículo, mas também o grau de edema uterino. O folículo pré-ovulatório tem um diâmetro muito variável entre os 35-50 mm, dependendo da fase da época reprodutiva em que se observa. No início e final da época reprodutiva os folículos tendem a ovular com diâmetros maiores enquanto que no pico da estação (maio, junho) muitas éguas ovulam com diâmetros foliculares muito menores. Normalmente, nas 24 horas que antecedem a ovulação, o folículo pré-ovulatório tende a adotar uma forma mais cónica e a parede apresenta-se mais espessa e, muitas vezes, como uma dupla parede. No que concerne a avaliação do útero, durante o cio a existência de um folículo dominante e a produção elevada de estrogénios, leva ao desenvolvimento de diferentes graus de edema uterino (figuras 66 e 67). Um útero com edema de grau 1 corresponde a um ligeiro edema e, ecograficamente, as pregas

endometriais podem visualizar-se num padrão em “roda de carro” e é comum no início do estro e nos períodos pré e pós ovulação. Num útero com edema de grau 2 observa-se um edema moderado, onde há aumento na espessura das pregas endometriais e geralmente corresponde com o pico de estrogénios que antecede em 1 a 2 dias a ovulação. No grau 3 o edema é bastante acentuado e as pregas endometriais podem visualizar-se bastante distendidas.

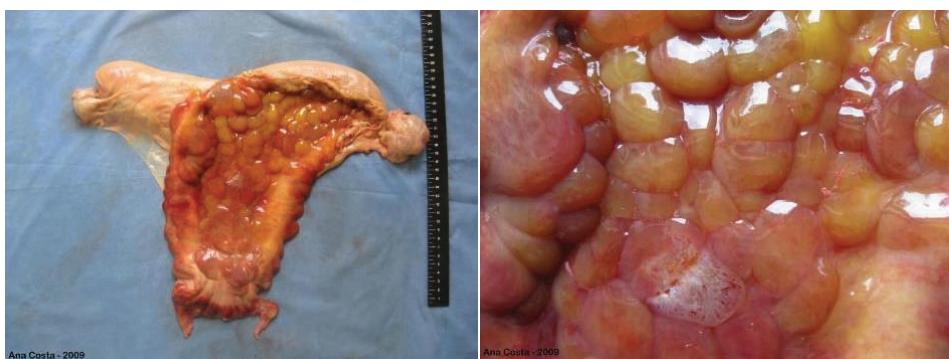


Figura 66: Aspetto interior do útero de égua em cio onde se pode observar o edema do endométrio associado ao estro (foto de Ana Costa).

Após a ovulação forma-se um corpo hemorrágico, o qual tem uma aparência mais heterogénea e maior ecogenecidade, devido ao facto de o fluido presente no interior do folículo ser libertado, dando início ao desenvolvimento do corpo lúteo. Na presença de um corpo lúteo, sob influência da progesterona, o útero apresenta-se sem edema, correspondendo a um útero de grau zero, onde não há diferenciação das pregas endometriais (figura 68).

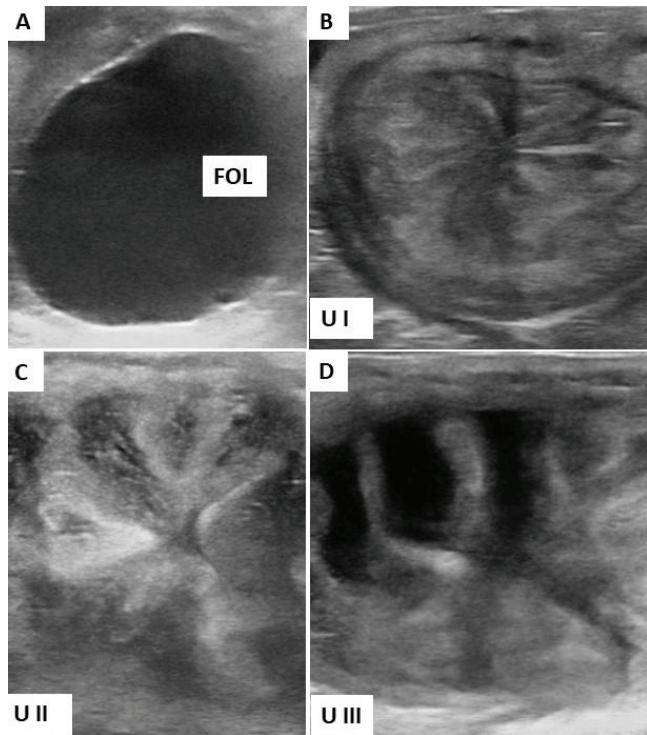


Figura 67: Imagem ecográfica de **A**: folículo pré ovulatório (FOL); **B**: útero edema grau I (UI); **C**: útero edema grau 2 (UII), **C**: útero edema grau 3 (UIII).

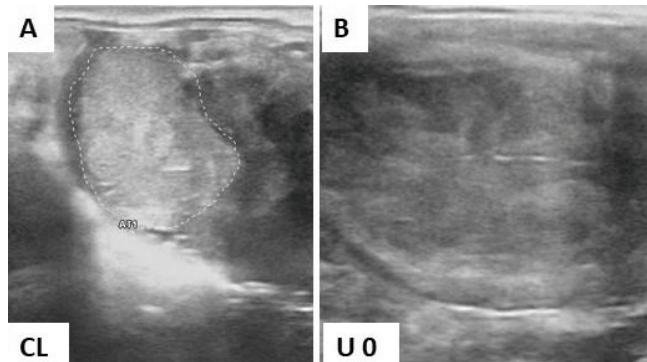


Figura 68: Ecografia reprodutiva em diestro **A**: ovário com corpo lúteo (CL); **B**: útero com edema de grau zero (U0).

Como referido anteriormente, aquando do exame ecográfico, podem observar-se diferentes alterações quer ao nível dos ovários (figura 69) quer a nível uterino (figura 70). A avaliação das mesmas depende de vários fatores, como história reprodutiva e idade da égua, tipo e evolução das alterações encontradas, etc., mas o significado clínico destas alterações está fora do âmbito deste manual.

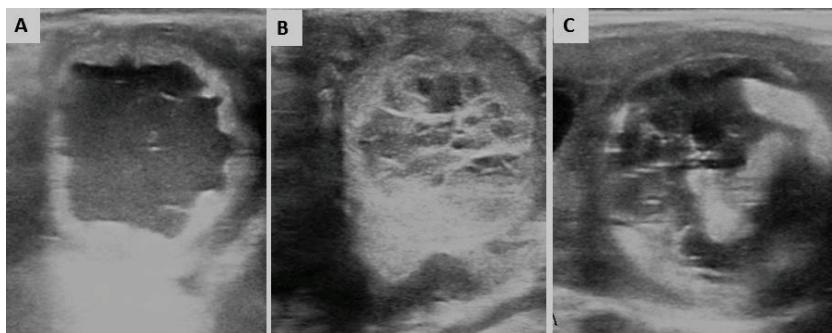


Figura 69: Alterações ecográficas a nível ovárico: **A:** Corpo lúteo atípico; **B:** Folículo hemorrágico anovulatório; **C:** Hematoma ovárico.

