



JÚLIA BARISON VICENTE OLIVEIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NAS CENTRAIS DE
REPRODUÇÃO EQUINA EMBRIO-EQUI – SÃO SIMÃO - SP E
GUTAVET - PIRACAIA - SP**

LAVRAS – MG

2019

JÚLIA BARISON VICENTE OLIVEIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO RELIZADO NAS CENTRAIS DE
REPRODUÇÃO EQUINA EMBRIO-EQUI – SÃO SIMÃO - SP E
GUTAVET - PIRACAIA - SP**

Relatório de estágio supervisionado apresentado ao Colegiado do Curso de Medicina Veterinária, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Lavras.

Prof^o. Dr^o. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS – MG

2019

JÚLIA BARISON VICENTE OLIVEIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO RELIZADO NAS CENTRAIS DE
REPRODUÇÃO EQUINA EMBRIO-EQUI – EM SÃO SIMÃO-SP E
GUTAVET - PIRACAIA-SP**

Relatório de estágio supervisionado apresentado ao Colegiado do Curso de Medicina Veterinária, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Lavras.

Aprovado em 26 de novembro de 2019

M.V. Giovanna Santesso Takakura

M.V. Virgínia Maria Toledo Vilela

M.V. Kianne Silva Monteiro

Orientador

Prof^o. Dr^o. Luis David Solis Murgas

LAVRAS – MG

2019

Ao meu avô, Antônio Vicente, que hoje está no céu e é meu melhor anjo. Que torceu e torce pelo meu sucesso e, com certeza, está me vendo conquistar mais um sonho vivido por nós.

AGRADECIMENTOS

Nessa jornada nada simples, pude contar com uma torcida imensa. Assim, agradeço de forma imensurável a cada um que somou para que eu estivesse cada vez mais próxima de realizar esse sonho. Primeiramente, devo meus agradecimentos à Deus por ter sido tão Pai em tantos momentos, me ajudando a caminhar e conquistar tudo que almejei. Aos meus pais, Maurilio e Denise que, sempre estavam ao meu lado para superar os obstáculos que surgiam no caminho. À minha família, pelo apoio incondicional e pelo orgulho que sempre demonstraram sentir por mim.

Agradeço infinitamente aos meus amigos de longa data, e aos que conheci ao longo da caminhada até aqui, principalmente aos do CAVE e aos da Atlético CACHORRERA. Com certeza o percurso foi mais suave com vocês segurando as minhas mãos. Ao NERC que me ajudou tanto no meu desenvolvimento intelectual, como no pessoal. Obrigada, Kianne e Murgas, por todas as experiências trocadas e por todo carinho que recebi de vocês.

Às mulheres incríveis, Giovanna e Virgínia, que me fizeram amar ainda mais a Medicina Veterinária e os cavalos, transmitindo conhecimentos inexplicáveis, e compartilhando dias incríveis. Aos meus supervisores de estágio, Carlos (Xuxu), Renato e Maria Augusta (Guta), que me deram a oportunidade de ter novas experiências e vivência para seguir no mercado de trabalho.

Ao Pedro Henrique que, nesta reta final, me deu todo apoio e ajuda possíveis, os quais foram imprescindíveis para que os estágios e este trabalho fossem concluídos com sucesso.

Ao meu orientador, Murgas, que é um exemplo de profissional e de pessoa, e que sempre nos acolhe como um pai. E por fim, aos membros da banca por aceitarem meu convite e fazerem parte desse momento.

RESUMO

O presente trabalho relata as atividades realizadas como parte das exigências da disciplina PRG-107 - Estágio Supervisionado, para o título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob orientação do Professor Doutor Luis David Solis Murgas. A carga horária prática foi cumprida nas Centrais de Reprodução Equina Embrio-Equi e GUTAVET, sendo 360 e 176 horas, respectivamente. O expediente ocorria das 08:00 até às 18:00, com horário de almoço de 12:00 às 14:00. O restante da carga horária é destinada à elaboração deste trabalho. Durante o período de estágio na primeira empresa foi possível acompanhar 7 colheitas de sêmen, 14 Inseminações Artificiais (IA), 8 Transferências de Embrião (TE), 21 citologias uterinas, 18 swabs uterinos, entre outros. Na segunda empresa foram acompanhadas 12 colheitas de sêmen, 7 IA, 113 TE, 5 colheitas de embrião, inúmeros diagnósticos de gestação, 8 sessões de aspirações foliculares, além de um parto distócico. Nas duas empresas foi possível adquirir vivência prática em temas que só havia tido contado teórico durante a graduação, e nesses três meses pude acompanhar a rotina prática de centrais de reprodução, abrangendo as áreas: Ginecologia e Andrologia, além de Fisiopatologia da Reprodução e Tratamento de Enfermidades Uterinas, tendo contato com várias biotecnologias aplicadas à reprodução de equídeos. Este trabalho contempla um relatório de estágio, uma revisão de literatura e um relato de caso sobre colheita de embrião em uma égua senil com endometrite crônica.

Palavras-chave: Transferência de embrião. Endometrite. Colheita de sêmen.

ABSTRACT

This work reports on activities performed as part of the discipline PRG-107 - Supervised Internship, for the title of Bachelor of Veterinary Medicine from the Federal University of Lavras (UFLA), with the guidance of Professor Luis David Solis Murgas. The practical workload was fulfilled in Equina Embryo-Equi and GUTAVET breeding centers, being 360 and 176 hours, respectively. The job hours are from 8 am to 6 pm, with lunch time from 12 am to 2 pm. The rest of the workload is destined to the elaboration of this work. During the internship period in the first company that was able to follow 7 semen collection, 14 Artificial Insemination (IA), 8 Embryo Transfer (ET), 21 uterine cytologies, 18 uterine swabs, among others, already in the second company were accompanied 12 semen collection, 7 IA, 113 TE, 5 embryo collections, diagnostic pregnancy numbers, 8 sessions of follicular aspiration, and a dystonic delivery. In both companies, it was possible to acquire practical experiences in topics that had theoretical content during the undergraduate course, and three months after the practice of central reproduction, covering areas of Gynecology and Andrology, as well as Reproductive Pathophysiology and Treatment of Uterine Diseases, having contact with various biotechnologies applied to equine breeding. This work includes an internship report, a literature review and a case of embryo collection in a senile mares with chronic endometritis.

Keywords: Embryo Transfer. Endometritis. Semen collection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vista externa do pavilhão de baias de éguas doadoras de embrião	15
Figura 2 - Vista interna do pavilhão de baias das éguas doadoras	15
Figura 3 - Sala de medicamentos e de esterilização de instrumentais cirúrgicos	16
Figura 4 - Laboratório principal	16
Figura 5 - Piquete destinado às éguas doadoras de embrião	16
Figura 6 - Piquetes destinados aos animais do pensionato.....	18
Figura 7 - Pavilhão de baias do pensionato	19
Figura 8 - Um dos pavilhões de baias dos Mangalargas Paulista.....	19
Figura 9 - Laboratório especializado para manipulação de embriões e sêmen	20
Figura 10 - Sala de esterilização de materiais	21
Figura 11 - Lanchonete destinada ao manejo reprodutivo de éguas receptoras	21
Figura 12 - Piquete em formação com Tyfton spp.	22
Figura 13 - Gráfico de atividades desenvolvidas na empresa Embrio-Equi	23
Figura 14 - Gráfico de atividades desenvolvidas na empresa GUTAVET	24
Figura 15 - Controle folicular e uterino via palpação e ultrassonografia transretal	25
Figura 16 - Implante Intravaginal de P4	26
Figura 17- Protocolo de Ciclo Estral Artificial - Embrio-Equi	27
Figura 18 - Protocolo de Ciclo Estral Artificial (ICSI/clone) - GUTAVET.....	27
Figura 19 - Protocolo de Ciclo Estral Artificial (convencionais) - GUTAVET.....	28
Figura 20 - Embrião D8	31
Figura 21 - Vulvoplastia (Caslick).....	34
Figura 22 - Gônada masculina (testículo)	35
Figura 23 - Fim do Parto	36
Figura 24 - Material para análise de sêmen.....	38
Figura 25 - Esquema de colheita de material para obtenção de PRP	47
Figura 26 - Embrião em fase de blastocisto inicial colhido 9 dias após a ovulação.....	51
Figura 27 - Vulvoplastia (Mondino-Merck).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

UFLA - Universidade Federal de Lavras
TCC - Trabalho de Conclusão de Curso
DMV - Departamento de Medicina Veterinária
Km - Quilômetros
IBVET - Instituto Brasileiro de Veterinária
IA - Inseminação Artificial
TE - Transferência de Embrião
IM - Intramuscular
GTA - Guia de Trânsito Animal
AIE - Anemia Infecciosa Equina
Kg - Quilogramas
DG - Diagnóstico de Gestação
US - Ultrassonografia
CL - Corpo Lúteo
hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana
IV - Intravenoso
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
E2 - Estrógeno
P4 - Progesterona
D8 - Oitavo dia após a ovulação
D5 - Quinto dia após a ovulação
D4 - quarto dia após a ovulação
PGF2 α - Prostaglandina 2 alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	CENTRO AVANÇADO DE REPRODUÇÃO EQUINA: EMBRIO-EQUI.....	14
2.1.	Introdução.....	14
2.2.	Estrutura Física	14
2.3.	Manejo Alimentar	17
2.4.	Manejo de Doenças Reprodutivas.....	17
3.	CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA: GUTAVET	18
3.1.	Introdução.....	18
3.2.	Estrutura Física	19
3.3.	Manejo Alimentar	21
3.4.	Recebimento de Animais e Manejo Sanitário.....	22
4.	ATIVIDADES ACOMPANHADAS	23
4.1.	Manejo Reprodutivo de Fêmeas	24
4.1.1.	Controle Reprodutivo.....	24
4.1.2.	Ciclo Estral Artificial.....	25
4.1.2.1.	Protocolo de Ciclo Estral Artificial preconizado pela Embrio-Equi.....	26
4.1.2.2.	Protocolo de Ciclo Estral Artificial preconizado pela Empresa GUTAVET .	27
4.1.2.2.1.	Embriões de ICSI ou Clone.....	27
4.1.2.2.2.	Embriões Convencionais.....	27
4.1.3.	Inseminação Artificial.....	28
4.1.4.	Citologia Uterina, Cultura Uterina e Antibiograma	29
4.1.5.	Recuperação e Transferência de Embriões	30
4.1.6.	Aspiração Folicular.....	32
4.1.7.	Vulvoplastias	33
4.1.8.	Sexagem Fetal	34
4.1.9.	Parto Assistido.....	35
4.2.	Manejo Reprodutivo de Machos	36
4.2.1.	Colheita de Sêmen	36
4.2.2.	Análise de Sêmen	37
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6.	ENDOMETRITE BACTERIANA CRÔNICA EM EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA	41

6.1.	Introdução	41
6.2.	Resposta Inflamatória e Casuística da Endometrite Crônica.....	41
6.3.	Principais Fatores Predisponente	42
6.4.	Diagnóstico	43
6.4.1.	Citologia Uterina	44
6.4.2.	Cultura Uterina	44
6.4.3.	Biópsia Uterina.....	44
6.4.4.	Ultrassonografia.....	44
6.5.	Tratamento	45
6.5.1.	Antibioticoterapia	45
6.5.2.	Mucolíticos.....	45
6.5.3.	Lavagem Terapêutica.....	46
6.5.4.	Corticosteroides	46
6.5.5.	Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	46
6.5.6.	Células Tronco Mesenquimais (CTM)	48
7.	RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUA SENIL COM ENDOMETRITE BACTERIANA CRÔNICA: RELATO DE CASO.....	49
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

A grade curricular do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), é composta por dez períodos letivos, sendo nove semestres destinados a disciplinas obrigatórias e eletivas, presenciais e integrais, e o último semestre é reservado para a disciplina PRG107 - Estágio Supervisionado, com carga horária de 476 horas (28 créditos), distribuídas em, no mínimo, 408 horas propostas às atividades práticas e 68 horas dedicadas à elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), sob a orientação de um docente do Departamento de Medicina Veterinária (DMV).

O estágio supervisionado configura-se como atividade de treinamento e qualificação profissional, com o intuito de complementar o ensino teórico-prático, conduzindo o graduando para um direcionamento profissional em áreas da Medicina Veterinária. O estágio foi realizado em duas empresas distintas, ambas centrais de reprodução equina, sob a orientação do Professor Doutor Luis David Solis Murgas.

