

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**SEXAGEM FETAL POR ECOGRAFIA**

Bruno Correia Carneiro

Orientador

**António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Coorientadores

**Dra. Carolina Caldeira Ribeiro Maia**

**Dr. Carlos António de Carvalho Fernandes**

**Dra. Lori Lenihan**

Porto 2012

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**SEXAGEM FETAL POR ECOGRAFIA**

Bruno Correia Carneiro

Orientador

**António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Co-Orientadores

**Dra. Carolina Caldeira Ribeiro Maia**

**Dr. Carlos António de Carvalho Fernandes**

**Dra. Lori Lenihan**

Porto 2012

## Resumo

Este relatório de estágio tem por objetivo a descrição do trabalho desenvolvido ao longo das dezasseis semanas do estágio oficial do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária que decorreram de 19 de Setembro de 2011 a 7 de Janeiro de 2012. Durante o referido período de estágio acompanhei a Dra. Carolina Maia durante 6 semanas em Évora, o Dr. Carlos Fernandes na empresa Biotran no Brasil durante 4 semanas e por fim a Dra. Lori Lenihan na clínica Lander Vet na Califórnia durante 5 semanas.

No decorrer deste estágio tive oportunidade de contactar com diversas áreas relacionadas com a medicina e cirurgia de bovinos sendo que o interesse principal bem como a maior parte do contacto clínico tenha sido o acompanhamento reprodutivo de rotina em bovinos de leite. Em todos os referidos locais de estágio acompanhei os Médicos Veterinários no controlo reprodutivo e clínico às diversas explorações agrícolas onde estes prestam os seus serviços, tendo desta forma a oportunidade de adquirir uma destacada prática bem como adquirido numerosos conhecimentos através de discussões com o veterinário ou mesmo com os produtores.

Ao longo do presente relatório descrevo os 3 locais onde efetuei o estágio bem como os temas principais, abordados nesses mesmos locais e apresento de uma forma sucinta, toda a casuística observada.

O tema principal deste relatório é a sexagem fetal por ecografia, uma vez que foi um tema sobre o qual adquiri elevada experiência ao longo do estágio e que a meu ver apresenta uma vantagem futura para as explorações pecuárias bovinas. Desta forma optei por fazer uma revisão bibliográfica acerca deste tema, apresentando as suas atuais aplicações bem como as aplicações nas diferentes realidades onde tive a oportunidade de estagiar.

O contacto com a realidade prática ao longo destes quatro meses de estágio, permitiram-me uma elevada aquisição de conhecimentos além de consolidar toda uma bagagem teórica lecionada ao longo de cinco anos de curso.

Ficou para mim claro que em Veterinária existe sempre algo novo a aprender e havendo interesse nesse sentido o curso de Medicina Veterinária, ao fim de cinco anos, ainda mal começou.

# Agradecimentos

**Para a execução deste trabalho várias pessoas contribuíram de alguma maneira. Considero que todas essas ajudas foram fundamentais. A todas essas pessoas o meu “Muito Obrigado”.**

Gostaria de agradecer ao Professor António Rocha, por ter aceite ser meu Orientador e por todo o apoio, disponibilidade, e simpatia prestada no decorrer deste estágio, em que todas as suas opiniões e conselhos se mostraram sempre muito úteis.

Aos meus Coorientadores, Dra. Carolina Maia, Dr. Carlos Fernandes e Dra. Lori Lenihan, o meu muito obrigado, por me terem aceitado como estagiário e por toda a preciosa transmissão de conhecimentos, muitas vezes conhecimentos práticos tão necessários e imprescindíveis no trabalho de campo e que não se aprendem em nenhum livro.

Agradeço aos meus pais Francisco e Maria Adelaide e à minha irmã Ivone, pelas oportunidades, por me apoiarem sempre nas minhas decisões e por me terem ajudado a superar todos os obstáculos ao longo destes 5 anos de curso, depositando total confiança em mim.

À Sara, minha namorada, o meu muito obrigado pela paciência muitas vezes necessária para me ouvir, pelo incentivo necessário nas horas menos boas, pela ajuda e Amor demonstrado nos últimos 6 anos das nossas vidas.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos pelos bons momentos passados os quais contribuíram também para a minha formação.

A todos os meus colegas e amigos de curso, o meu muito obrigado, pelo apoio, companheirismo e amizade.