A presença de líquido uterino, aquando do exame ecográfico, é frequentemente encontrada após a inseminação, sendo associada a endometrite pós-cobração, e deve ser interpretada tendo em conta o volume de líquido e a sua ecogenicidade (figuras 70 e 71). Existem escalas de classificação que permitem classificar quer o volume quer a ecogenecidade, correlacionando a ecogenecidade com o aspecto macroscópico do líquido após a recolha, tal como se encontra resumido nas tabelas 1 e 2 (adaptadas de McCue, 2014b).

A aplicação de *doppler* tem várias utilidades nomeadamente no exame ecográfico em diestro, pois permite avaliar a vascularização de corpo lúteo (figura 72) e, consequentemente, a sua viabilidade, mas também por permitir predizer o momento da ovulação, considerando o aumento da vascularização do folículo pré-ovulatório.



Figura 70: Alterações ecográficas encontradas no útero **A:** Linhas hiperecogénicas compatíveis com fibrose uterina (setas); **B:** Quisto endometrial (Q); **C:** Fluido intrauterino (F).

Tabela 1

Classificação do aspeto ecogénico do fluido uterino (adaptada de McCue, 2014b)

Aspetto ecográfico/aspetto macroscópico	Grau
Anecogénico (negro) / líquido límpido	IV
Algumas partículas ecogénicas (acinzentado escuro) / turvo com sedimento	III
Moderadamente ecogénico (cinzento claro) / leitoso	II
Altamente ecogénico (branco) / espesso e cremoso	I

Tabela 2

Classificação do volume do fluido uterino (adaptada de McCue, 2014b)

Classificação	Grau
Sem fluido	0
Vestigial (<1 cm de diâmetro)	1
Pequeno volume (1-2 cm de diâmetro)	2
Volume moderado (2,1-5 cm de diâmetro)	3
Grande volume (>5 cm de diâmetro)	4

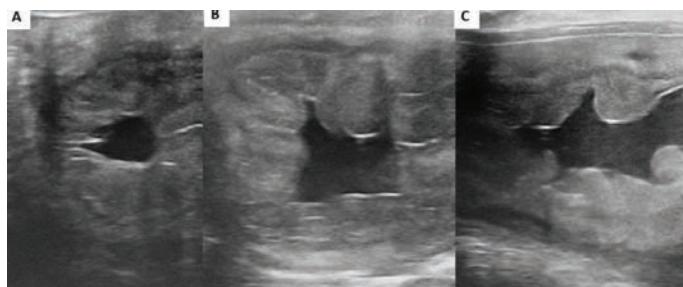


Figura 71: Imagem ecográfica de fluido intrauterino. **A:** volume 1 ecogenecidade I; **B:** Volume 2 Ecogenecidade III; **C:** volume 3 ecogenecidade III.

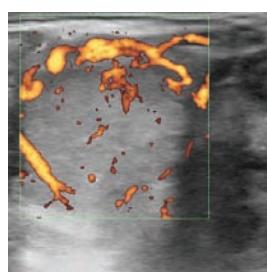


Figura 72: Vascularização do corpo lúteo avaliada por power doppler.

3.4. Metodologias complementares de diagnóstico

Cultura microbiológica e teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA): útero e clitóris

Útero

A recolha de amostras para microbiologia uterina deve ser feita no início do estro. É essencial no exame da égua reprodutora, sobretudo quando existem problemas de fertilidade ou sinais clínicos de endometrite. Deve, no entanto, ter-se atenção ao modo como se obtém e interpreta a amostra, devendo, idealmente, ser sempre associada à realização de citologia uterina e, se for o caso, aos sinais clínicos, em particular os registos do exame ecográfico do útero. A realização de cultura microbiológica associada a citologia permite distinguir a existência de contaminação e infecção e perceber, não só o microrganismo envolvido, mas o grau de inflamação associado. A existência de cultura positiva sem sinais de inflamação está muitas vezes associada a contaminação da amostra e deve ser interpretada com precaução.

Na obtenção da amostra deve ter-se cuidado com a assepsia da região perineal e utilizar-se sempre compressas estéreis na sua preparação. A recolha de amostras pode ser feita por zaragatoa própria, com dupla bainha para evitar a contaminação (figura 73), através do fragmento de biópsia (figura 74) ou através de lavagens uterinas com pequeno volume (figura 75). Devem utilizar-se luvas esterilizadas para guiar a passagem da zaragatoa pela cérvix ou pode utilizar-se o vaginoscópio, com fonte de luz, de modo a permitir identificar o orifício cervical externo. A zaragatoa deve permanecer pelo menos 20 segundos em contacto com o endométrio. Caso a mesma zaragatoa seja utilizada para obtenção de amostra para cultura e citologia a amostra para cultura deve ser a primeira a ser processada, devendo a cultura ser feita em ambiente controlado.



Figura 73: Recolha de amostras para microbiologia: técnica e zaragatoa.



Figura 74: Cultura microbiológica feita a partir de fragmento de biópsia: deve ser sempre feita em ambiente controlado.

Quando se utiliza a biópsia, a cultura deve ser feita em primeiro lugar, sendo o fragmento de biópsia utilizado para a inoculação no meio de cultura.

Para realização de lavagens com pequeno volume (60ml), após preparação da zona perineal, a sonda de lavagem uterina é introduzida como descrito para introdução da sonda de recolha de amostras, através de palpação vaginal. Idealmente deve utilizar-se sonda de lavagem com *cuff* de modo a minimizar a contaminação da amostra. A amostra é de seguida recolhida por gravidade, sendo algumas vezes necessário administrar ocitocina no final da lavagem para melhor fazer a recolha (figura 75). De modo geral, a amostra é depois dividida em duas e, após centrifugação, uma das partes é utilizada para cultura microbiológica e a outra para citologia. Apesar da lavagem com pequenos volumes implicar mais tempo do que a zaragatão, alguns autores descrevem ter uma melhor correlação com os resultados de citologia.



Figura 75: Lavagem uterina com pequeno volume.

Para envio da amostra para o laboratório a mesma pode ser enviada na parte final da zara-gatoa, em tubo estéril ou no frasco da amostra (figura 76). O envio sem meio de cultura obriga a que a amostra seja expedida em menos de 24 horas. O meio de cultura mais utilizado para o transporte é o meio *Stuart's*. Alguns médicos-veterinário optam por fazer a cultura eles próprios, sendo o meio mais utilizado o agar sangue ou *MacConkey's*.

Os principais agentes infeciosos encontrados na cultura microbiológica incluem **aeróbios** (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (cápsula 1, 2 e 5), *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), **microaerofílico** (*Taylorella equigenitalis*), anaeróbios e **fungos** (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.*).

Os resultados devem ser sempre interpretados com precaução, sendo que a existência de crescimento intenso nas primeiras 24-48 horas ou o crescimento exuberante de uma só espécie são mais significativos. Como já referido, o resultado deve ser sempre interpretado associado à citologia e sinais clínicos, se existentes.