A Central Embrio-Equi, localizada no município de São Simão - SP, foi o primeiro local de estágio, por ser destaque na área reprodução de equinos. A supervisão do estágio ficou a cargo M.V M.S.c Carlos Guilherme de Castro Schutzer, proprietário da empresa, e atualmente professor do curso de Medicina Veterinária nas Faculdades Barão de Mauá e Moura Lacerda, em Ribeirão Preto - SP, ministrando as disciplinas de Reprodução e Obstetrícia, e de reprodução em cursos de pós-graduação no Instituto Brasileiro de Veterinária (IBVET), além de cursos e palestras particulares. O estágio foi realizado no período de 29 de julho a 27 de setembro de 2019, totalizando 360 horas, cumpridas em 45 dias úteis.

A Central pertencente à empresa GUTAVET, sediada em Piracaia - SP, foi o segundo local de estágio, definido pelas ótimas referências, e pelo grande volume de animais trabalhados por estação reprodutiva. A supervisão ficou a cargo M.V M.S.c Dra. Maria Augusta Alonso, proprietária da empresa, e professora em palestras e cursos de pós-graduação em reprodução de equídeos pelo IBVET. As atividades foram cumpridas no período de 01 de outubro a 30 de outubro de 2019, com total de 176 horas, ao longo 22 dias úteis.

Este trabalho tem o objetivo de descrever as atividades acompanhadas em ambas as centrais de reprodução. Os relatos incluem a descrição física e operacional dos estabelecimentos, atividades desenvolvidas, biotecnologias aplicadas, bem como uma revisão de literatura a respeito de endometrite bacteriana crônica, e um relato de caso de recuperação embrionária em uma égua senil com essa patologia.

2. CENTRO AVANÇADO DE REPRODUÇÃO EQUINA: EMBRIO-EQUI

2.1. Introdução

A Embrio-Equi, Centro Avançado de Reprodução Equina, fundada em 2004, está localizada no Haras Bandeirantes, pertencente à Fazenda São José, que se encontra às margens da rodovia Anhanguera (SP-330), no km 274, no município de São Simão, estado de São Paulo.

A empresa presta serviço em Reprodução Equina tanto dentro do Haras quanto fora dele, atendendo principalmente animais da raça Quarto de Milha. Dentro dos serviços oferecidos estão: exame do sistema reprodutivo dos animais; colheita, análise e congelamento de sêmen; acompanhamento folicular; IA; TE; diagnóstico e acompanhamento gestacional; sexagem fetal; exames, tratamentos clínicos e cirúrgicos de enfermidades do trato reprodutivo feminino.

A Embrio-Equi é uma central de reprodução renomada nacionalmente, sendo referência na reprodução de equinos da raça Quarto de Milha no interior de São Paulo. Conta com infraestrutura completa para o desenvolvimento das atividades, supervisão de profissionais de excelência com empenho em transmitir todo seu conhecimento, contribuindo para o desenvolvimento profissional e pessoal. As atividades foram desenvolvidas, principalmente, em propriedades externas nas cidades da região, tais como Ibitinga, Santa Rita do Passa Quatro, Santa Rosa do Viterbo, Ribeirão Preto, entre outras.

A equipe profissional da empresa conta com dois médicos veterinários, dois tratadores, além de vários estagiários que sempre estão acompanhando as atividades desenvolvidas na central.

O objetivo do estágio foi acompanhar a rotina de um profissional referência na reprodução equina, conjugando teoria e prática. Além de entender os desafios para obter os melhores índices reprodutivos possíveis, e aprender sobre a utilização de diversas biotecnologias.

2.2. Estrutura Física

A estrutura do Haras é composta por três pavilhões de cocheiras, com 103 baias no total, sendo que dois pavilhões, de 20 baias cada, são destinados à central de reprodução, onde estão doadoras (*Figuras 1 e 2*), garanhões e potros desmamados. Dentro do pavilhão das doadoras há um tronco de contenção com dimensões de 2 m x 0,7 m x 1 m (comprimento x largura x altura), utilizado para palpação transretal, exame ultrassonográfico, e aplicação de hormônios e medicamentos; uma sala (*Figura 3*) utilizada como farmácia, onde ficam os

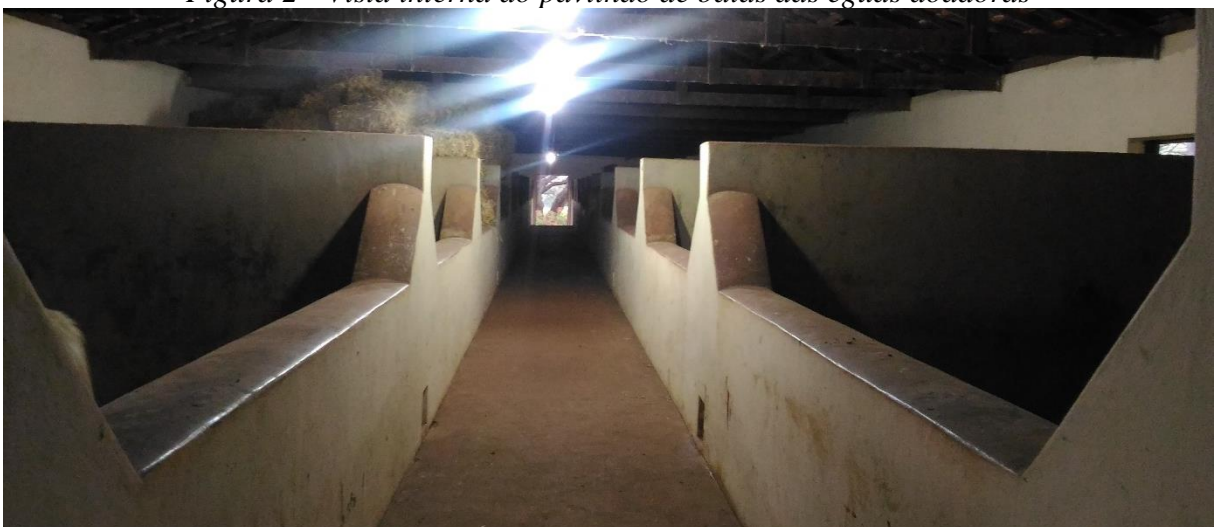
hormônios, medicamentos em geral, instrumentais cirúrgicos, materiais descartáveis e de uso geral, entre outros; um laboratório principal (*Figura 4*), onde é realizado tanto a análise, manipulação, resfriamento e congelamento de sêmen quanto o mesmo procedimento com os embriões, contendo materiais para tais procedimentos como duas lupas, dois microscópios ópticos, uma centrífuga, um banho maria, diluentes, pipetas e inovuladores, placa aquecedora, placa de cultivo celular, seringas, agulhas, entre outros; 12 piquetes sendo quatro destinados aos garanhões, um para éguas prenhes e paridas, um para doadoras (*Figura 5*), um para receptoras e cinco para outras finalidades; e um escritório.

Figura 1 - Vista externa do pavilhão de baias de éguas doadoras de embrião



Fonte: Autor (2019)

Figura 2 - Vista interna do pavilhão de baias das éguas doadoras



Fonte: Autor (2019)

Figura 3 - Sala de medicamentos e de esterilização de instrumentais cirúrgicos



Fonte: Autor (2019)

Figura 4 - Laboratório principal



Fonte: Autor (2019)

Figura 5 - Piquete destinado às éguas doadoras de embrião



Fonte: Autor (2019)

A recuperação embrionária é realizada utilizando tronco de contenção, de dimensões 2,2 m x 0,9 m x 2,5 m, que fica ao lado do laboratório, facilitando a manipulação e envase do embrião. O laboratório também possui uma sala destinada à lavagem, esterilização e embalagem de materiais utilizados nas diferentes biotecnologias aplicadas na central, com equipamentos como estufa e botijões de nitrogênio. Na parte externa, fica a área de colheita de sêmen, que possui um manequim, tronco de contenção já citado, mesa de inox e uma sala para preparação de materiais como a vagina artificial para colheita de sêmen.

2.3. Manejo Alimentar

Além do fotoperíodo no caso dos equinos, a reprodução é influenciada por vários outros fatores extrínsecos como nutrição, estresse, e até mesmo as particularidades de cada indivíduo. Estar livre de fome e sede é a premissa básica do bem-estar animal, e caso não forem respeitadas as necessidades do animal, a reprodução não obterá os resultados almejados. Sem uma nutrição adequada, o metabolismo de qualquer ser vivo não consegue chegar à homeostase ideal para que todos os sistemas respondam corretamente. Portanto, assim como todo o organismo do animal, a reprodução depende de um manejo alimentar eficiente para que ela seja eficiente. Dessa forma, a alimentação escolhida para todos os animais da Central é composta por quatro quilos de ração, fracionados em duas refeições, uma pela manhã e uma à tarde; pasto, feno e sal mineral à vontade.

2.4. Manejo de Doenças Reprodutivas

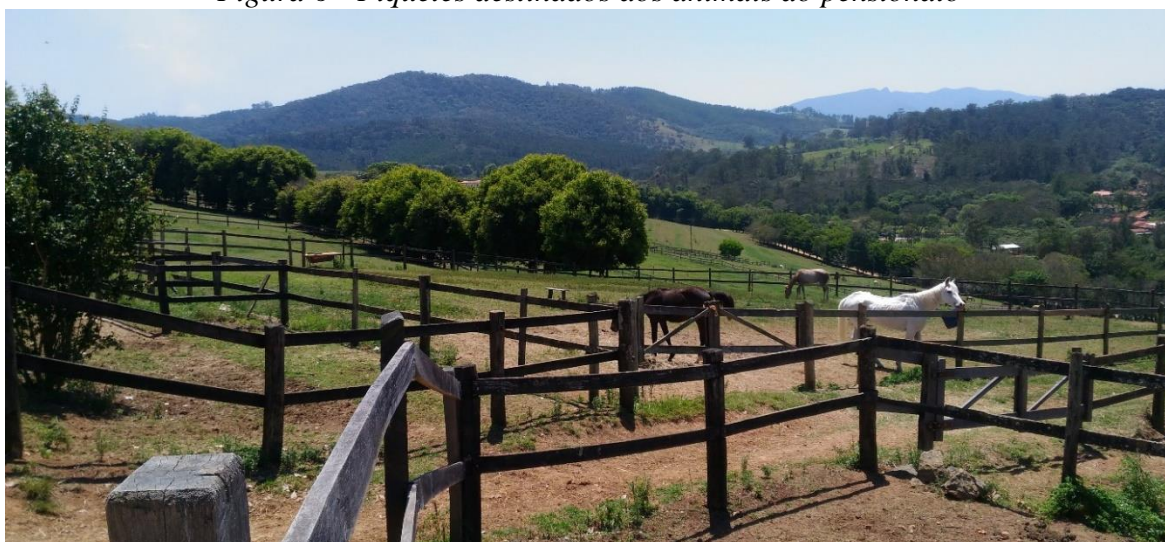
Existem várias doenças que podem afetar os equinos e causar prejuízos à gestação dos mesmos como perda embrionária, aborto, endometrite, entre outros. Assim, a empresa adota um protocolo de imunização das fêmeas com cinco, sete e nove meses de gestação, com a vacina Pneumabort®, via Intramuscular (IM), para a prevenção de Aborto Equino à Vírus, causado por um *Hespesvírus* Tipo I, o qual é o segundo agente mais comum como causador de aborto (12% dos casos), ocorrendo nos últimos quatro meses de gestação (MCKINNON et al., 2011). Além disso, com três e seis meses de gestação, são administrados 40 mL de Estreptomicina via IM, como terapia profilática para Leptospirose, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, o que leva ao aborto em equinos com seis meses ou mais de gestação, podendo chegar a 6% dos casos (MCKINNON et al., 2011). Neste caso, a vacina não é utilizada, uma vez que a mesma não garante imunidade para todos os sorotipos da *Leptospira*.

3. CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA: GUTAVET

3.1. Introdução

O Haras RAA foi fundado em 1976, e a Central de Reprodução Equina - GUTAVET em 2008, ambos pertencentes à Fazenda Santa Rita II, que se encontra às margens da Rodovia Aldo Bolini, no km 82, no município de Piracaia, estado de São Paulo. A fazenda possui 81 piquetes, sendo que seus tamanhos variam de um a cinco hectares (*Figura 6*).

Figura 6 - Piquetes destinados aos animais do pensionato



Fonte: Autor (2019)

A central é destinada, principalmente, a aluguel de receptoras à proprietários externos, mas também aluga baias e piquetes para pensionato. Os serviços reprodutivos oferecidos são: colheita de sêmen; acompanhamento folicular de éguas, manejo de éguas acíclicas, inseminação artificial em éguas, exame do sistema reprodutivo dos animais, transferência de embriões em equinos, aspiração folicular para produção in vitro de embriões através da técnica de clonagem ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), confirmação e acompanhamento gestacional, tratamentos de enfermidades uterinas em doadoras e parto assistido.