# Abreviaturas

**AM-** Âmnio  
**CL-** Corpo Lúteo  
**CLG-** Corpo Lúteo Grande  
**CLM-** Corpo Lúteo Médio  
**CLP-** Corpo Lúteo Pequeno  
**CT-** Cavidade Torácica  
**CU-** Cordão Umbilical  
**DG-** Diagnóstico de Gestação  
**ELISA-** Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay  
**EUA-** Estados Unidos da América  
**FIV-** Fertilização In Vitro  
**GnRh-** Gonadotrophins Releasing Hormone  
**IATF-** Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
**M-** Mamilos  
**MA-** Membro Anterior  
**MP-** Membro Posterior  
**PGF<sub>2α</sub>-** Prostaglandina F2 alfa  
**PP-** Pênis + Prepúcio  
**PRID-** Progesterone Releasing Intravaginal Device  
**PSPB-** Proteína B Específica de Prenhez  
**PU-** Pregas Urogenitais  
**TE-** Transferência Embrionária  
**TG-** Tubérculo Genital  
**TGF-** Tubérculo Genital Feminino  
**TGM-** Tubérculo Genital Masculino  
**UN-** Úngula  
**VC-** Vértebra Caudal  
**VL-** Vértebras Lombares

# Índice

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introdução .....</b>                                              | <b>1</b>  |
| <b>Évora.....</b>                                                    | <b>1</b>  |
| Casuística .....                                                     | 1         |
| Considerações.....                                                   | 3         |
| <b>Brasil .....</b>                                                  | <b>4</b>  |
| Casuística .....                                                     | 5         |
| Considerações.....                                                   | 7         |
| <b>Califórnia .....</b>                                              | <b>8</b>  |
| Casuística .....                                                     | 9         |
| Considerações.....                                                   | 13        |
| <b>Sexagem Fetal Bovina por Ecografia.....</b>                       | <b>15</b> |
| <b>Equipamento de ecografia.....</b>                                 | <b>15</b> |
| <b>Marcas anatómicas .....</b>                                       | <b>17</b> |
| Morfologia embrionária e desenvolvimento fetal .....                 | 17        |
| Alteração morfológica e posição anatómica do tubérculo genital ..... | 19        |
| <b>Possíveis utilizações práticas.....</b>                           | <b>20</b> |
| <b>Ecografia no diagnóstico do sexo fetal .....</b>                  | <b>21</b> |
| <b>Abordagem inicial .....</b>                                       | <b>21</b> |
| Aparência do tubérculo genital .....                                 | 21        |
| Procedimento prático.....                                            | 22        |
| Obtenção da imagem .....                                             | 23        |
| O macho em diferentes projeções .....                                | 24        |
| A fêmea em diferentes projeções.....                                 | 25        |
| Resultados de sexagem fetal .....                                    | 26        |
| <b>Experiencia adquirida durante o estágio.....</b>                  | <b>26</b> |
| <b>Considerações Finais .....</b>                                    | <b>28</b> |
| <b>Bibliografia .....</b>                                            | <b>30</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                                  | <b>32</b> |

# **Introdução**

## **Évora**

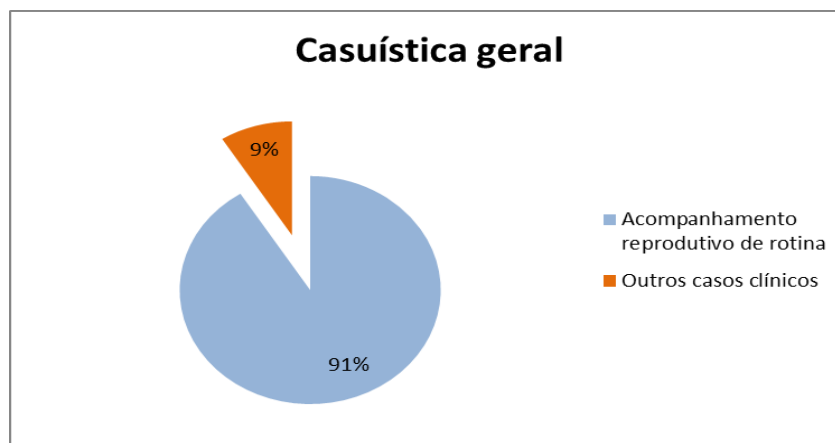
O primeiro período de estágio decorreu em Évora de 19 de Setembro a 29 de Outubro de 2011, sob tutela da Dra. Carolina Maia durante os seus serviços de acompanhamento clínico e reprodutivo a explorações leiteiras da região. A área de atuação cobre todo o distrito de Évora bem como alguns concelhos do distrito de Beja e de Portalegre. As explorações leiteiras visitadas apresentavam um tamanho variável de 100 animais por exploração até 2500 animais, sendo que predominaram as explorações com mais de 500 animais no efetivo.