Aquando da realização de teste de sensibilidade aos antibióticos são frequentemente incluídos antibióticos como ampicilina, penicilina, gentamicina, polimixina B e cefalosporinas.



Figura 76: Envio de amostras para cultura microbiológica sem meio de cultura.

Clitóris

A recolha de amostras para microbiologia a partir do clitóris é utilizada sobretudo para pesquisa de doenças venéreas, nomeadamente *Taylorella equigenitalis*. Deve ser feita sem qualquer antisepsia prévia e pode ser feita em qualquer fase do ciclo éstrico (figura 77). Para envio destas amostras para o laboratório deve utilizar-se um meio específico (meio de *Amies* ou carvão ativado).

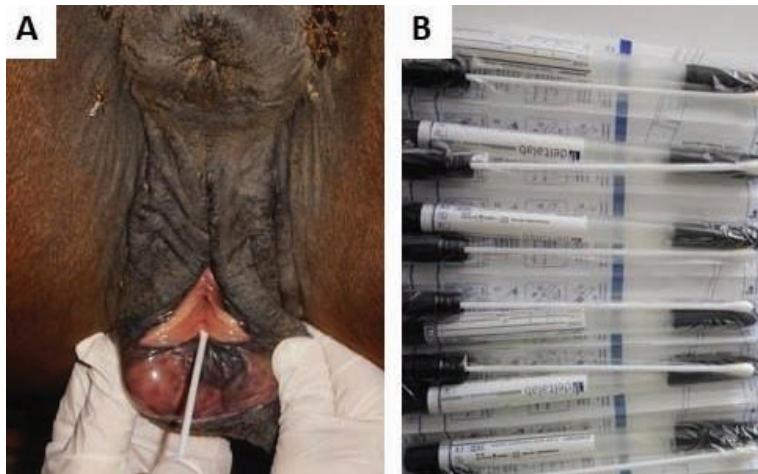


Figura 77: A: Recolha de amostra do clitóris; B: Zaragatoa com meio de Amies.

Citologia

A amostra deve, idealmente, ser obtida na fase correspondente ao meio do estro. O exame citológico permite caracterizar/identificar situações de inflamação (aguda, subaguda) bem como infecção por fungos e leveduras. A presença de bactérias fagocitadas nas células inflamatórias é por si só um indicador de infecção.

As amostras podem ser obtidas utilizando os mesmos métodos referidos na amostragem para microbiologia. Além da zaragatoa tradicional pode utilizar-se uma zaragatoa em escova (*citobrush*) a qual para alguns autores permite obter uma amostra mais representativa. Deve realizar-se o esfregaço o mais rapidamente possível e o mesmo deve ser seco ao ar e corado com coloração do tipo *Giemsa*. É extremamente importante a indicação da fase do ciclo éstrico em que se obteve a amostra, de modo a permitir uma correta interpretação da citologia, já que a presença de células inflamatórias é fisiológica nas 12-48 h pós-cobrição/inseminação.

Os esfregaços de endométrio contemplam vários tipos celulares, nomeadamente células do epitélio superficial do endométrio, células inflamatórias, incluindo polimorfonucleares neutrófilos (PMN), macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares eosinófilos, eritrócitos, muco, fragmentos e detritos celulares e células de descamação da cervix e vagina.

Os parâmetros avaliados para diagnóstico de inflamação do endométrio (endometrite), são os que se descrevem em seguida.

Presença de PMN

Vários autores têm sugerido diferentes métodos para avaliação/interpretação deste número, não havendo ainda uma standardização ou *guidelines* sobre esta quantificação. Por outro lado, vários autores sugerem também que estes métodos de quantificação devem ser diferentes, em função da técnica utilizada para a obtenção da amostra (zaragatoa, *citobrush* ou lavagem uterina de baixo volume).

A equipa da Universidade de Évora, seguindo a recomendação de vários autores, considera a observação com objetiva de imersão (ampliação de 1000x) e a observação no mínimo de 100 células, avaliando-se a % de PMN em relação ao número de células do epitélio uterino. Considera-se assim: <5% PMN: **ausência de inflamação** (figura 78); 5-15% PMN: **inflamação ligeira** (figura 79); 15-30% PMN: **inflamação moderada** (figura 80) e >30% PMN: **inflamação severa** (figura 81).

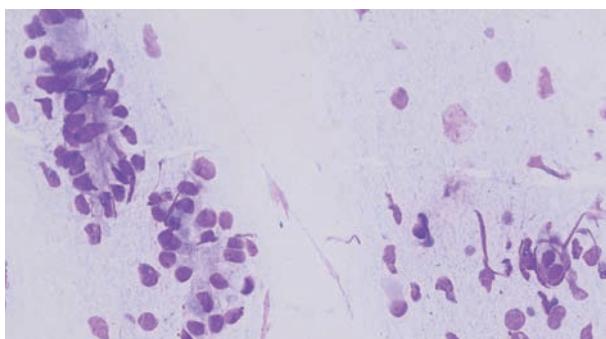


Figura 78: Citologia obtida a partir de zaragatoa uterina de égua onde se podem observar aglomerados de células uterinas, ausência de neutrófilos ($N < 5\%$) e raros detritos celulares ($< 25\%$): ausência de inflamação (ampliação 400x coloração Giemsa).

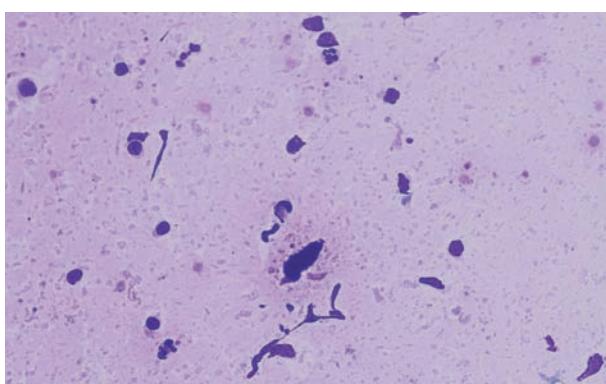


Figura 79: Citologia obtida a partir de zaragatoa uterina: células do endométrio dispersas, raros detritos celulares ($< 25\%$, grau 1) e presença de ligeira quantidade de neutrófilos (5-15%) inflamação ligeira (ampliação 400x coloração Giemsa).

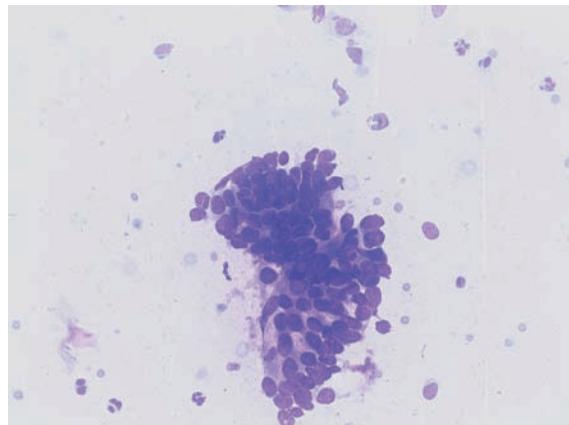


Figura 80: Citologia de zaragatoa uterina de égua: aglomerado de células do endométrio, raros detritos celulares (<25%, grau 1) e presença de quantidade moderada de neutrófilos (15-30%); inflamação moderada (ampliação 400x coloração Giemsa).