O controle folicular, inseminação artificial, e colheita de sêmen eram realizadas pelas veterinárias que trabalham na Central, no entanto, outros serviços são terceirizados. As transferências de embriões convencionais são executadas por três veterinários, as transferências de embrião de ICSI e clone, são feitas por outra veterinária, e a aspiração folicular e seleção de oócitos por outros dois veterinários.

A escolha dessa empresa ocorreu por tratar-se de uma empresa composta por profissionais de excelência na área de Reprodução Equina, com infraestrutura completa para o

desenvolvimento das atividades. A equipe é composta com por uma Médica Veterinária responsável técnica, e duas Médicas Veterinárias residentes, além de 8 funcionários (entre tratadores e tratoristas), e estagiários.

Portanto, o objetivo do estágio foi acompanhar uma rotina de profissionais da área de reprodução equina, entendendo os desafios para obter índices reprodutivos satisfatórios, tendo em vista a grande demanda por receptoras.

3.2. Estrutura Física

A Central é composta por quatro pavilhões de cocheiras com 43 baias. Dois desses pavilhões são destinados ao pensionato (*Figura 7*) totalizando 23 baias. 14 delas com dimensão de 3 m x 4 m, e as demais de 3 m x 2 m. Os outros dois pavilhões são de criação de Mangalarga Paulista (*Figura 8*) e contam com baias de 3 m x 4 m.

Figura 7 - Pavilhão de baias do pensionato



Fonte: Autor (2019)

Figura 8 - Um dos pavilhões de baias dos Mangalargas Paulista



Fonte: Autor (2019)

O local também contém um escritório; um laboratório especializado (*Figuras 9*), onde é realizado manipulação de sêmen, análise e manipulação de embriões, contendo materiais para tais procedimentos como: duas lupas, um microscópio óptico, uma centrífuga, um banho maria, três freegobares, diluentes, pipetas e inovuladores, placa aquecedora, placa de cultivo celular, seringas, agulhas; uma sala de esterilização (*Figura 10*) que possui uma estufa e um autoclave. Além dessas dependências, há também uma sala de botijões de sêmen. Ao lado do laboratório existem dois troncos onde são feitas inseminação artificial, colheita e inovulação de embrião, e são destinados, principalmente, para controle reprodutivo de doadoras. Para controle reprodutivo de receptoras, a Central conta com 32 troncos em uma lanchonete (*Figura 11*). E na área externa, há o manequim para a colheita de sêmen.

Figura 9 - Laboratório especializado para manipulação de embriões e sêmen



Fonte: Autor (2019)

Figura 10 - Sala de esterilização de materiais



Fonte: Autor (2019)

Figura 11 - Lanchonete destinada ao manejo reprodutivo de éguas receptoras



Fonte: Autor (2019)

3.3. Manejo Alimentar

A maior parte dos animais do pensionato passam a noite em baias e recebem ração, feno e sal mineral de acordo com a opção do proprietário do animal, e durante o dia são soltos em piquetes formados com *Tyfton spp.*

As receptoras ficam em pastagens de *Tyfton spp.*, com sal mineral à vontade. No entanto, em épocas de estiagem, elas são alimentadas com silagem de milho, enquanto as pastagens são conservadas para que possam receber os animais no período das chuvas. Como

há escassez de pastagens na seca, apenas as receptoras recém transferidas e as com prenhes confirmadas ficam nos piquetes com pasto formado (*Figura 12*).

Figura 12 - Piquete em formação com Tyfton spp.



Fonte: Autor (2019)

3.4. Recebimento de Animais e Manejo Sanitário

Como a propriedade é uma Central que aluga receptoras, todos os animais que chegam no local, obrigatoriamente, devem possuir Guia de Trânsito Animal (GTA), exames atualizados e negativos de Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo, e atestado de sanidade encaminhado pelo Médico Veterinário responsável. Além disso, no desembarque, os animais, são desverminados com formulação comercial em pasta, de uso oral, à base de Ivermectina, utilizando uma bisnaga para 500 kg, independente do peso do animal, vacinados e era realizada a palpação e a ultrassonografia (US) para verificar em qual fase do ciclo estral estava aquela fêmea. Apesar de o correto ser pesar todos os animais e fornecer a dose adequada de vermífugo, a Médica Veterinária responsável acredita que esse manejo é inviável frente ao grande número de animais (cerca de 250) e a rotina intensa da Central.

As vacinas utilizadas na imunização dos animais são EWT (tétano, influenza equina e encefalomielite leste e oeste), garrotilho, raiva e leptospirose.

4. ATIVIDADES ACOMPANHADAS

As atividades realizadas em ambas as centrais foram muito similares, com algumas particularidades de cada empresa, que serão citadas nos tópicos correspondentes. Dentre essas atividades estão o controle reprodutivo de doadoras e receptoras, e hormonioterapia; o ciclo estral artificial; IA; exames complementares e tratamentos uterinos; a colheita e TE convencionais, de ICSI e de clone; o diagnóstico de gestação, a sexagem fetal; o parto assistido; a aspiração folicular; o manejo reprodutivo de garanhões incluindo colheita, manipulação e biotecnologias aplicadas ao sêmen equino; e o manejo diário de rotina dos animais alojados como alimentação, cuidados com pelagem e cascos, vacinação e vermifugação (*Figura 13 e 14*).

Figura 13 - Gráfico de atividades desenvolvidas na empresa Embrio-Equi



Fonte: Autor (2019)

Figura 14 - Gráfico de atividades desenvolvidas na empresa GUTAVET



Fonte: Autor (2019)

4.1. Manejo Reprodutivo de Fêmeas

4.1.1. Controle Reprodutivo

As fêmeas equinas são animais poliéstricos estacionais, ou seja, ciclam em determinada época do ano. Essa época corresponde ao período de dias mais longos, com maior incidência de luz. O controle reprodutivo é realizado através de alguns parâmetros: palpação transretal, em que é avaliado o tônus uterino, classificado de um a três. Ultrassonografia (*Figura 15*) para mensurar e avaliar folículos, presença de corpo lúteo (CL), grau de edema uterino, classificado de um a quatro (edema inflamatório) segundo a escala de Samper, ou presença de fluido inflamatório e ar. Além disso, na US é possível avaliar e classificar a ecogenicidade uterina, também classificado de um a três. Determinadas características e alterações morfológicas como edema e tônus uterinos, além de desenvolvimento folicular, são perceptíveis tanto na palpação quanto na ultrassonografia, que correspondem aos diferentes estágios do ciclo estral, sendo que os mais importantes na prática de reprodução equina são: anestro, estro e diestro. Na Embrio-Equi utiliza-se aparelhos de ultrassonografia ALOKA SSD-500 e o Mindray DP-10, e na GUTAVET era utilizado o Sonoscape A5, ambos com probe linear de frequência de 5 Mhz.

Figura 15 - Controle folicular e uterino via palpação e ultrassonografia transretal



Fonte: Autor (2019)

As alterações observadas com relação ao início do estro são edema uterino fisiológico (com classificação de um a três), tônus uterino, relaxamento de cérvix e mensuração folicular. Adota-se como padrão para acompanhamento de ovulação, éguas que apresentem folículos ≥ 35 milímetros (mm) de diâmetro e edema uterino de grau três (MELO, 2006). Ao atingir o ponto de indução para ovulação, conforme os parâmetros apresentados anteriormente, podemos utilizar de diversos protocolos hormonais (FARIAS et al, 2016). A indução, era feita associando a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) na dose de 1500 U.I via intravenosa (IV), com análogo de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), a deslorelina, na dose de 1 mg via IM. Tal protocolo confere características reprodutivas desejadas como um bom tônus uterino e cervical, e maior confiabilidade na indução de ovulação (FLEURY et al., 2007; AWAN et al., 2016).

4.1.2. Ciclo Estral Artificial

A estação de monta se inicia quando os dias ficam mais longos, justamente devido a maior luminosidade a que estes animais serão expostos. Contudo, existe o período de transição, o qual é caracterizado pela produção inadequada de hormônios reprodutivos. Dessa forma, podemos otimizar essa fase utilizando hormônios exógenos, estrógeno (E2) e progesterona (P4), no intuito de mimetizar o ciclo estral da égua.

O objetivo desses protocolos é mimetizar o ciclo estral natural desses animais, com a elevação de estrógeno, o qual é imprescindível para estimular a presença de receptores de progesterona no útero. Este hormônio é administrado após as aplicações de E2 no intuito de preparar o útero para a chegada de um embrião, uma vez que a P4 é o hormônio que está associado à manutenção da gestação.

4.1.2.1. Protocolo de Ciclo Estral Artificial preconizado pela Embrio-Equi

Os tipos de estrógeno que podem ser utilizados são o 17- β estradiol®, que deve ser administrado diariamente nas doses de 1 mL no dia do início do protocolo, 2 mL no segundo dia e 1 mL no terceiro dia; e o benzoato de estradiol, que tem uma duração mais longa, e é administrado uma dose de 2,5 mL por três dias. Após 48 horas da última aplicação de E2, coloca-se o implante intravaginal (*Figura 16*) de progesterona (P4) apenas se o animal tiver respondido ao estrógeno, ou seja, ter apresentado um edema de grau três.

Figura 16 - Implante Intravaginal de P4



Fonte: Autor (2019)

Para colocar o implante intravaginal de progesterona, deve-se lavar adequadamente a vulva, vestir uma luva virada, pegar o dispositivo e banhá-lo com terramicina spray, Terra-Cortril®, repetindo o mesmo em toda a luva. A P4-300® (300 mg/mL), de longa ação, só era utilizada após confirmação do embrião na receptora aos 15 dias, em uma dose de 5 mL, uma vez por semana, até os 120 dias de gestação (a placenta assume a produção de P4 a partir dos quatro meses de gestação), e o implante era retirado depois de três dias da aplicação da P4-300® pois esta demora dois dias para atingir seu pico (*Figura 17*).

Figura 17- Protocolo de Ciclo Estral Artificial - Embrio-Equi



Fonte: Autor (2019)

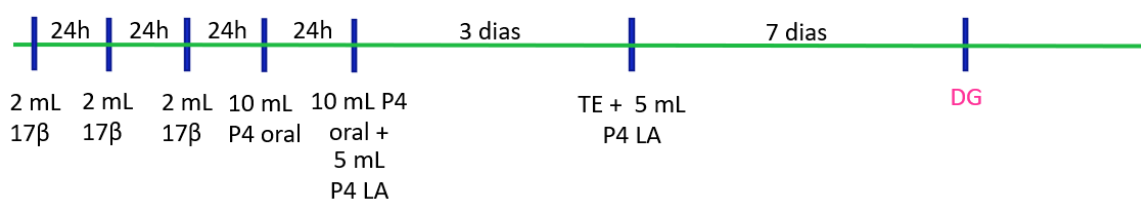
4.1.2.2. Protocolo de Ciclo Estral Artificial preconizado pela Empresa GUTAVET

Existem dois tipos de protocolos executados na GUTAVET, um para embriões de ICSI e clone, que é pré-determinado pela empresa IN VITRO, e o outro para embriões convencionais.

4.1.2.2.1. Embriões de ICSI ou Clone

São administradas doses de 2 ml de E2, 17-β estradiol®, por três dias consecutivos, e é avaliada a resposta uterina ao fármaco no dia seguinte da primeira aplicação e no último dia de administração. Caso no último dia o animal manifeste um grau três de edema uterino, 24 horas depois, é administrado progesterona oral, Altrenogest®. Repetia-se este último no dia seguinte, juntamente com a administração de P4-300® (progesterona de longa ação). Posterior a isso, no dia da TE e no dia do DG, também era feita a P4-300®, sempre na dose de 5 mL. Depois de confirmado o embrião na receptora com 15 dias, a progesterona de longa ação passava a ser fornecida uma vez por semana, na dose de 5 mL, até os 120 dias de gestação (Figura 18).

Figura 18 - Protocolo de Ciclo Estral Artificial (ICSI/clone) - GUTAVET

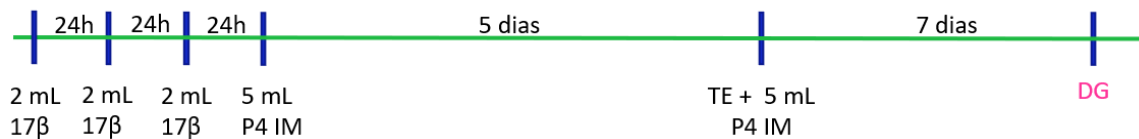


Fonte: Autor (2019)

4.1.2.2.2. Embriões Convencionais

O protocolo com estrógeno 17-β estradiol® era o mesmo dos embriões de clone ou ICSI, porém, no quarto dia após a primeira aplicação de E2, administrava-se Altrenogest® injetável IM, na dose de 5 mL. No dia da TE aplicava-se novamente progesterona, e no DG positivo, administrava-se a P4-300® na dose de 5 mL, uma vez por semana até os 120 dias de gestação (Figura 19).