No Alentejo a pecuária apresenta um grande peso na agricultura regional. A criação de bovinos de carne ultrapassa em grande escala a de bovinos de leite. No entanto as explorações leiteiras existentes são em geral de dimensão superior à média nacional. Na região o sistema de produção leiteira é maioritariamente intensivo, com as propriedades a possuírem uma vasta área de terreno cultivável na qual aplicam bianualmente um sistema de monocultura milho silagem (Primavera/Verão) e azevém silagem (Outono/Inverno).

O contacto clínico foi exclusivamente com bovinos leiteiros onde a raça Holstein predomina consideravelmente na constituição do efetivo, podendo observar-se alguns animais de raça Jersey e Brown-Suisse.

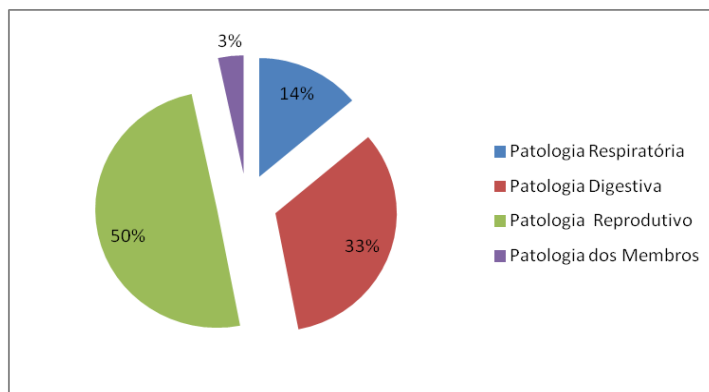
## **Casuística**

Ao longo das 6 semanas tive oportunidade de realizar aproximadamente 3000 palpações rectais durante as visitas de acompanhamento reprodutivo de rotina a 19 explorações leiteiras diferentes sendo que este procedimento foi aquele que mais realizei e no qual adquiri maior experiência (Figura 1). Durante algumas destas visitas foram feitas também a recolha dos registos reprodutivos informáticos para uma posterior análise da evolução dos Índices Reprodutivos.



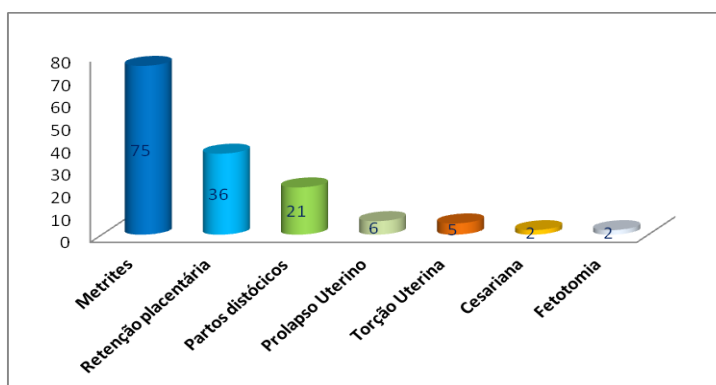
**Figura 1** - Casuística Geral.

A restante casuística resulta da resposta a diversas chamadas (algumas de emergência, outras não) sendo que as patologias reprodutivas com 147 casos (50%) e as patologias digestivas com 98 casos (33%) dominam a lista do total de casos clínicos. As patologias respiratórias representam 14% (41 casos) das patologias observadas enquanto os restantes 3% diz respeito a patologias dos membros (Figura 2).



**Figura 2** – Expressão de cada tipo de patologia dos “outros casos clínicos”.

Em relação às patologias reprodutivas, a metrite foi a mais observada com 75 casos (51%) seguindo-se de retenção placentária com 36 casos (25%) (Figura 3). Uma percentagem elevada (20%) das vacas que tinham metrite (n=15), apresentaram concomitantemente patologia digestiva. O número de partos distócicos realizados foi de 21 (14%), os quais foram resolvidos por tração, após a realização das diversas técnicas obstétricas de reposicionamento do vitelo no canal de parto. No entanto, houve ainda a realização de outros 9 partos (6%) dos quais resultaram a realização de 5 manobras de resolução de torção uterina, 2 cesarianas e 2 fetotomias (Figura 3).