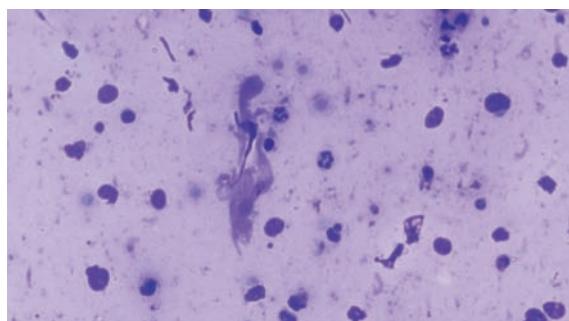


Figura 81: Citologia de zaragatoa uterina de égua: células do endométrio dispersas, elevada quantidade de neutrófilos ($>30\%$) e presença de células inflamatórias mononucleadas – inflamação severa (ampliação 400x coloração Giemsa).

A presença de outras células inflamatórias, que não PMN, é sugestiva de inflamação crónica, e a presença de eosinófilos é, para alguns autores, sugestiva de pneumovagina, urovagina e infecções por fungos. A presença de >5% de PMN nas 48 - 96h após ovulação requer sempre uma avaliação cuidada dos parâmetros citológicos, avaliação clínica e da cultura bacteriana realizada a partir da amostra obtida para exame citológico.

Presença de bactérias

(fazendo referência à presença das mesmas no citoplasma das células inflamatórias fagocitárias (figura 82). Considera-se a existência de 5 graus de afecção - **grau 1**: ausência de bactérias em 30 campos; **grau 2**: 1 bactéria em 30 campos; **grau 3**: 1 bactéria em 10 campos; **grau 4**: 2-10 bactérias por campo; **grau 5**: 11-50 bactérias por campo.

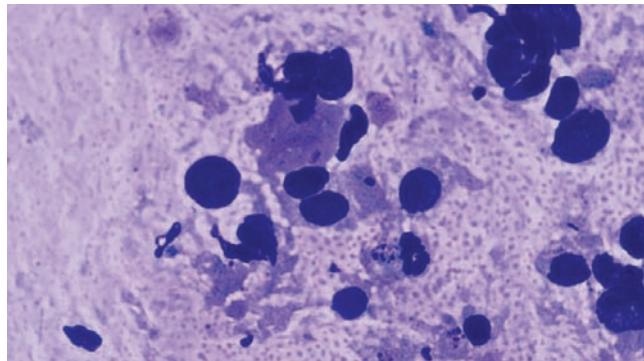


Figura 82: Citologia de zaragatoa uterina de égua onde se podem observar formas bacterianas fago-citadas no citoplasma dos neutrófilos (ampliação 1000x coloração Giemsa).

Presença de fungos e leveduras

(mesmo sistema de classificação utilizado para bactérias)

Presença de detritos celulares/fragmentos celulares/muco: a classificação baseia-se na % presente em um campo de ampliação de 1000x - **grau 1:** <25%; **grau 2:** <50%; **grau 3:** <75%; **grau 4:** >75%.

A presença de detritos celulares de score 3 ou 4 é sugestiva de endometrite, possivelmente de etiologia bacteriana.

Biópsia do endométrio

A realização de uma biópsia uterina permite de modo muito preciso avaliar o real estado do endométrio bem como obter amostras para microbiologia e citologia. É essencial para avaliação da existência de endometrite crônica. Com raras exceções, uma amostra é suficiente para avaliação das lesões do endométrio. É necessário informar o patologista sobre a fase do ciclo éstrico em que se encontra a fêmea, já que existem variações histológicas no endométrio de acordo com a fase do ciclo éstrico, sendo que, idealmente, a biópsia deve ser feita em diestro.

Após a preparação da zona perineal como indicado previamente, a pinça de biópsia, fechada, é passada pela cérvix, sendo de seguida efetuada palpação transrectal com o objetivo de localizar a pinça de biópsia no corpo uterino. A biópsia é geralmente recolhida num dos cornos uterinos, perto da bifurcação, sendo que, através de palpação rectal se empurra a parede do útero para a pinça aberta. Depois de fechada, a pinça é retirada (figura 83).

O fragmento colhido é fixado em formol a 10% e enviado para laboratório de Anatomia Patológica Veterinária. Antes de se fixar pode ser utilizado para obtenção de amostra para microbiologia e citologia, sendo que para microbiologia o fragmento tem de ser retirado em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar).



Figura 83: Técnica de recolha de biópsia em égua.

Após processamento e corte histológico os fragmentos são classificados em quatro graus diferentes (Kenney & Doig, 1986), utilizando como critérios:

- a) Edema da mucosa;
- b) Presença de PMN: avalia-se a presença destas células na mucosa (a sua presença na fase de diestro é sempre indicativa de inflamação aguda). Não existem *guidelines* indicativas do método para quantificar estas células, e vários autores consideram um número diferente de PMN por campo de elevada ampliação (400x) como indicativo de inflamação aguda, podendo variar entre 1 a 3 PMN por cada 5 campos de 400x;
- c) Morfologia glandular: atrofia, dilatação quística e necrose e tipo de células;
- d) Fibrose: número de camadas de tecido conjuntivo fibroso periglandular - 1 a 2 camadas: ligeira; 3 a 5: moderada; >5: severa;
- e) Dilatação dos vasos linfáticos da mucosa;
- f) Presença de outras células inflamatórias: macrófagos, linfócitos e plasmócitos (inflamação crónica).

A partir desta avaliação estabelece-se a classificação nos quatro graus seguintes (Kenney & Doig, 1986), os quais se correlacionam com a probabilidade de a égua parir um poldro viável.

Grau I: Endométrio praticamente normal: por vezes ligeiro edema, muito raras células inflamatórias, sem alterações glandulares, sem fibrose periglandular ou dilatação linfática. Com 80-90% de probabilidade de nascimento de poldro viável (figura 84).

Grau II A: Edema ligeiro, inflamação ligeira a moderada com presença de células inflamatórias dispersas na mucosa, ligeira a moderada atrofia glandular, presença de ligeira dilatação linfática e fibrose ligeira. Com 50-80% de probabilidade de nascimento de poldro viável (figura 85).

Grau II B: Edema (pode ser evidente), inflamação moderada a severa com presença difusa de células inflamatórias na mucosa, dilatação quística glandular, presença de moderada a severa dilatação linfática e fibrose moderada. Com 10-50% de probabilidade de nascimento de poldro viável (figura 86).

Grau III: Edema evidente ou não presente (inflamação crônica), inflamação severa bem evidente e difusa, alterações degenerativas ou necróticas das glândulas, dilatação linfática severa, fibrose periglandular severa. Com < 10% de probabilidade de nascimento de poldro viável (figura 87).