Figura 19 - Protocolo de Ciclo Estral Artificial (convencionais) - GUTAVET



Fonte: Autor (2019)

4.1.3. Inseminação Artificial

A IA é uma das principais biotecnologias aplicadas à reprodução de diversas espécies. Através dela, aliando com a manipulação de sêmen, é possível otimizar o número de produtos gerados por estação de monta, diversificar os cruzamentos realizados, uma vez que não é mais necessário que o macho e a fêmea estejam na mesma propriedade, além de minimizar a transmissão de doenças venéreas não diagnosticadas, e acidentes no momento na monta natural (WEISS et al, 2003).

A IA era realizada, aproximadamente de 24 a 36 horas após a indução da ovulação, sendo que quanto mais próximo à ovulação, maiores chances de fertilização do oócito. Esse intervalo varia de acordo com a biotecnologia aplicada ao sêmen do garanhão. O sêmen fresco (in natura) tem viabilidade de, aproximadamente, 48 horas, por isso, a IA pode ser aplicada com maior antecedência à ovulação da fêmea. O sêmen refrigerado possui viabilidade de cerca de 24 horas, além de necessitar de um período de capacitação espermática. Já o sêmen congelado tem viabilidade de fertilização de, em média, somente 12 horas após sua deposição intrauterina, por isso, ao ser utilizado, é necessário que se faça o acompanhamento da fêmea através da ultrassonografia em intervalos de 1 hora, próximo ao momento estimado para ovulação.

A égua a ser inseminada era contida em tronco de contenção adequado, para que fosse realizada a limpeza do reto, palpação e ultrassonografia transretal e, posteriormente, lavagem externa da vulva e região perineal com detergente neutro, repetindo o procedimento de lavagem três vezes. Na sequência era feita a secagem com papel toalha e limpeza do vestibulo vaginal com papel toalha e gel estéril. Para a inseminação em si, coloca-se a luva de palpação ao contrário (estéril), depois essa luva era lubrificada com gel íntimo estéril, e já com a pipeta em mãos, protegendo sua extremidade, o Médico Veterinário introduz o braço pelo canal vaginal e, com auxílio do dedo indicador a cérvix é localizada. Neste momento a pipeta é introduzida até o útero. Em seguida, acopla-se uma seringa ou frasco (Botu-IA®) contendo o sêmen fresco ou refrigerado, depositando-o no corpo do útero. Para IA com sêmen congelado, primeiramente ele deve passar pelo processo de descongelamento, que foi utilizado uma temperatura de 37 °C, sendo ele exposto a ela por um minuto, na empresa Embrio-Equi, e

com a mesma temperatura, porém com apenas 20 segundos exposto à descongelação, na empresa GUTAVET. É usado uma pipeta flexível para que a deposição de sêmen seja feita na ponta do corno uterino *ipsi* lateral à ovulação. 6 a 12 horas após a ovulação pode ser administrado ocitocina na dose de 20 U.I para promover contração uterina e auxiliar na expulsão de restos seminais e de líquidos, contribuindo para a não ocorrência de endometrite patológica.

4.1.4. Citologia Uterina, Cultura Uterina e Antibiograma

Esses procedimentos eram executados apenas pela Empresa Embrio-Equi.

No início da estação de monta são realizadas citologia uterina, cultura bacteriana e fúngica, e antibiograma em grande parte de doadoras e receptoras que serão usadas no manejo reprodutivo da estação em questão. Estes exames são realizados após ser identificado líquido, pontos hiperecóticos no útero ou edema uterino exacerbado.

Os procedimentos eram realizados apenas quando o edema uterino era classificado como três ou mais, sendo utilizados para diagnosticar possíveis infecções e determinar qual a melhor forma de tratá-las.

Antes do procedimento em si de colheita de material uterino, os animais eram contidos no tronco para a limpeza do reto, palpação e ultrassonografia para definir qual a fase do ciclo estral dessas éguas. Somente aquelas que possuíam pico de estrógeno passavam pela colheita de material, para isso, previamente era realizado a lavagem externa da vulva conforme descrito no procedimento de IA.

A colheita de material para citologia é realizada através de uma haste contendo uma bacia, envolvida por uma camisa sanitária (estéril). Dentro da haste há uma escova ginecológica. Quando devidamente posicionada no interior do útero, a escova era exposta e rotacionada de três a cinco vezes para cada lado, com o objetivo de colher uma amostra para obtenção de resultados fidedignos. Ao retirar a escova do sistema reprodutivo da fêmea, era realizado *imprint* em lâmina de vidro, que depois de seca, era fixada e corada utilizando panótico rápido. Em seguida as lâminas eram avaliadas no microscópio óptico, utilizando a objetiva de 100x, com óleo de imersão, para a pesquisa de polimorfonucleares (neutrófilos).

Ao contar 100 células, o resultado é considerado positivo com a presença de 3% ou mais de neutrófilos, e o grau de infecção varia conforme a quantidade de neutrófilos encontrados.

Para colher material para cultura, é utilizada uma haste, assim como a de citologia, porém, substituindo a escova ginecológica por um swab. Após a colheita, o swab

era imerso em meio de Stuart, colocado na geladeira para, posteriormente, no laboratório ser conduzido o plaqueamento de cultivo de bactérias. As placas eram colocadas em estufa a 37° C, e o cultivo era observado de 24 a 48 horas. Além deste método, a colheita pode ser realizada utilizando um lavado de baixo volume, recuperando cerca de 50 mL de Ringer com Lactato, o qual era posteriormente centrifugado, e somente depois passava para o plaqueamento (MCKINNON et al., 2011). Também era realizado o antibiograma para verificar a sensibilidade das bactérias cultivadas aos antibióticos, colocando cinco discos de diferentes antibióticos (Sulfa com Trimetropim, Ceftriaxona, Enrofloxacina, Amicacina e Ceftiofur) após o plaqueamento da bactéria que foi cultivada anteriormente. Essa placa era colocada na estufa à 37° C e após 48 horas observava-se a formação de halos ao redor dos discos indicando ou não sensibilidade ao determinado antibiótico. Caso haja crescimento de hifas de fungos, é necessário fazer o antifungiograma.

Usualmente, como tratamento, era feita lavagem uterina com um litro solução de Ringer com Lactato, acrescido ou não de peróxido de hidrogênio a 10% ou de Iodo Povidine. Após as lavagens, procedia-se com infusão de antibiótico que foi verificado sensibilidade no antibiograma ou era iniciado a antibioticoterapia sistêmica, no caso de infecções bacterianas. Se elas fossem fúngicas iniciava-se tratamento utilizando antifúngicos.

4.1.5. Recuperação e Transferência de Embriões

Para a TE, o animal é contido da mesma forma descrita para a IA, esvazia-se o reto do animal para que as fezes não atrapalhem o massageamento do útero. Em seguida, é feita a lavagem externa da vulva e região perineal com detergente neutro, repetindo o procedimento de lavagem três vezes. Os materiais utilizados são previamente esterilizados em autoclave e estufa.

O embrião colhido da égua doadora deve estar, preferencialmente, no dia 8 pós ovulação (D8) (*Figura 20*) e a receptora deve estar no dia 5 pós ovulação (D5), em embriões convencionais. Já para os de ICSI e clone são desenvolvidos até D8 e transferidos para receptoras 4 dias pós ovulação (D4) uma vez que estes embriões possuem um atraso em seu desenvolvimento. Esses dias podem variar, sendo que a recuperação embrionária, na doadora, geralmente pode ser realizada entre os dias sete e nove pós ovulação, e a inovulação na receptora pode variar dos dias cinco e oito pós ovulação (FLEURY et al., 2007).

Figura 20 - Embrião D8



Fonte: Autor (2019)

O Médico Veterinário responsável deve vestir uma luva de palpação virada ao contrário, para minimizar os riscos de contaminação e, com a ajuda de um auxiliar, retira a sonda de TE do saco estéril, com a mão enluvada protegendo a extremidade que será introduzida no ambiente intrauterino. Posteriormente, conecta-se soro Ringer com Lactato e deixava o líquido passar pela sonda, com objetivo de retirar todo ar que existia dentro dela. Lubrificava-se o dorso da luva com gel estéril, e a sonda era introduzida através da vagina, passando pela cérvix até chegar ao útero. Para fixar a sonda dentro do útero é necessário inflar o cuff (balonete) com aproximadamente 40 a 60 mL de ar, o que impedia que a sonda ou líquido voltasse pela cérvix. Após a fixação da sonda, a mão era retirada da vagina e introduzida no reto, com isso acompanhava-se a distensão do útero, possibilitando o massagem do mesmo para ajudar o preenchimento de toda extensão dos cornos e corpo uterino. O líquido era infundido com pressão para o interior do útero.

A colheita de embriões era feita pelo método fechado na Embrio-Equi (filtro coletor com tampa) e aberto na GUTAVET (filtro coletor sem tampa) e, a cada procedimento de lavagem, era infundido em média um litro de Ringer com Lactato, dependendo do tamanho do útero de cada animal. O líquido saía por gravidade e era auxiliada pela massagem uterina. Se necessário, o procedimento pode ser repetido até que se observe a presença do embrião no filtro coletor. Em média são necessárias três lavagens.

Após a recuperação do embrião, sua manipulação acontece no laboratório. Neste local ocorria a lavagem do embrião em meio “holding” (oito a doze gotas) até que todas as sujidades fossem removidas. Posteriormente, o embrião era colocado em uma palheta estéril, de 0,25 ou 0,5 mL (dependendo do tamanho do embrião) com o próprio “holding”, na maioria das vezes, ou em pipeta de IA. Com o auxílio de uma seringa de 1 mL aspira-se uma coluna de meio, uma coluna de ar, o meio com o embrião, uma coluna de ar e completava-se a palheta com o meio. Assim ele fica isolado por duas bolhas de ar no centro da palheta, isso

impede que o embrião tenha muito movimento dentro da palheta e sofra lesões que torne inviável sua transferência e gestação.

A palheta, já com embrião, era colocada no inovulador, o qual era revestido por uma camisinha sanitária, com o objetivo de proteger o inovulador e evitar possíveis contaminações (CUERVO-ARANGO et al., 2018). O Médico Veterinário deve então vestir uma luva de palpação virada ao contrário (estéril), proteger a ponta do inovulador e lubrificar a luva com gel estéril. Posteriormente introduz a mão através da vulva, passa pela vagina, localiza a cérvix com o dedo e passa o inovulador por ela. Ao sentir a parede uterina, volta um pouco o material e progredi-se o mandril. Deve-se sempre conferir se o embrião não ficou na palheta ou na ponta do inovulador.

Depois de recuperar o embrião da doadora, é aplicada prostaglandina (PGF2 α) para lisar o CL e o animal retorne em estro. Na TE, a cérvix da receptora deve estar fechada, por consequência da ação da progesterona, devendo ter o mínimo de manipulação para que não haja a liberação de PGF2 α pelo endométrio, com o objetivo de evitar a lise do CL.

O DG é feito aos 15 dias de gestação na receptora, o qual é reconfirmado aos 45 e aos 60 dias também. Na empresa GUTAVET, além desses dias preconizados, era feito US aos 25 dias para conferir batimento cardíaco. Na Central Embrio-Equi, as receptoras eram entregues com 60 dias de gestação, já na GUTAVET, éguas prenhes de embriões convencionais eram liberadas aos 60 dias de gestação, e as com embrião de ICSI e clone aos 90 dias.

4.1.6. Aspiração Folicular

A aspiração folicular em equinos é uma técnica relativamente nova quando comparada com a técnica em bovinos. Ela foi descrita a primeira vez via transvaginal por Brück e Cook, e seus colaboradores, para folículos dominantes e imaturos, respectivamente, em 1992.

Para executar a técnica, alguns materiais como equipamento de ultrassom com probe transvaginal com agulha acoplada, bombas de vácuo e de pressão, banho maria, entre outros são indispensáveis. Os animais são sedados com neuroleptoanalgesia, usando cloridrato de detomidina (Detomidin®), na dose de 5 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, associado a butorfanol (Turgesic®), na dose de 0,1 mg/kg. Para que os ovários e a pobre intravaginal sejam manuseados com mais facilidade, utiliza-se o butilbrometo de escopolamina (Buscofin®), na dose de 20 a 30ml, pela sua ação antiespasmódica e analgésica. Posterior ao procedimento, administrava-se um anti-inflamatório e analgésico, o flunixin meglumine (Flumax®).