**Figura 3** – Nº de casos observados por patologia reprodutiva dos casos de ambulatório.

Foram ainda realizadas as provas de Intradermotuberculinização e recolha de sangue (Leucose, Brucelose) em 6 explorações leiteiras, perfazendo um total de 4000 animais.

## **Considerações**

Os períodos de estágio que realizei em Évora a par com os outros dois locais foram sem dúvida muito proveitosos para estes 4 meses de estágio curricular e para a minha vida futura. A minha experiência como aluno do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária e com contacto ao longo de toda a minha vida com a produção de bovinos de leite, permite-me fazer várias observações acerca do sistema de produção dos diferentes locais.

Em Évora o sistema de produção leiteira com o qual contactei é significativamente diferente do sistema de produção na região de Entre Douro e Minho. A quase totalidade dos produtores de leite a quem a Dra. Carolina dá assistência é de origem holandesa, os quais por visão de oportunidade de negócio se instalaram em Portugal nos últimos 20-30 anos, comprando extensas áreas de cultivo onde instalaram as grandes explorações de leite. Daqui advém que os profissionais que gerem as explorações leiteiras são por norma Holandeses, e todos eles têm um grau de licenciatura ou mestrado em áreas da produção animal e agrícola, profissionalizando assim o sector. As grandes áreas e grandes instalações permitem uma produção massiva de leite para a escala Portuguesa, assemelhando-se mais ao estilo de produção com que me deparei na Califórnia. Sendo as explorações de leite de grande dimensão, estas funcionam como uma empresa empregadora em grande escala, deixando assim de funcionar num sistema de produção familiar, como acontece em quase todas as explorações de leite do Entre Douro e Minho. Devido também ao elevado nº de animais, o manejo reprodutivo bem como o manejo alimentar apresentam algumas diferenças por forma a maximizar a produção e diminuir os custos por animal da exploração, funcionando desta forma mais numa vertente de prevenção do que de tratamento. No que diz respeito ao manejo reprodutivo, e de forma a diminuir a mão-de-obra e tempo gastos com manipulação individual dos animais, são utilizados por rotina programas de sincronização de cio/ovulação em todas as fêmeas em produção. O médico veterinário, em conjunto com o gerente, estipula os protocolos a serem utilizados bem como as datas para serem implementados. Os protocolos hormonais utilizados dependem de cada exploração consoante o médico veterinário e o produtor acordem, ponderando os dados do acompanhamento reprodutivo semanal ou quinzenal (com ou sem ecógrafo) bem como os preços inerentes ao uso de cada protocolo. Assim sendo, são usados protocolos com prostaglandina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Presynch), prostaglandina  $\text{PGF}_{2\alpha}$  + GnRh (Ovosynch, Co-Synch), progesterona (PRID) ou conjugações entre eles, com o objetivo de organizar de uma forma mais prática todo o manejo reprodutivo.

Pensando em termos económicos e tendo em conta toda a conjuntura internacional e as grandes dificuldades que o sector de leite em Portugal atravessa, as explorações de leite que encontrei conseguem devido a toda uma panóplia de vantagens serem mais produtivas e com isso rentabilizar mais o negócio do leite, apesar de o preço de leite praticado por todo o país ser equivalente. Desta forma, na minha opinião a produção de leite de vaca na região

alentejana tem vantagens competitivas em relação ao Entre Douro e Minho, pelo que irá continuar a aumentar em grande escala, ao passo que na região de Entre Douro e Minho se continuará a verificar o contrário.

Na produção de leite na região Norte de Portugal, um dos maiores problemas é a fraca deteção deaios (Rocha *et al* 2001), problema que se acentua ao longo dos anos (Rocha *et al* 2010). Assim, pelo menos em explorações com maiores efetivos, dever-se-ia testar a viabilidade da utilização de programas de sincronização do cio e da ovulação, para ultrapassar esta limitante. Enquadrando este período de 6 semanas em todo o estágio final, posso salientar que foi o local onde mais consolidei os meus conhecimentos acerca dos protocolos de sincronização de cio e ovulação, servindo também para ter uma noção mais aprofundada acerca de um estilo de produção diferente do sistema de minifúndio praticado no Entre Douro e Minho.