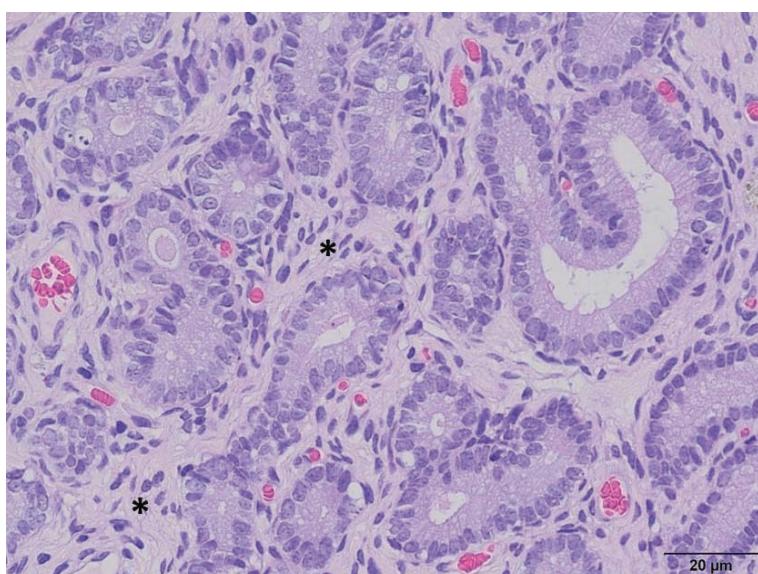


Figura 84: Imagem histológica de biópsia de útero: sem alterações glandulares significativas; 1 a 2 camadas de tecido conjuntivo fibroso periglandular (*). Grau I na classificação de Kenney & Doig (1986). Coloração de hematoxilina eosina.

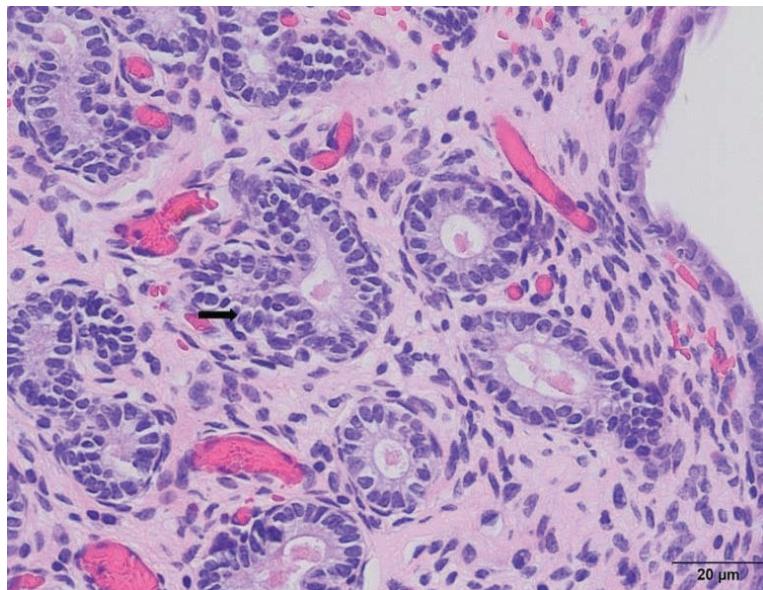


Figura 85: Imagem histológica de biópsia de útero: ligeira reação inflamatória; discreta atrofia glandular (seta); 3 a 5 camadas de tecido conjuntivo fibroso periglandular Grau II A na classificação de Kenney & Doig (1986). Coloração de hematoxilina eosina.

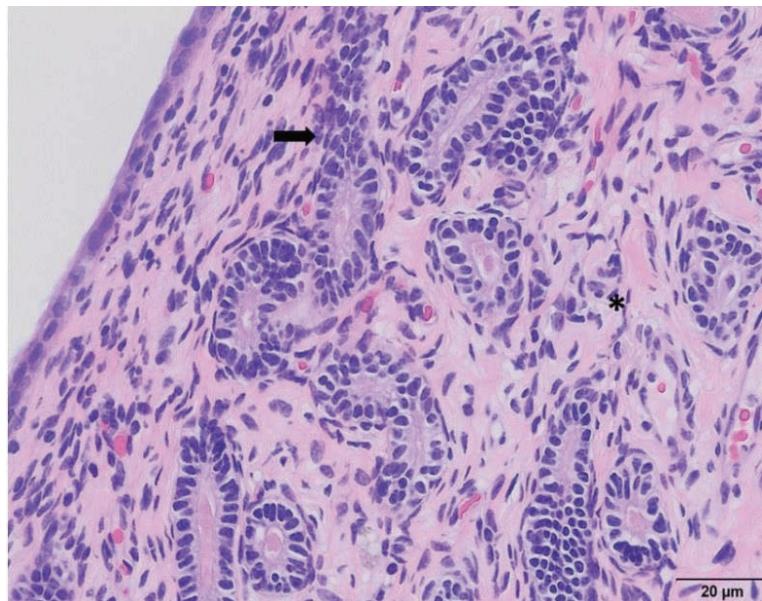


Figura 86: Imagem histológica de biópsia de útero: moderada a marcada reação inflamatória; atrofia glandular (seta), 3 a 5 camadas de tecido conjuntivo fibroso periglandular (*). Grau II B na classificação de Kenney & Doig (1986). Coloração de hematoxilina eosina.

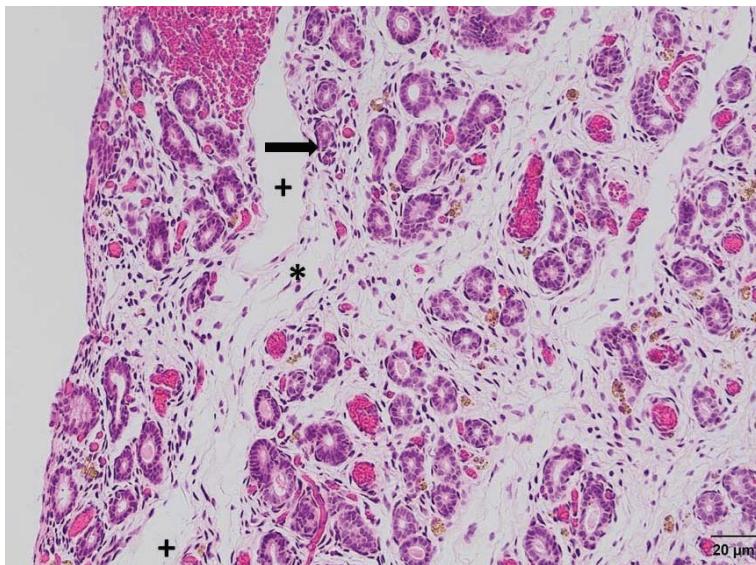


Figura 87: Imagem histológica de biópsia de útero: marcada reação inflamatória e dilatação vasos linfáticos: lacunas linfáticas (+); atrofia glandular (seta), > 5 camadas de tecido conjuntivo fibroso periglandular (*). Grau III na classificação de Kenney & Doig (1986). Coloração de hematoxilina eosina.