Os folículos a serem aspirados podem ser tanto dominantes quanto imaturos. Os dominantes não são comumente usados pois necessitam de um manejo mais complexo, tendo em vista o acompanhamento folicular, indução da ovulação, e necessitam de um frasco individualizado para sua recuperação, pois contém um líquido folicular mais viscoso. Apesar disso, possui uma vantagem, o seu tamanho, em que as células já estão mais “soltas” no antro folicular, conseqüentemente, tem uma maior taxa de recuperação e menor taxa de erros. Já os folículos imaturos são utilizados com maior frequência, tendo em vista a facilidade de se recuperar vários oócitos em uma sessão. Os folículos devem ter no mínimo 5 mm de diâmetro, portanto, não há necessidade de se fazer uma programação da aspiração, como acontece na recuperação de oócitos de folículos dominantes (HINRICHS, 2016).

Para a aspiração de oócitos, a vulva deve ser higienizada antes da introdução da probe intravaginal. Via transretal o ovário com seu folículo de escolha é posicionado próximo ao fundo de vagina e a agulha acoplada à ponta da probe transretal é empurrada para dentro do folículo, a bomba de pressão de vácuo é ligada e esse folículo é aspirado. A agulha é girada e o ovário movimentado ao mesmo tempo no intuito de “desgrudar” as células da granulosa e as do *cumulus oóphorus* facilitando a recuperação oocitária. Em seguida, injeta-se no folículo, o líquido para fazer o “flushing”, composto de heparina e Tampão Fosfato Salino (PBS), e esse líquido era aspirado. O flushing é realizado cerca de seis vezes. Ao aspirar todos os folículos, eles eram rastreados na lupa e levados ao laboratório para, por exemplo, promover sua maturação até a metáfase II. A partir desse momento, o oócito está pronto para ser fecundado, ou seja, executar a ICSI (HINRICHS, 2016).

4.1.7. Vulvoplastias

Apenas na empresa Embrio-Equi foram acompanhadas vulvoplastias.

As técnicas de vulvoplastias são empregadas para correção de angulações ou quadros de pneumovagina (PRESTES et al., 2003). Geralmente são necessárias após partos distócicos ou em éguas velhas que perderam a conformação e angulação ideal entre vulva-períneo-ânus.

Existem três técnicas que são aplicadas de acordo com cada caso. A Caslick (*Figura 21*) é a mais utilizada e consiste apenas em realizar o fechamento dos lábios vaginais (RODRIGUEZ et al., 2015), é empregada para matrizes e receptoras que irão emprenhar e parir novamente, pois, por não causar uma extensa fibrose, permite o rompimento dos tecidos na hora do parto, caso seja necessário. A técnica Pouret, utilizada para éguas doadoras senis, que perderam a conformação e ângulo entre o ânus e a vulva, predispondo a entrada de ar

(pneumovagina) e fezes, proporcionando infecções ascendentes. Já a técnica de Mondino-Merck é semelhante à Caslick, utilizada para diminuir a entrada para o canal vaginal, porém deve ser utilizada para éguas idosas, que não irão emprenhar, pois diminui consideravelmente a abertura da vulva e promove maior fibrose dos tecidos. Na rotina, apenas uma vulvoplastia com a técnica de Mondino-Merck foi realizada, e as demais foi utilizada a técnica de Caslick.

Para que seja realizada a vulvoplastia, o animal deve estar previamente sedado e com bloqueio perineural. A empresa preconizava a sedação com Cloridrato de detomidina (Detomidin®) 1%, na dose de 5 µg/Kg e o bloqueio com Cloridrato de lidocaína (Dorfin®) 2%, na dose de 15 mL,

Figura 21 - Vulvoplastia (Caslick)



Fonte: Autor (2019)

4.1.8. Sexagem Fetal

A sexagem fetal era realizada apenas pela empresa Embrio-Equi. Em equinos é uma técnica mais complexa de ser realizada do que em bovinos, devido à posição do feto.

Para realizar o diagnóstico, é utilizado a ultrassonografia transretal. As idades fetais ideais que possibilitam a visualização do sexo são de 55 a 65 dias (OLIVEIRA et al., 2014), ou 110 a 150 dias. Depois deste último período o concepto já está muito ventral dentro da cavidade abdominal, e grande, a ponto de não conseguir atingi-lo e posicioná-lo.

Em um feto de 55 a 65 dias, podemos observar tubérculos genitais duplos, os quais definem como fêmea aqueles posicionados logo abaixo da cauda, e como macho aqueles que estão próximo ao cordão umbilical. Já com 110 a 150 dias, é possível visualizar

as gônadas masculinas (testículos) (*Figura 22*) e femininas (ovários), prepúcio nos machos e glândulas mamárias nas fêmeas (LIVINI, 2010).

Figura 22 - Gônada masculina (testículo)



Fonte: Autor (2019)

4.1.9. Parto Assistido

O parto assistido foi acompanhado apenas na empresa GUTAVET.

Por volta de sete dias antes da data programada para o parto, era iniciado o plantão noturno para realizar o parto assistido. Todos os dias a égua era inspecionada, observando, principalmente, relaxamento do ligamento sacroilíaco, desenvolvimento de úbere e se saía secreção dos tetos, além de sua viscosidade (quanto mais viscoso, mais próximo do parto). Todos esses parâmetros são subjetivos e variam de animal para animal sua ocorrência ou não, mas nos auxiliam quanto à proximidade do parto.

Durante o período de estágio ocorreu apenas um parto, de uma matriz, e ele foi distócico, levando cerca de 40 minutos para ocorrer. A Médica Veterinária responsável teve que posicionar o feto corretamente, pois a fêmea já não conseguia contrair de forma suficiente para expulsá-lo. Ao reposicioná-lo, a estática fetal melhorou, e então o potro nasceu.

Figura 23 - Fim do Parto



Fonte: Autor (2019)

Após o nascimento deve-se que observar a evolução do filhote, a liberação da placenta da fêmea, e realizar a cura do umbigo. Na primeira hora pós parto, o potro tem que se levantar, nas primeiras duas horas ele deve ingerir colostro e liberar o mecônio. Já a placenta tem que ser expelida em até três horas após o parto, e depois ela deve ser analisada no intuito de verificar se tem alguma evidência de inflamação, sangramento, acúmulo de líquido, entre outros. Nesse caso, auxiliou-se o potro em todas as etapas, ajudando-o a ficar em estação, ordenhou-se a fêmea para fornecer o colostro com mamadeira. No dia seguinte foi administrado enema pois ele não conseguiu liberar todo o mecônio.

Quanto à fêmea, dois dias após o parto, foi observado um corrimento escuro na vulva. Foi realizada lavagem uterina com Ringer com Lactato por três dias e observou-se que se tratava de uma endometrite pós parto. Além desse protocolo terapêutico, inclui-se a infusão intrauterina de um grama (12,5 mL) de Ceftiofur (Minoxel®) por quatro dias e Sulfa com Trimetropim oral (Trimetox®) na dose de 20 mg/kg (50 mL) duas vezes ao dia durante oito dias. Apesar de não ter sido realizado colheita de material para cultura e antibiograma, a literatura indica (MCKINNON et al., 2011) que este procedimento seja feito.

4.2. Manejo Reprodutivo de Machos

4.2.1. Colheita de Sêmen

A colheita de sêmen era realizada para IA no próprio Haras ou para ser usado em outras propriedades que, nesse caso, era enviado de forma refrigerada (apenas a Embrio-Equi

utilizava o sêmen fora da propriedade). O modelo da vagina artificial utilizada era a de Botucatu. Para a montagem da mesma, colocava-se uma mucosa de latex, depois uma mucosa plástica onde era acoplado o copo coletor contendo uma camisinha ou saquinho coletor. Para conforto do garanhão e com o intuito de tentar mimetizar o ambiente vaginal da fêmea, a vagina artificial era preenchida com água aquecida entre 48° C a 50° C.

Como a colheita era feita em manequim, utilizava-se uma égua no cio, devidamente contida no tronco próximo ao manequim, para estimular a emissão e posterior ereção do pênis do macho. Na Embrio-Equi, ao expor o pênis, este passava por um processo de limpeza com auxílio de pano descartável e água morna, diminuindo a contaminação do material e melhorando a qualidade do sêmen (NETO et al., 2015). Posteriormente, o macho era conduzido e bem posicionado ao manequim. O responsável pela colheita desviava o pênis com a mão, introduzindo-o na vagina artificial.

A ejaculação é percebida pelo balanço da cauda (cauda em bandeira), contração dos músculos perianais, sapatear com os membros posteriores, e o pulso uretral.

4.2.2. Análise de Sêmen

Ao finalizar a colheita, o ejaculado era levado para o laboratório, onde era filtrado para tirar toda parte de gel do conteúdo seminal, analisado a olho nú quanto a cor, aspecto e viscosidade. No microscópio óptico avaliava-se a motilidade, vigor e concentração espermática. Depois ele era preparado conforme sua destinação (fresco ou refrigerado).

Os materiais utilizados para manipulação e análise do sêmen eram previamente aquecidos em placa aquecedora, com temperatura de 37° C a 38° C (*Figura 24*). Após o ejaculado ser filtrado, na Embrio-Equi, uma palheta de 0,5 mL era utilizada para coletar uma gota de sêmen que era depositada em um endorff pré preparado com 19 gotas de 0,5 mL de água destilada, para fazer a concentração espermática na câmara de Neubauer. Já na GUTAVET, a diluição era feita com 1,9 mL de água e 100 µL de sêmen. Ambos resultando em 20:1.

O próximo passo era diluir todo o sêmen 1:1 com o diluente adequado e coletar, dessa solução, uma gota para colocar na lâmina com lamínula. Esse material era levado ao microscópio óptico onde era determinado a motilidade e o vigor. A motilidade é um percentual dado ao número de células móveis, já o vigor é a intensidade com que as células se movimentam, sendo classificado de um a cinco, em que um é ruim e cinco é o máximo que se deseja. Além disso, na Embrio-Equi, também era avaliado as morfologias, as quais eram observadas no microscópio óptico (PAPA et al, 2014).

Figura 24 - Material para análise de sêmen



Fonte: Autor (2019)

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAN FS, MEHMOOD MU, SATTAR A, AHMAD N. Comparative efficacy of hCG or GnRH analogue (lecirelin acetate) on follicular dynamics, degree of endometrial edema, sexual behavior, ovulation and pregnancy rate in crossbred broodmares. *J Equine Vet Sci*, v.41, p.71-72, 2016.

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A. N., & STOUT, T. A. (2018). Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. *Veterinary Record*, vetrec-2017-104808. doi:10.1136/vr.104808.

FLEURY, PERLA D C, MARIA A ALONSO, FERNANDO A C SOUSA, AND RUBENS PAES ARRUDA. 2007. Uso Da Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG) Visando Melhorar as Características Reprodutivas e Fertilidade de Receptoras de Embriões Equinos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.27-31, jan./mar. 2007

FARIAS, L. D.; NEVES, A. P.; RECHESTEINER, S. M. E. F.; TAROUCO, A. K. 2016. Indução da ovulação em éguas: uma revisão. *Rev. Bras. Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.40, n.1, p.17-21.

HINRICHS, K. Equine oocyte recovery and ICSI in clinical practice: what can I expect?. *College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, TX*. 2016;8(3):285-290.

LIVINI M. Determination of fetal gender by transrectal ultrasound examination: field's experience. In: *American Association of Equine Practitioners Annual Convention*, 56, 2010, Baltimore. *Anais eletrônicos...*Baltimore: Maryland, 2010.

MCKINNON, A. O., SQUIRES, E. L., VAALA, W. E., VARNER, D. D. *Equine Reproduction*. Second Edition. Wiley Blackwell. 2011.

MELO, C. M. Indução de ovulação em éguas. 2006. Monografia (Doutorado em Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu.

NETO, C. R.; SILVA, Y. F. R. S.; RESENDE, H. L.; GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, P. M.; JÚNIOR, J. A. D.; FILHO, J. N. P. P.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.

Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2015. 1-6.

OLIVEIRA RA, YAMIM RS, PIVATO I, RAMOS AF. Sexagem fetal em equinos. *Revista Brasileira de Reprodução animal*. v8, p.37-42. 2014.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A., DELL'AQUA, J. A.; MONTEIRO, G. A.; ANCLER-SILVA, Y. F. R.; NETO, C. R. *Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen equino*. 2014. Disponível em: <<http://botupharma.com.br/arq/Andrologia.pdf>>. Acesso em: 11 de novembro de 2019.

PRESTES, N.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. editores da série Gonçalves, R.C.; TONIOLLO, G.H.; VICENTE, W.R.R. *Manual de Obstetrícia Veterinária*. São Paulo, Livraria Varela, p. 85 a 87. 2003.

RODRIGUEZ, M. G. K. et al; *Intervenções Obstétricas em Equinos*. *Investigação Medicina Veterinária*. v. 14, n. 1, p. 83-90. 2015.

WISS, R. R.; VIANNA, B. C.; MURADÁS, P. R. Inseminação Artificial em Éguas com Sêmen In Natura e Diluído. *Archives of Veterinary Science*. v. 8, n. 1, p. 19-22. 2003.