## Brasil

O segundo período de estágio decorreu na empresa Biotran sob a orientação do Dr. Carlos Fernandes de 1 de Novembro a 29 de Novembro de 2011. Esta empresa situada na cidade de Alfenas, no sul do estado de Minas Gerais, é constituída por 6 veterinários que desenvolvem funções distintas, as quais pude acompanhar. A empresa tem uma área de atuação muito vasta cobrindo o Sudeste de Minas Gerais e o Norte do Estado de São Paulo. Esta região do Brasil é caracterizada por ser uma das regiões mais pobres do país onde a agricultura é ainda muito rudimentar. O sistema de produção pecuária na sua maioria é extensivo onde o pasto mais comum é o capim elefante ou semi-intensivo com animais em pastoreio de capim elefante e suplementados com silagem de milho e concentrado. Na região o número de animais leiteiros é muito maior que os de carne. No entanto o efetivo médio ronda as 35 vacas em lactação. As raças bovinas de aptidão leite exploradas na região são a raça Gir, a raça Guzerá (aptidão mista) e a raça Girolando (5/8 Holstein x 3/8 Gir), e com aptidão para carne as raças Nelore e Aberdeen Angus. Apenas a raça Angus é um *Bos taurus taurus*, ao passo que a Gir e Guzerá são *Bos taurus indicus*, e a Girolando uma raça “sintética” *B. taurus* x *B. indicus*.

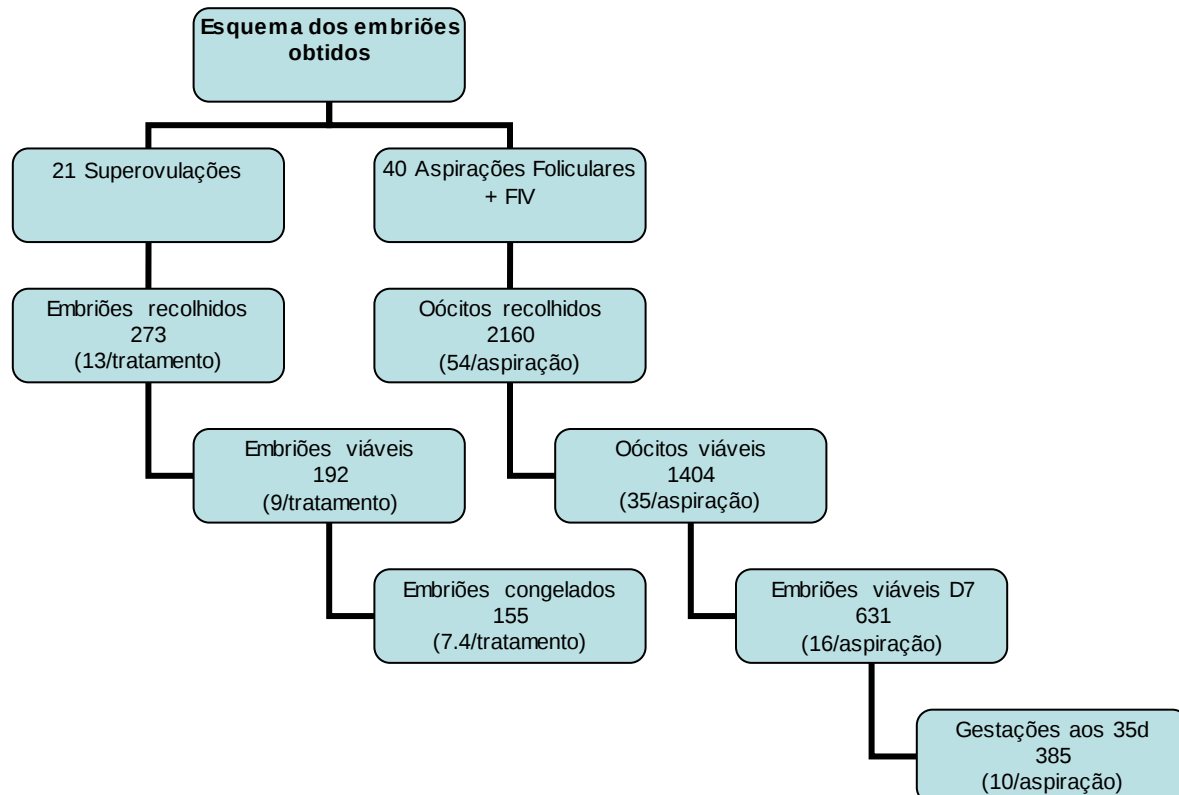
A Biotran é uma empresa com duas vertentes de trabalho: por um lado apresenta serviços às explorações pecuárias na área das biotecnologias reprodutivas e programas de controlo reprodutivo tanto em bovinos de carne como de leite, e por outro lado possui também a vertente de formação, realizando diversos cursos para profissionais veterinários em variados temas reprodutivos. A empresa é proprietária de 4 fazendas onde mantém cerca de 500 bovinos fêmeas de raça Gir ou Nelore, as quais utiliza como recetoras de embriões para posteriormente vender aos 60 dias de gestação com um feto macho ou fêmea, consoante o produtor pretenda aptidão carne ou leite. A grande maioria dos embriões produzidos tanto por Transferência de Embriões (TE) como por Fertilização *in Vitro* (FIV) é de raça Holstein ou