3.5. Gestação precoce na égua: diagnóstico de gestação

Após deposição dos espermatozoides no útero da égua, o transporte dos mesmos no trato genital da égua ocorre, numa primeira fase, de modo rápido até ao oviduto, seguido de uma fase mais lenta até ao local de fertilização, na região da ampola, com um pico da concentração de espermatozoides cerca de 4 horas após inseminação. As pregas endometriais longitudinais da junção útero-tubária, edemaciadas durante o cio, poderão funcionar como reservatório de espermatozoides na égua, e é também na junção útero-tubária que ocorre a capacitação e seleção de espermatozoides.

Após a ovulação, em metáfase II, se o ovócito não for fertilizado fica retido na junção ampola-istmo, onde degenera lentamente. Se, pelo contrário, ocorrer a fertilização, na mesma região ampola-istmo, o embrião continua o seu desenvolvimento, com a primeira clivagem cerca de 24 horas depois da fertilização, ocorrendo as divisões subsequentes em intervalos de 12 a 24 horas. O embrião em desenvolvimento passa através da junção útero-tubária e entra no útero 144 a 168 horas após a ovulação. Este fenômeno deve-se à produção de prostaglandina E2 pelo embrião fertilizado (mas não pelo ovócito), por volta do dia 5, quando atinge o estádio de mórula compacta. O relaxamento do músculo liso circular das paredes do oviduto, permite a progressão do embrião com o auxílio dos movimentos ciliares rítmicos, o qual entra no útero cerca de 24 horas depois.

O embrião da égua chega ao útero na forma de jovem blastocisto, 5,5 a 6 dias após a ovulação. A cápsula glicoproteica que reveste o embrião começa a formar-se por volta do dia 6 a 6,5. O *conceptus* (embrião + anexos embrionários) apresenta nesta fase apenas uma membrana embrionária, a ectoderme (trofoblasto). Por volta do 12.^º dia desenvolve-se a endoderme, que envolve a cavidade blastocélica que se transforma em saco vitelino e, por volta do dia 14, desenvolve-se a mesoderme.

A cápsula glicoproteica presente inicialmente impede o alongamento do blastocisto, contrariamente a outras espécies, pelo que o embrião equino permanece esférico e não aderente à parede uterina, movendo-se continuamente. A mobilidade do *conceptus* é essencial para o reconhecimento materno de gestação na égua, sendo máxima por volta do dia 12 de gestação e mantendo-se até cerca do dia 15-16 após a ovulação. O sinal ou mecanismo pelo qual ocorre a inibição de luteólise na égua permanece por identificar, já que o *conceptus* equino não produz interferão. Várias hipóteses têm sido avançadas, desde a produção de estrogénios pelo *conceptus* até à produção de proteínas pelo saco vitelino, sendo que atualmente se assume a possibilidade de existência de um sinal secretor, mas também de um sinal físico pela presença do embrião no lúmen uterino, que inibe a produção de PGF_{2α} pelo útero, mantendo deste modo o corpo lúteo além dos 14-15 dias.

A fixação do embrião ocorre entre o dia 15 e o dia 16, perto da junção entre o corpo e o corno uterino. Simultaneamente, aumenta o tamanho da vesícula embrionária e aumenta a tonicidade do útero, em resposta à progesterona produzida pelo corpo lúteo e estradiol produzido pelo embrião e folículos em desenvolvimento. As contrações uterinas induzem o movimento do embrião, ao longo das pregas endometriais, para a curvatura do corno uterino, na junção com o corpo do útero, resultando na sua fixação. Após a fixação do embrião ocorrerá a hipertrofia da porção dorsal da parede uterina. Essa hipertrofia (visível ecograficamente pela alteração da vesícula embrionária para uma forma triangular) é indispensável para que ocorra a rotação da vesícula embrionária de modo a que o embrião assuma uma posição ventral, cerca do dia 18 (orientação). O saco amniótico desenvolve-se por volta do dia 18, a partir de porções da endoderme e mesoderme. O saco alantoide desenvolve-se posteriormente, a partir do intestino do embrião, no dia 22 a 24, e outras porções da mesoderme e ectoderme darão origem ao córion (dia 24) e posteriormente à placenta cório-alantoide (dia 29). A expansão do saco alantoide é acompanhada pela redução do saco vitelino, com a ascensão do embrião, sendo que entre os dias 24 e 33 o saco alantoide aumenta e o saco vitelino regreda, até que a membrana alantoide inclui o remanescente do saco vitelino por volta do dia 40. O processo de adesão feto-materna não coincide com a fixação do embrião, iniciando-se cerca do dia 25, com a aderência do trofoblasto ao endométrio, sendo que a interdigitação das microvilosidades trofoblásticas com o endométrio ocorre entre os dias 38 a 40 (placentação). As vilosidades

fetais surgem por volta do dia 45, como estruturas rudimentares, as quais darão origem aos microcotilédones, os quais se desenvolvem até cerca do dia 150, quando, aderindo às microcarúnculas maternas, formam os microplacentomas, característicos da placenta da égua.

O cordão umbilical forma-se entre os dias 34 e 36, como resultado da convergência das paredes da alantóide e sua fusão junto do uráco com vasos sanguíneos e o remanescente do saco vitelino. A partir do dia 40 termina a fase embrionária e inicia-se o desenvolvimento fetal. O cordão umbilical alonga-se e o feto inicia o movimento descendente cerca do dia 40, estando, aproximadamente, 50% descido cerca do dia 45 e localizado ventralmente cerca do dia 50.

Entre o dia 36 e o dia 38 formam-se os cálices endometriais, que iniciam a secreção de eCG (gonadotrofina coriónica equina). Esta hormona tem função de FSH e conduz a formação de corpos lúteos suplementares a partir da luteinização de folículos acessórios e de ovulações extra. Estes corpos lúteos serão responsáveis pela produção de progesterona até ao dia 120 a 150, altura em que o complexo feto-placentário inicia a sua própria produção de progesterona. Os cálices endometriais mantêm-se, mesmo que ocorra aborto, desaparecendo apenas entre o dia 120-150. A síntese de esteroides placentários inicia-se por volta do dia 60 de gestação e a partir do dia 150-160 a unidade fetoplacentária é a única fonte de progesterona para manutenção da gestação.

Diagnóstico de gestação na égua

O desenvolvimento da ecografia representou um avanço significativo no controlo da reprodução na égua, permitindo um diagnóstico de gestação precoce. Por rotina utiliza-se a ecografia em modo B, com sonda linear transrectal, sendo que a aplicação de ecografia com *doppler* a cores pode num futuro próximo trazer algumas vantagens

Considerando como dia zero o dia da ovulação, a avaliação ecográfica incide sobre o *conceptus* (embrião + anexos embrionários). É importante a avaliação sistemática de todo o útero, devendo efetuar-se movimentos lentos de modo a minimizar o risco de falsos negativos.