6. ENDOMETRITE BACTERIANA CRÔNICA EM EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA

6.1. Introdução

O agronegócio do cavalo está em constante ascensão dentro da agropecuária brasileira, sendo uma importante atividade social e econômica. Tal segmento movimentava anualmente R\$ 7,5 bilhões, gera quase 650 mil empregos diretos, e acredita-se que quase 2,5 milhões de empregos indiretos, assim, é responsável por aproximadamente 3 milhões e pessoas ocupadas. Estima-se que o Brasil possui cinco milhões de animais, e é o terceiro maior rebanho de equinos do mundo (MAPA, 2014).

As éguas são animais poliéstricos estacionais monovulatórios, e sabe-se que há influência da luz no ciclo estral dessas fêmeas (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Após a cobertura, o sêmen causa uma resposta inflamatória no intuito de eliminar restos seminais e contaminantes. No entanto, algumas éguas apresentam uma resposta exacerbada a esse processo inflamatório e o organismo não consegue debelar a infecção, levando a uma endometrite crônica.

Diversos fatores podem estar associados à essa predisposição, como a má conformação do trato reprodutivo e idade do animal. Destarte, ao se deparar com esse tipo de afecção, o Médico Veterinário deve seguir protocolos diagnósticos, principalmente para saber qual é o microrganismo que está causando a cronicidade da enfermidade, e como ela pode ser tratada.

6.2. Resposta Inflamatória e Casuística da Endometrite Crônica

Quando as fêmeas equinas são inseminadas ou passam pela monta natural, o sêmen causa uma endometrite aguda transitória que deve ser eliminada 24 a 36 horas após sua deposição, entretanto, se houver falha nesse processo, poderá resultar em uma endometrite crônica (CHRISTOFFERSEN et al., 2017). A suscetibilidade à essa enfermidade ocorre em cerca de 15% das fêmeas equinas, classificando-as como animais suscetíveis (ZENT et al., 1998), e a maior probabilidade de ocorrer uma infecção é, principalmente, devido aos efeitos do aumento da idade, lesões no sistema reprodutivo e por algum desafio bacteriano que, se tornando um ciclo vicioso de inflamação, de agressões endometriais e acúmulo de líquido, o animal pode acabar se tornando infértil (MCKINNON et al., 2011). Há a tendência desses animais terem características comuns como idade avançada, com um histórico de falhas reprodutivas consecutivas e de endometrites recorrentes (PYCOCK, 1994).

De acordo com Woodward e seus colaboradores (2013), éguas suscetíveis ao desenvolvimento de endometrite pós cobertura têm uma resposta inflamatória evidente ao sêmen, não sendo capazes de modular o processo inflamatório quando ele é iniciado. Assim, eles concluíram que após seis horas da inseminação, essas fêmeas apresentavam o pico da reação inflamatória, e é nesse período que os tratamentos devem ser iniciados para tentar minimizar os danos causados pela endometrite.

A endometrite é uma das principais causas da redução da fertilidade (RAMUSSEM et al., 2015), determinando a maior parte das perdas econômicas na indústria equina, com prevalência de 25 a 60% das éguas com problemas de fertilidade (TRAUB-DARGATZ et al., 1991). As bactérias são as principais causadoras desses prejuízos no potencial reprodutivo da fêmea equina que, segundo Causey (2006), ocorre uma infecção ascendente no sistema reprodutivo devido aos mecanismos de defesa uterino comprometidos de um animal suscetível, levando à ocorrência de uma endometrite crônica. A cronicidade dessa infecção promove a perda de epitélio e da camada mucociliar do endométrio e, como consequência, faz com que o tecido esteja mais vulnerável à adesão bacteriana (LEBLANC, 2003; CAUSEY et al., 2008).

6.3. Principais Fatores Predisponente

Para debelar a infecção, o organismo responde com alguns mecanismos de defesa como a resposta imune, a depuração física, e a drenagem linfática, em conjunto com uma boa conformação do sistema reprodutivo, os quais são imprescindíveis para garantir um ambiente uterino livre de complicações. Porém, a quebra de um desses pilares pode tornar o animal um alvo para a cronicidade dessa inflamação (CHRISTOFFERSEN et al., 2017).

A angulação anormal da vulva, a falha no fechamento dos lábios vulvares, a comissura dorsal da vulva muito próxima do ânus, entre outros (PASCOE, 1979), acabam predispondo essa fêmea à endometrite bacteriana. A vulva verticalmente posicionada com, no mínimo dois terços dos lábios vulvares localizados abaixo do assoalho pélvico, se caracteriza como uma boa conformação perineal. É necessário que a vulva possua tônus muscular para que a região tenha uma boa vedação, impedindo a entrada de microrganismos e de ar. A pneumovagina e a infecção bacteriana ascendente, pode ser evitada executando técnicas cirúrgicas como a de Caslick, de Pourret ou de Mondino-Merck. Além disso, um útero caído na cavidade abdominal e um mal fechamento cervical também são fatores que levam à retenção de líquidos uterinos pós cópula e infecções persistentes (LEBLANC et al., 1998;

LEBLANC et al., 1994). Todas essas características estão fortemente associadas a fêmeas geriátricas, onde há falha de diversos mecanismos de proteção uterina (BARBACINI et al., 2003). Sabe-se que existe um maior grau de lesões degenerativas tanto do endométrio quanto de vasos sanguíneos e linfáticos dessas éguas, diminuindo o aporte celular e hormonal ao útero, dificultando a drenagem uterina (ESTELLER-VICO, 2016).

6.4. Diagnóstico

Para realizar o diagnóstico de endometrite, são comumente usados a citologia, cultura, biópsia uterinas, e até mesmo a ultrassonografia transretal como auxílio. As espécies de bactéria predominantemente isoladas nessa afecção são a *Streptococcus equi* subspécie *zooepidemicus* e *Escherichia coli*, em uma taxa de cerca de 80% dos casos (WINGFIELD & RICKETTS, 1982; NIELSEN, 2005; LEBLANC et al., 2007). Algumas bactérias, como *E. coli*, têm a capacidade de formar aderências nas superfícies de epitélio, fazendo com que sua remoção seja difícil. Outros patógenos, como os *Streptococcus*, estimulam a produção de um exsudato inflamatório, o qual interfere no potencial fagocítico do neutrófilo. *Pseudomonas aeruginosa* secreta o biofilme, uma matriz adesiva que auxilia no crescimento e na manutenção de microcolônias bacterianas (LEBLANC, 2012). Outras bactérias isoladas do trato reprodutivo das éguas incluem *Streptococcus*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Actinobacter spp.*, *Proteus spp.* e *Citrobacter spp* (MCKINNON et al., 2011). Portanto, o diagnóstico é de suma importância para que possamos utilizar a terapêutica adequada para cada tipo de exigência microbiológica.

Alguns estudos mostraram que a *E. coli* tinha menos chance de ter um diagnóstico positivo na citologia uterina do que outras bactérias, já o *S. equi spp. zooepidemicus* tem uma probabilidade maior de ser positivo neste exame (RIDDLE et al., 2007; NIELSEN et al., 2008; BINDSLEV et al., 2008).

O gênero *Enterobacter* é composto por bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos, que possuem flagelo (DAVIN-REGLI et al., 2019), além de serem comensais naturais da microbiota intestinal animal e humana (AKBARI et al., 2016). Esses microrganismos estão associados a um fenótipo de resistência a drogas, tornando o tratamento ainda mais complexo (DAVIN-REGLI et al., 2019).

A cultura de tecidos ou fluidos uterinos, e biópsia do endométrio são métodos mais sensíveis para a identificação de *E. coli* e de outros organismos Gram negativos, do que swab para cultura, enquanto a citologia uterina é capaz de identificar o dobro de éguas com

inflamação aguda do que swab cultura uterino (LEBLANC et al. 2007; NIELSEN 2005; RIDDLE et al. 2007).

6.4.1. Citologia Uterina

A citologia uterina pode ser obtida através de uma escova citológica, sendo que a inflamação é determinada detectando três ou mais polimorfonucleares (neutrófilos) em cem células, observada em um aumento de 100x em microscópio óptico (MCKINNON et al., 2011).

Segundo LeBlanc (2012), os microrganismos que estão associados ao líquido uterino, observado via US, são mais propensos a ter neutrófilos na citologia, enquanto patógenos não associados ao líquido uterino, tendiam a não ter neutrófilos na citologia.

6.4.2. Cultura Uterina

A cultura uterina é coletada durante o estro, e a amostra pode ser recuperada por um swab de cultura protegido acoplado a uma haste de extensão estéril; através de um fluxo uterino de pequeno volume, ou limpando uma amostra de biópsia endometrial (MCKINNON et al., 2011). A coleta por baixo volume pode ser obtida por infusão de pequena quantidade de fluido intrauterino, cerca de 150 mL a 250 mL, sendo que 50 mL a 75 mL são recuperados para fazer a cultura (BOHN et al., 2014; WOODWARD et al., 2012; MCKINNON et al., 2011).

6.4.3. Biópsia Uterina

A biópsia consiste na retirada de um fragmento uterino, o qual é mantido em formol 10%, e corados, após seu processamento, com hematoxilina e eosina. Através dela é possível observar grau de inflamação (células inflamatórias) e de degeneração, e a presença de fibrose (RAMUSSEM et al., 2015).

6.4.4. Ultrassonografia

O exame ultrassonográfico nos auxilia para verificar o grau de edema uterino e presença ou não de líquido. O escore de edema endometrial, no início do estro, é um excelente indicador de infecção, sendo ele classificado de 0 a 4 de acordo com a escala de Samper (RAMUSSEM et al., 2015), além disso, pode ser observada a presença de pequenas linhas espessas e hiperecoicas na parede uterina, evidenciando a presença de ar ou pus (ESTELLER-VICO et al., 2016; LEBLANC, 2010). A presença de líquido é fisiológica de 6 a 12 horas após a cobertura, porém, se persistir por 12 horas ou mais, pode ser considerado uma endometrite persistente (ESTELLER-VICO et al., 2016).

As bactérias *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp* foram responsáveis pelo líquido intrauterino em menos de 40% dos exames ultrassonográficos. Entretanto, em éguas com *Streptococcus β -hemolíticos*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* ou leveduras isoladas do útero, foi possível observar a presença de líquido intrauterino em 45-55% dos exames ultrassonográficos (BURLESON et al. 2010).

6.5. Tratamento

6.5.1. Antibioticoterapia

Comumente, as endometrites infecciosas são tratadas por 3-5 dias durante o estro com antibioticoterapia sistêmica, ou na forma de infusão intrauterina, em combinação com lavagens terapêuticas (LEBLANC, 2009). Os antimicrobianos mais utilizados são Amicacina, Gentamicina, Enrofloxacina, Penicilina, Sulfa com Trimetopim e Ceftiofur, segundo McKinnon (2011)

O tratamento com infusão de antibiótico deve ser feito durante o estro, fase em que corresponde a uma máxima defesa uterina. A administração é feita diariamente por, em média, 5 dias durante a fase estrogênica (ESTELLER-VICO et al., 2016). Este protocolo de tratamento é considerado o mais comum para éguas com endometrite crônica (MCKINNON et al., 2011). Essa terapêutica não é indicada durante diestro, pois quando é feita na fase progesterônica, resulta em infecções bacterianas e fúngicas resistentes (HINRICHS et al., 1992). A antibioticoterapia sistêmica tem a vantagem de atingir uma concentração inibitória mínima (CIM) mais alta no sistema reprodutivo em detrimento à terapia intrauterina, com uma menor probabilidade de provocar desbalanço na flora vaginal, de os antibióticos serem degradados pelas condições uterinas, e de provocar irritação no endométrio (MCKINNON et al., 2011).

6.5.2. Mucolíticos

Os mucolíticos têm o objetivo de eliminar o muco produzido pela irritação endometrial, além da utilização de agentes quelantes por participarem da remoção de biofilme, mecanismo característico de alguns agentes bacterianos para defesa da resposta do sistema imune (LEBLANC et al., 2010), que é caracterizada por uma comunidade de diferentes bactérias, que produzem uma matriz extracelular (biofilme), as quais coexistem simbioticamente (WALKER, 2008), e que podem fornecer resistência aos antibióticos e às defesas imunológicas, acarretando em infecções crônicas (ESTELLER-VICO et al., 2016).

O uso de um agente mucolítico ajuda na limpeza do muco, além de potencializar o efeito dos antibióticos intrauterinos. Esses agentes incluem, principalmente, dimetilsulfóxido

(DMSO), querosene e N-acetilcisteína (NAC), podendo ser observado que éguas estéreis tratadas com DMSO a 30% tendem a apresentar taxas de prenhez mais altas do que as éguas infundidas com solução salina (LEBLANC, 2010; LEY et al. 1989). A NAC é um agente mucolítico que tem seu mecanismo de ação caracterizado pela ruptura de ligações dissulfeto entre polímeros de mucina, o que desfaz a viscosidade do muco intrauterino. Ademais, ela possui propriedades antioxidantes e possivelmente algumas antimicrobianas (ZUIN et al., 2005; ESTANY et al., 2007; DURU et al., 2008) e anti-inflamatórias (MCKINNON et al., 2011).

Como os patógenos induzem respostas uterinas diferentes e desenvolveram métodos diferentes para evitar a resposta imune, o tratamento com mucolíticos ou agentes quelantes tamponados pode melhorar o sucesso do tratamento. Alguns patógenos bacterianos que invadem o útero produzem biofilme que pode conferir resistência a antibióticos, contribuindo assim para uma endometrite crônica prolongada (LEBLANC 2010).

6.5.3. Lavagem Terapêutica

A lavagem uterina também é um tipo de tratamento eficaz com uma gama de soluções que podem ser usadas, incluindo DMSO, iodo, peróxido de hidrogênio (água oxigenada), querosene, entre outros, diluídos ou não em Ringer com Lactato (ESTELLER-VICO et al., 2016), entretanto, tais produtos devem ser usados com cautela por poderem resultar em inflamação, processos necróticos e esterilidade reprodutiva (MCKINNON et al., 2011).

6.5.4. Corticosteroides

Éguas com histórico de acúmulo de líquidos após o acasalamento ou com incompetência cervical também podem ser tratadas com dexametasona uma hora antes do acasalamento, ou receber doses baixas de prednisolona por 4 a 5 dias, começando de 36 a 48 horas antes da monta natural ou IA e as posteriores administrações a cada 12 horas (MCKINNON et al., 2011). Segundo Bucca e seus colaboradores (2008), essa terapêutica é associada a uma resposta inflamatória diminuída pós-acasalamento, incluindo redução do edema uterino, do líquido intrauterino e aumento da limpidez deste fluido.

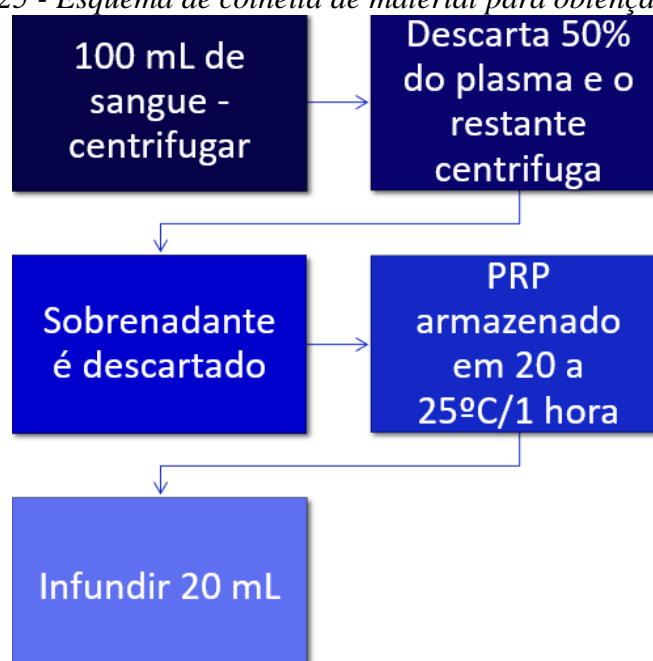
6.5.5. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP é uma fonte autógena de simples coleta e com baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento que atuam na reparação tecidual por possuir uma ação mitogênica, quimiotática e neovascular. É derivado do sangue total, e apresenta de três e cinco vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos (GONSHOR, 2002; KEVY &

JACOBSON, 2004). Este método de tratamento intrauterino está em estudo pois alguns animais não respondem a tratamentos convencionais, como a lavagem e infusão uterina de antibióticos, e por saber que o PRP é capaz de controlar a inflamação e promover a cicatrização de tecidos. Isso ocorre, pois as plaquetas secretam moléculas bioativas com potencial regenerativo (METCALF, 2014).

Segundo Vendruscolo et al. (2012), ao testar diversos protocolos de obtenção de PRP, eles puderam concluir que o trabalho de Carmona et al. (2007) foi o mais eficiente. Eram coletadas amostras de 100 mL sangue da jugular, as quais eram homogeneizadas e imediatamente centrifugadas a 120 g, durante 10 minutos. De cada tubo centrifugado era descartado 50% do plasma, na intenção de ter um plasma mais concentrado em plaquetas na segunda centrifugação. Para isso, o plasma que restou após a primeira centrifugação foi separado em dois tubos plásticos, os quais foram posteriormente levados à centrifugação. Em seguida, o plasma foi dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) que foi descartado, e a fração remanescente denominada plasma rico em plaquetas. Os tubos com PRP foram acondicionados em caixa isotérmica com gelo em uma temperatura entre 20-25°C, por uma 1 hora até o momento da aplicação. A infusão foi de 20 mL de PRP distribuídos nos dois cornos uterinos (*Figura 25*).

Figura 25 - Esquema de colheita de material para obtenção de PRP



Fonte: Autor (2019)

A utilização dessa terapia na luz uterina provoca uma redução na porcentagem de neutrófilos no fluido uterino, modulando a resposta inflamatória local (REGHINI et al., 2016). Sabe-se também que a taxa de prenhez em fêmeas subférteis pode aumentar de 20%

para 80% após tratamento com PRP. Destarte, em éguas suscetíveis à endometrite, a infusão intrauterina de PRP autólogo pode levar à menor incidência de atraso na depuração uterina após inseminação artificial, obtendo melhores taxas de prenhez (METCALF, 2014).

6.5.6. Células Tronco Mesenquimais (CTM)

As CTM têm sido utilizadas experimentalmente com sucesso pois podem renovar e dar origem a células especializadas. Em equinos, os locais mais comuns de coleta dessas células são do tecido adiposo e da medula óssea. Após a recuperação do material, ele é centrifugado, ressuspenso, depois é novamente centrifugado e passa por mais uma ressusensão, para posterior infusão no útero da égua (MAMBELLI et al., 2013). Pavão (2013) observou uma redução de 30% de fibrose instalada no útero de éguas tratadas com células tronco. A utilização de CTM no endométrio é um procedimento seguro que leva a uma leve e transitória resposta inflamatória, não tendo ocorrência de nenhuma alteração clínica ou reprodutiva mostrando-se uma promissora ferramenta para o tratamento de fibrose endometrial (ALVARENGA et al., 2016a).

O uso de CTM reduz significativamente o número de neutrófilos, em cerca de 50%, no lúmen uterino 6 horas após o desafio espermático, e diminui a concentração de citocinas inflamatórias, sendo capaz de modular a resposta imune, nesta situação, em éguas normais (FERRIS et al., 2014).

7. RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM ÉGUA SENIL COM ENDOMETRITE BACTERIANA CRÔNICA: RELATO DE CASO

Um equino, fêmea, da raça Quarto de Milha, de 24 anos de idade, paciente de outro Médico Veterinário, na estação de monta 2017/2018, teve diagnóstico positivo de gestação após 15 dias da sua ovulação, que foi confirmada com 60 dias. Por volta do quinto mês, foi feito novamente o exame ultrassonográfico e o feto apresentava condições normais de desenvolvimento. Depois disso, a égua não passou por novos exames.

No nono mês de gestação, a pedido dos proprietários, o Médico Veterinário responsável pelo animal foi chamado, pois a fêmea não demonstrava distensão abdominal condizente com uma gestação em seu terço final. Em um novo exame ultrassonográfico, foi diagnosticado um feto mumificado, e um protocolo de indução de aborto foi adotado à base de estrógeno, associado à corticoide e PGF2 α , no intuito de promover o relaxamento de cérvix e contração uterina para que o conteúdo fosse expelido.

Após a expulsão do feto, em um novo exame de US, foi diagnosticado uma infecção uterina. Assim, foi instituído um tratamento com Enrofloxacina (Zelotril® 10%), porém, não foi realizado cultura e antibiograma do conteúdo intrauterino. Mesmo com diferentes terapias com antibióticos, Enrofloxacino e Ceftiofur, sendo administrados em vários ciclos estrais, não se obteve êxito na recuperação embrionária ao longo de duas estações de monta.

Os profissionais da Embrio-Equi foram chamados pelos proprietários para o atendimento, com o objetivo de se obter um produto, por se tratar de uma fêmea de alto valor zootécnico. De imediato, foi realizado exame completo do trato reprodutivo, mostrando que o animal apresentava ciclo estral normal e um quadro de pneumovagina associada à infecção uterina. Assim, iniciou-se um protocolo de indução de cio a base de PGF2 α (Luteglan® 7,5 mg) com objetivo de lisar CL e induzir liberação de gonadotrofinas. Ao atingir o pico de estrógeno, o animal apresentava edema exacerbado, indicando endometrite, e foi feita a coleta de material uterino com swab no meio de Stuart, o qual foi encaminhado para laboratório de análises clínicas para a realização de cultura e antibiograma.

O exame constatou a presença da bactéria *Enterobacter aerogenes*, sendo sensíveis a alguns antimicrobianos como Enrofloxacina, Ceftiofur, Gentamicina, Ceftriaxona, Cloranfenicol, entre outros. E resistente a Ampicilina, Cefalexina, Amoxicilina com Clavulanato, entre outros.

Foi realizada a infusão de 10 mL de DMSO, 10 mL de peróxido de hidrogênio (água oxigenada), 12 mL de NAC e 18 mL de Botukiller®. O DMSO tem função anti-inflamatória, mucolítica e como potencializador de outros fármacos; a água oxigenada é usada como antisséptico; a NAC tem seu principal efeito como mucolítico e o Botukiller é um sanitizante. Essa solução tem o intuito de remover biofilme, e permaneceu no útero da égua por quatro dias e, somente depois, iniciou-se o protocolo de lavagens terapêuticas e de infusões com antimicrobiano. Optou-se pelo uso de Ceftriaxona dissódica (Amplospec® 1 g) como antibiótico para controle da infecção uterina pois, apesar de outros antibióticos considerados de primeira escolha terem se apresentado como sensíveis no antibiograma, os mesmos já haviam sido utilizados em terapias anteriores nesse animal. Foi usado 2 g por infusão, resultando em 20 mL de solução.

No primeiro dia de tratamento foi realizada uma lavagem uterina utilizando três litros de Ringer com Lactato, sendo que dois deles continham água oxigenada 10%, e foi administrado 1 mL de ocitocina (Placentex®) de manhã, e 1 mL a tarde. No dia seguinte, o tratamento foi com 1 L de Ringer com Lactato com DMSO 5% e água oxigenada 10%, 1L de Ringer com Lactato somente com água oxigenada 10%, e 1 L de Ringer com Lactato sem adicionais, e foi iniciado o protocolo com infusão intrauterina de antibiótico. No outro dia, já houve uma diminuição significativa do líquido intrauterino, então optou-se por apenas lavar com 2 L de Ringer com Lactato e fazer a infusão com Ceftriaxona.

Após esses três dias de tratamento, foi observado dois folículos dominantes (um de 35 mm x 36 mm e outro de 48 mm x 52 mm), assim, foi realizado o protocolo normal (2 L de Ringer com Lactato e infusão de antibiótico) e foi administrado hCG (Vetecor®) e análogo de GnRH (Strelin®), no intuito de induzir a ovulação. No quinto dia, foi feita a lavagem uterina com 2 L de Ringer com Lactato e a infusão de 20 mL de Ceftriaxona na parte da manhã, e por volta de 17 horas foi feita a IA com sêmen refrigerado pós ovulação de um dos folículos.

No primeiro dia após a ovulação o útero apresentava uma quantidade muito pequena de líquido, e foi infundido novamente 2 L Ringer com Lactato e 20 mL de antimicrobiano intrauterino. No dia seguinte, não havia mais líquido no exame ultrassonográfico, e somente a infusão de Ceftriaxona foi feita, além disso, foi realizada a sutura provisória, com quatro pontos simples, do terço dorsal da vulva afim impedir a entrada de ar e uma possível recontaminação. No total foram sete dias de tratamento com lavagem terapêutica, e seis dias de infusão intrauterina de Ceftriaxona.

Nove dias após a ovulação, o Médico Veterinário responsável retornou à propriedade para fazer a colheita de embrião da égua. Como se trata de um animal senil, em que é característico um atraso no desenvolvimento embrionário, o embrião foi colhido no D9 (*Figura 26*), porém era um embrião com desenvolvimento de 7 dias, ou seja, um blastocisto inicial. Ao final desse procedimento foi aplicado PGF2 α para que ela voltasse em cio 3 a 4 dias depois. O embrião foi transportado até outra propriedade próxima, para ser inovulado em uma receptora D5. Sete dias depois foi realizado o diagnóstico negativo de gestação na receptora.