O exame ecográfico começa caudalmente à cérvix, seguindo pelo corpo do útero, corno direito, ovário direito, corno esquerdo, ovário esquerdo e novamente corpo do útero. O exame ecográfico dos ovários numa fase de gestação precoce é importante, não só para avaliar o tamanho e ecogenecidade do corpo lúteo existente, mas também para aferir a possível existência de dois corpos lúteos, o que nos indica o risco de gravidez gemelar. O exame ecográfico dos ovários deve igualmente registar a existência de folículos em desenvolvimento, essencial para o seguimento subsequente da égua, caso o diagnóstico de gestação seja negativo.

Apesar de a vesícula embrionária poder ser detetada cerca do dia 9, a maioria das vezes o diagnóstico é feito entre o dia 12 e o dia 14. O diagnóstico de gestação antes da fixação da vesícula embrionário (entre o dia 15 e o dia 16) permite intervir aquando da existência de gestações gemelares antes da fixação das mesmas, permitindo a fácil e segura eliminação de uma das vesículas.

Entre o dia 10-14 o *conceptus* é esférico, cheio de fluido e anecoico, com linha hiperecoica dorsal e ventral (figura 88). Estas linhas hiperecoicas devem-se ao reflexo espelhado e podem também ser observadas em alguns quistos uterinos, sendo no entanto distinguíveis destes pela mobilidade e aumento de tamanho que ocorre apenas no *conceptus*. Por volta do dia 10 a vesícula embrionária tem cerca de 3 mm de diâmetro, aumentando gradualmente até ao dia 15.



Figura 88: Imagem ecográfica de gestação de 12 dias.

Entre o dia 9 e o dia 11 é mais frequente a localização no corpo do útero e a partir de então nos cornos uterinos. As pregas endometriais facilitam a mobilidade da vesícula embrionária, a qual é assegurada pelas contrações do miométrio. Aquando da fixação do embrião entre o dia 15 (figura 89) e o dia 16, o *conceptus* é observado perto da junção corpo-corno do útero.

A partir do dia 18 a vesícula apresenta uma forma irregular e inconsistente que tende a ser triangular (figura 90). O embrião é detetado entre o dia 20 e o dia 25 (figura 91), sendo possível ver o batimento cardíaco perto do dia 22.



Figura 89: Imagem ecográfica de gestação de 15 dias.

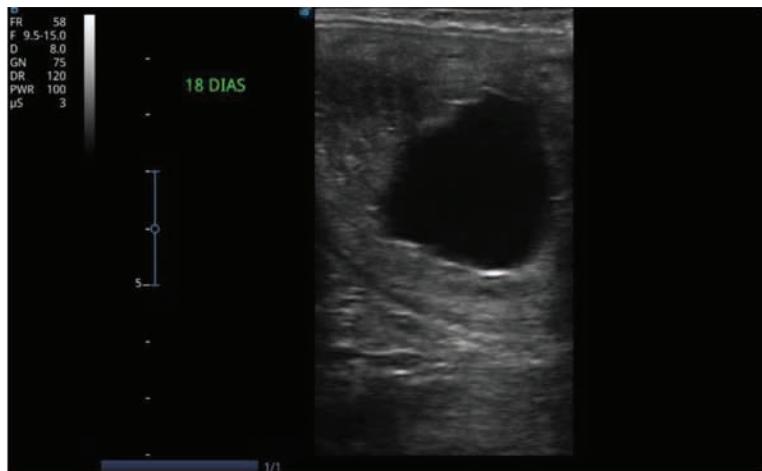


Figura 90: Imagem ecográfica de gestação de 18 dias.



Figura 91: Imagem ecográfica de gestação de 21 dias.

Por volta do dia 24 é visível o aumento do saco alantoide ventral ao embrião, iniciando-se a diminuição do saco alantoide com regressão do saco vitelino e consequente ascensão do embrião (figura 92).



Figura 92: Imagem ecográfica de gestação de 30 dias.

Por volta do dia 40, o cordão umbilical alonga-se dorsalmente e inicia-se a descida do embrião a qual está, como referido, completa por volta do dia 50 (figura 93).



Figura 93: Imagem ecográfica de gestação de 47 dias.

Por rotina, e dado que as perdas de gestação ocorrem maioritariamente até aos 40 dias o diagnóstico de gestação deve ser confirmado aos 45 dias.

Conclusão

A reprodução assistida em equinos tem vindo a desenvolver-se nos últimos anos, com repercussões importantes na melhoria de fertilidade dos equinos em Portugal. O essencial para compreender e melhorar a eficácia do controlo reprodutivo passa pela compreensão e conhecimento da anatomia e fisiologia quer da égua quer do garanhão.

Este Manual Prático pretende ser o primeiro de uma série de manuais com vista a melhorar a capacitação de médicos veterinários que desejem trabalhar em reprodução de equinos. Assim, optámos por começar pela compreensão dos mecanismos fisiológicos e pelo exame dos animais reprodutores para, em publicações futuras, abordarmos técnicas de reprodução assistida aplicáveis nesta espécie.

Esperamos que este Manual seja útil a estudantes e profissionais.



ANEXO 1 Análise Sémen – Garanhão

Proprietário _____

Morada _____

Telefone _____ NIF _____

ID do garanhão _____ Data de colheita _____

Idade _____

Hora de colheita		
Método		
Nº de montas/Tempo de monta (min)		
Volume mL: filtrado (total)		
Motilidade progressiva: Puro <input type="checkbox"/> Diluído <input type="checkbox"/>		
Concentração ($\times 10^6$ /mL) - Método		
Nº total de spz ($\times 10^9$)		
Nº total x % móveis ($\times 10^9$)		
Meio de Refrigeração		

% VIVOS-MORTOS:

Notas:

	Coloração/Método:	Ampliação:	Operador:
Cabeças anormais			
Crateras			
Defeitos do acrosome			
Cabeças soltas normais			
Cabeças soltas anormais			
Microcefália			
Macrocefália			
Piriformes			
Total Anomalias da Cabeça			
Gotas proximais			
Gotas distais			
Gotas distais com reflexo			
Tracto intermédio irregular/aplásico			
Tracto intermédio espessado/inchado			
Tracto intermédio enrolado (Dag-like)			
Tracto intermédio dobrado			
Outras Anomalias do TI			
Total Anomalias TI			
Caudas dobradas			
Caudas enroladas			
Total Anomalias da Cauda			
Célula Germinal prematura			
Total Anomalias			
Outras células (hemácias, neutrófilos, etc)			

Referências bibliográficas

- Allen, W. R. (2000). The physiology of early pregnancy in the mare. In *Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Practnr* (Vol. 46, pp. 338-354).
- Amann, R. P. (1981). A review of anatomy and physiology of the stallion. *Journal of Equine Veterinary Science*, 1(3), 83-105.
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5–17.
- Anel, L., & Paz, P. De. (2010). Probes and Techniques for Sperm Evaluation by *Flow Cytometry*, 45, 67–78.
- Aurich, C. (2011). Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, 124 (3–4), 220–228.
- Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., & Hinrichs, K. (2011). *Manual of equine reproduction*. 3rd ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier.
- Brito, L. F. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6(4), 249-264.
- Bohn, A. A., Ferris, R. A., & McCue, P. M. (2014). Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares. *Veterinary clinical pathology*, 43(4), 594-600.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., & Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 80(7), 758–765.
- Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Staroniewicz, Z., & Siemieniuch, M. J. (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–6.
- Burger, D., Meroni, G., Thomas, S., & Sieme, H. (2015). Effects of ground semen collection on weight bearing on hindquarters, libido, and semen parameters in stallions. *Theriogenology*, 84(5), 687–692.

- Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, 64(3), 580-588.
- Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., ... Pasolini, M. P. (2012). Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 77(1), 89–98.
- Crabtree, J. (2010a). Prebreeding examination of the stallion 1. Physical examination. *In Practice*, 32(1), 22–28.
- Crabtree, J. (2010b). Prebreeding examination of the stallion 2. Semen collection and evaluation. *In Practice*, 32(2), 58–63.
- Dascanio, J.J. & Ferris, R.A. (2014) Uterine cytology collection: swab/brush. In: John Dascanio and Patrick McCue (eds). *Equine Reproductive Procedures*, first edition, John Wiley & Sons, Inc., pp 58-63.
- de Amorim, M. D., Gartley, C. J., Foster, R. A., Hill, A., Scholtz, E. L., Hayes, A., & Chenier, T. S. (2016). Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low-volume lavage, and uterine biopsy and combinations in the diagnosis of equine endometritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 44, 54-61.
- Ferris, R. A. (2016). Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 481-498.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons.
- Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 406–419.
- Katila, T. (2016): Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproductive Biology* 16, 189–196.
- Kenney, R. M., & Doig, P. A. (1986). Equine endometrial biopsy. *Current therapy in theriogenology*, 2, 723-729.

- Liu, I.K.M. & Troedsson, M.H.T. (2008): The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology* 70, 415–420.
- Love, C. C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76(3), 547–557.
- Love, C. C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 531–546.
- McCue, P. M. (2014a). Palpation of the Reproductive Tract of the Non-Pregnant Mare. In John Dascanio and Patrick McCue (eds). *Equine Reproductive Procedures*, first edition, John Wiley & Sons, Inc. *Equine Reproductive Procedures*, 22-25.
- McCue, P. M. (2014b). Ultrasound Evaluation of the Non-Pregnant Mare. In John Dascanio and Patrick McCue (eds). *Equine Reproductive Procedures*, first edition, John Wiley & Sons, Inc. *Equine Reproductive Procedures*, 26-31.
- McMacue, P.M. (2014c): Endometrial biopsy. In John Dascanio and Patrick McCue (eds). *Equine Reproductive Procedures*, first edition, John Wiley & Sons, Inc., pp 68-70.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (Eds.). (2011). *Equine reproduction*. John Wiley & Sons.
- Morel, M. C. D. (2015). *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. CABI.
- Nagy, P., Guillaume, D., & Daels, P. (2000). Seasonality in mares. *Animal Reproduction Science*, 60(61), 245–262.
- Nielsen, J.M. (2005) Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 64, 510–518.
- Ortega-Ferrusola, C., Gracia-Calvo, L. A., Ezquerra, J., & Peña, F. J. (2014). Use of colour and spectral doppler ultrasonography in stallion andrology. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 88–96.
- Peña, F. J., Martin-muñoz, P., & Ortega-ferrusola, C. (2017). Advances in flow cytometry in basic and applied equine andrology, 136–142.

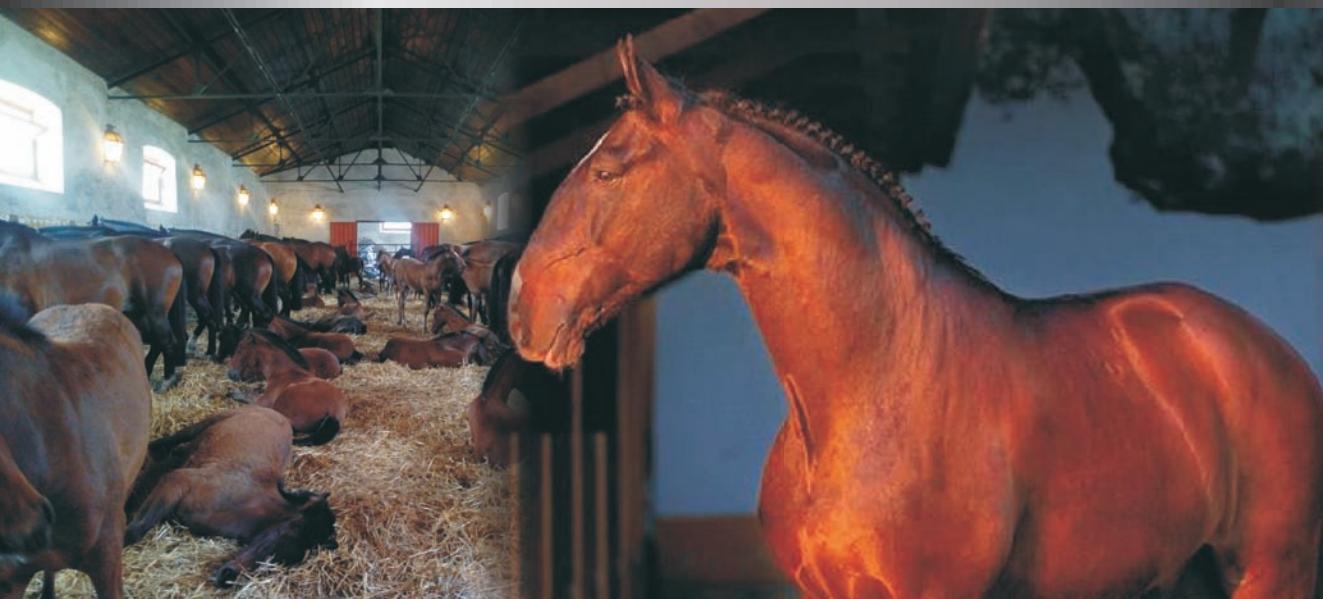
Talluri, T. R., Ravi, S. K., Singh, J., Legha, R. A., & Pal, Y. (2015). Application of Caslick's Index in Predicting the Mare Fertility. *Journal of Animal Research*, 5(2), 219.

Varner, D. D. (2016). Approaches to breeding soundness examination and interpretation of results. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S37-S44.

Williams, G. L., Thorson, J. F., Prezotto, L. D., Velez, I. C., Cardoso, R. C., & Amstalden, M. (2012). Reproductive seasonality in the mare: Neuroendocrine basis and pharmacologic control. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(2), 103–

Projeto ALT20-03-0246-FEDER-000020
cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER)
através do "Programa Operacional Regional Alentejo 2020"

Cofinanciado por:



9 789898550750

UÉVORA
UNIVERSIDADE DE ÉVORA
évora
ESCOLA DE CIÉNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

icam
Instituto de Ciéncias Agrarias e Ambientais Mediterrânicas
Knowledge connecting land, food and people

LUSITANO WORLD®

AR
COUDELARIA DE ALTER
1748