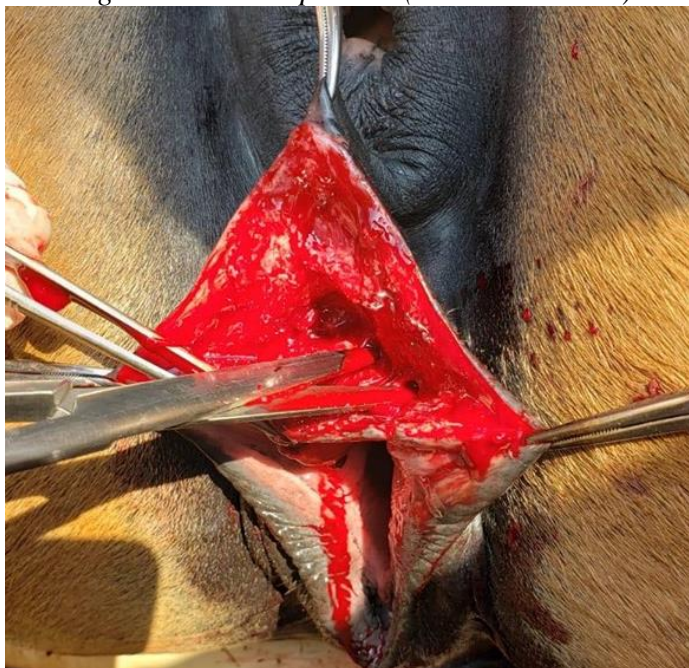
Figura 26 - Embrião em fase de blastocisto inicial colhido 9 dias após a ovulação



Fonte: Autor (2019)

Após três dias, foi realizada uma vulvoplastia com a técnica de Mondino-Merck (*Figura 27*), a qual é responsável por rebaixar o teto vaginal, diminuindo seu diâmetro. Para isso o animal foi sedado com detomidina (Detomidin®) 5 μ g/kg, e recebeu bloqueio perineural com botão anestésico dorsal à comissura dorsal da vulva e na transição de pele e mucosa dos lábios vulvares, com lidocaína. Essa cirurgia é indicada para éguas doadoras de embrião. Foi administrado Enrofloxacin 5 mg/kg IM como antibioticoterapia, Flunixin Meglumine (83 mg/mL) na dose de 1,1mg/Kg a 2,2 mg/Kg como anti-inflamatório, uso tópico de pomada cicatrizante (Vetaglos®) e spray repelente (Topline®) na ferida, como terapêutica pós cirúrgica.

Figura 27 - Vulvoplastia (Mondino-Merck)



Fonte: Autor (2019)

Ao retornar em cio, o animal apresentou, novamente, sinais de infecção uterina como líquido inflamatório, e os proprietários optaram por deixar a própria égua levar a gestação à termo em detrimento à TE. Assim, o tratamento utilizando a lavagem terapêutica com 2 L de Ringer com Lactato sendo um com 5% de Iodo Polvidine (PVPI) foi o de eleição. No dia seguinte ela já não apresentava líquido intrauterino, e foi realizada a indução de ovulação com o mesmo protocolo anterior. Após 24 horas, a égua foi inseminada com sêmen refrigerado pós ovulação, por isso, a IA foi feita na ponta do corno *ipsi* lateral à ovulação, utilizando uma pipeta flexível. 15 dias após a ovulação o DG foi negativo.

Assim, pode-se observar que em dois anos sem conseguir recuperar embrião dessa fêmea, após o tratamento definido pelo Médico Veterinário, foi possível recuperar um blastocisto inicial, ou seja, a terapêutica foi eficaz para a endometrite e, conseqüentemente, foi possível obter um embrião viável. No entanto, ao tentar fazer com que o animal ficasse gestante, por algum motivo, não foi confirmada a prenhez nessa égua.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante todos os estágios realizados, ao longo dos dias passei a ter mais certeza do quanto quero trabalhar com Reprodução Equina. Os estágios curriculares foram de suma importância para meu crescimento intelectual e pessoal, devido ao alto nível de conhecimento dos supervisores, Carlos Schutzer e Maria Augusta, e pela disponibilidade e dom de transmitir conhecimento.

Alguns procedimentos que nunca tinha visto durante a graduação, e que são de suma importância para métodos diagnósticos e de tratamento, aprendi com excelência. Alguns deles são citologia e cultura uterinas e antibiograma, juntamente com saber qual a conduta a ser tomada ao visualizar os resultados. Além disso, pude acompanhar um parto, que também nunca tinha presenciado, e como manejar um potro recém-nascido.

Ao realizar atividades em duas empresas distintas, pude ter contato com Centrais de realidades diferentes, e que me possibilitaram enxergar a importância da constante atualização e busca pelos melhores resultados, sempre presando pela saúde e bem-estar dos animais trabalhados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA MA, CARMO MT, SEGABINAZZI LG, GUASTALI MD, MAIA L, LANDIM- ALVARENGA FC. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. *J Equine Vet Sci*, v.42, p.12-18, 2016a.

AKBARI M, BAKHSHI B, NAJAR PEERAYEH S. 2016. Particular distribution of *Enterobacter cloacae* strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. *Iran Biomed J* 20:49 –55.

BARBACINI S, NECCHI D, ZAVAGLIA G, SQUIRES EL. Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. *J Equine Vet Sci* 2003; 23:493-6.

BINDSLEV MM, VILLUMSEN MH, PETERSEN MM, NIELSEN JM, BOGH IB, BOJESEN AM. Genetic diversity of *S. equi* ssp. *zooeconomicus* and *E. coli* isolated from the reproductive tract of the mare. *Reprod Domest Anim* 2008;43:110–11.

BOHN, AA; FERRIS, RA; & MCCUE, PM (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.

BRÜCK I, RAUN K, SYNNESTVEDT B, et al: Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique (short communication). *Equine Vet J* 1992;24:58-59.

BUCCA S, CARLI A, BUCKLEY T, DOLCI G, FOGARTY U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent post breeding induced endometritis. *Theriogenology* 2008;70:1093–2000.

BURLESON, M.D., LEBLANC, M.M., RIDDLE, W.T. AND HENDRICKS, K.E.M. (2010) Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. In: *Equine Reproduction X Proceedings International Symposium on Equine Reproduction*, Ed: M. Evans, Lexington, KY. p S103.

CARMONA, J. U.; ARGUELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 17, p. 167-170, 2007.

CAUSEY RC. Making sense of equine uterine infections : The many faces of physical clearance. 2006;172:405-421. doi:10.1016/j.tvjl.2005.08.005

CAUSEY RC, MILETELLO T, O'DONNELL L, LYLE SK, PACCAMONTI DL, ANDERSON KJ, EILTS BE, MORSE S, LEBLANC MM, 2008: Pathologic Effects of Clinical Uterine Inflammation on the Equine Endometrial Mucosa, Vol. 54. American Association of Equine Practitioners, San Diego, pp. 276–277.

CHRISTOFFERSEN, M., & TROEDSSON, M. (2017). Inflammation and fertility in the mare, 52, 14–20.

COOK NL, SQUIRES EL, RAY BS, et al: Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: preliminary results. J Equine Vet Sci 1992;12:204-207.

DAVIN-REGLI, A., LAVIGNE, J.-P. & PAGÈS, J.-M. (2019). Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clinical Microbiology Reviews, 32 (4). doi: 10.1128 / cmr.00002-19

DURU M, NACAR A, YONDEN Z, KUVANDIK G, HELVACI MR, KOC A, AKAYDIN Y, OKSUZ H, SOGUT S, 2008: Protective effects of N-acetylcysteine on cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. Ren Fail 30, 453–459.

ESTANY S, PALACIO JR, BARNADAS R, SABES M, IBORRA A, MARTINEZ P, 2007: Antioxidant activity of N acetylcysteine, flavonoids and alpha-tocopherol on endometrial cells in culture. J Reprod Immunol 75, 1–10.

ESTELLER-VICO, A.; *et al.* Effects of stradiol on uterine perfusion in anesthetized cyclic mares affected with uterine vascular elastosis. Animal Reproduction Science. v. 164. p. 57-63. 2016.

FERRIS, R.A.; FRISBIE, D.D.; MCCUE, P.M. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. Theriogenology, Los Altos. v. 82. p. 36-42. Jan. 2014.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry, v.22, p.547-557, 2002.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513.

HINRICHS K, SPENSLEY MS, MCDONOUGH PL. Evaluation of progesterone treatment to create a model for equine endometritis. *Equine Vet J* 1992;24:457–61.

KEVY, S.V.; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *The Journal of Extra Corporeal Technology*, v.36, p.28-35, 2004.

LEBLANC MM, 2009: The current status of antibiotic use in equine reproduction. *Equine Vet Educ* 21, 156–166.

LEBLANC MM, MAGSIG J, STROMBERG AJ: Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2007;68:403-412.

LEBLANC MM, NEUWIRTH L, ASBURY AC, TRAN T, MAURAGIS D, KLAPSTEIN E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Vet J* 1994;26:109-13.

LEBLANC MM, NEUWIRTH L, JONES L, CAGE C, MAURAGIS D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology* 1998;50:49-54.

LEBLANC MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod Domest Anim* 2010;45(Suppl 2):21-7.

LEBLANC MM. Pathogenesis of post-mating induced endometritis and chronic bacterial endometritis. Proceedings of the 18th Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians SIVE. 2012.

LEBLANC MM. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Ball BA (ed.) *Recent Advances in Equine Reproduction*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, 2003.

LEY WB, BOWEN JM, SPONENBERG DP, LESSARD PN, 1989: Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology* 32, 263–276.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em: 11 de novembro de 2019.

MAMBELLI, LI, WINTER, GHZ, KERKIS, A., MALSCHITZKY, E., MATTOS, RC, & KERKIS, I (2013). A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. *Theriogenology*, 79 (5), 744-750.

MCKINNON, A. O., SQUIRES, E. L., VAALA, W. E., VARNER, D. D. *Equine Reproduction*. Second Edition. Wiley Blackwell. 2011.

METCALF ES. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). *J Equine Vet Sci*, v.34, p.128, 2014.

NIELSEN JM: Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 2005;64:510-518.

NIELSEN JM, TROEDSSON MH, ZENT WW. Results of bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in a practice in Denmark and in Central Kentucky, USA. In: *Proceedings of The Chronically Infertile Mare: Havemeyer Foundation Workshop*, Hilton Head Island, SC, 5–8 Nov 2008, pp. 34–5.

PASCOE, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. *J Reprod Fert Suppl*. v. 27. p.299-305. 1979

PAVÃO GDA. Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa. 2013.66f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, 2013.

PYCOCK, J.F. Assessment of oxytocin and intrauterine antibiotics on intrauterine fluid and pregnancy rates in the mare. *Proc Am ASSOC equine Pract*. v. 40. p.19-20. 1994.

REGHINI MF, RAMIRES NETO C, SEGABINAZZI LG, CASTRO CHAVES MM, DELL'AQUA CP, BUSSIÈRE MC, DELL'AQUA JA JR, PAPA FO, ALVARENGA MA.

Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*, v.86, p.516-522. 2016.

RASMUSSEN, CD, PETERSEN, MR, BOJESSEN, AM, PEDERSEN, HG, LEHN-JENSEN, H. & CHRISTOFFERSEN, M. (2015). Equine Infectious Endometritis-Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35 (2), 95-104.

RIDDLE, W.T., LEBLANC, M.M. AND STROMBERG, A.J. (2007) Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology* 68, 395-402.

TRAUB-DARGATZ JL, SALMAN MD, VOSS JL. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:1745–1747.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L.F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p. 106-110, 2012.

WALKER C, 2008: Biofilms, what are they, and why should you know about them. In: LeBlanc MM (ed.), *The Havemeyer Foundation The Chronically Infertile Mare*. The Havemeyer Foundation, Hilton Head Island, South Carolina, pp. 30–31.

WINGFIELD DIGBY NJ, RICKETTS SW: Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. *J Reprod Fertil Suppl*1982;32:181-185.

WOODWARD EM, CHRISTOFFERSEN M, CAMPOS J, BETANCOURT A, HOROHOV D, SCOGGIN KE, et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction* 2013;145: 289–96.

WOODWARD, E. M., CHRISTOFFERSEN, M., CAMPOS, J., SQUIRES, E. L., & TROEDSSON, M. H. T. (2012). Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*, 78(3), 495–501.

ZENT, W., TROEDSSON, M. H. T., & XUE, J. L. (1998). Postbreeding uterine fluid faccumulation in a normal population of thoroughbred Mares: A field study. Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, 44, 64–65.

ZUIN R, PALAMIDESE A, NEGRIN R, CATOZZO L, SCARDA A, BALBINOT M, 2005: High-dose N-acetylcysteine in patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Clin Drug Investig 25, 401–408.