Girolando, com aptidão para a produção de leite, havendo também alguns de raça Nelore para produção de carne.

Embora seja uma região muito pobre do país, o elevado preço por litro de leite pago ao produtor (0.95-1 Real) aliado ao baixo custo de produção resulta numa margem de lucro favorável e compatível com o uso de biotecnologias reprodutivas caras como o caso da TE e a FIV. Por cada feto sexado aos 60d de gestação o produtor pagava entre 400 e 450 Reais dependendo do número de fetos obtidos por aspiração, mais 1.5 vezes o valor pago pela empresa na compra da recetora.

### Casuística

Ao longo das 4 semanas de estágio a casuística incidiu toda em torno da produção e venda de embriões bovinos. Assim tive a oportunidade de acompanhar os vários veterinários da empresa durante a realização de 40 aspirações foliculares (35 em vacas Holstein e 5 em vacas Nelore) onde se colheram 2160 oócitos (54 oócitos/aspiração), destes, 1404 (65%) foram classificados como viáveis, das quais resultou após fertilização e cultura *in vitro* em 631 (45%) embriões viáveis para colocação nas recetoras (15.8 embriões/aspiração) ao dia 7/8/9 pós fecundação e por último resultou numa taxa de concepção de 61% uma vez que foram obtidos 385 gestações (9.6 gestações/aspiração) aos 35d (Figura 4).



**Figura 4** - Diagrama de embriões obtidos por TE e FIV durante as 4 semanas de estágio.

Acompanhei também todo o protocolo de TE em 21 animais com a avaliação de dadoras, a realização dos protocolos de superovulação, a recolha e avaliação dos embriões ao 6-7º dia e a criopreservação dos embriões para posterior venda. Em relação ao protocolo de superovulação foi sempre utilizada a Hormona Folículo Estimulante (FSH), fazendo-se administração BID durante 4 dias, com doses decrescentes ao longo das 8 administrações. Das 21 superovulações realizadas foram obtidos 273 embriões (13/tratamento), dos quais após avaliação 192 foram considerados viáveis (9.1/tratamento) sendo posteriormente criopreservados em azoto líquido 155 embriões (Figura 4). A técnica de congelamento preferencialmente utilizada foi a congelação lenta programada embora tenham sido feitos alguns congelamentos pela técnica de vitrificação e pela técnica de congelação lenta programada “de campo”, baixando manualmente o “canister” dentro do tanque de azoto.

Duas vezes por semana eram feitas a avaliação de novas recetoras que entravam nas fazendas da empresa onde era recolhido sangue para testagem de Brucelose e realizada a prova de Intradermotuberculinização (490 tuberculinizações observados). Após o resultado negativo destes animais eram então iniciados os protocolos de vacinação e a avaliação reprodutiva de forma a começar um programa de sincronização de cio num determinado número de animais, consoante o número de gestações pretendidas (450 animais). Após a observação de cio as recetoras eram reavaliadas, no dia antes da colocação do embrião, para a presença de um corpo lúteo Grande (CLG), Médio (CLM) ou Pequeno (CLP) bem como o lado em que se encontrava o CL (esquerdo ou direito) e também para a tonicidade uterina (450 animais). Após esta avaliação era feita a correspondência dos diferentes embriões de diferentes Graus de Qualidade e desenvolvimento (mórula, jovem blastocisto, blastocisto, blastocisto expandido) com as diversas recetoras de forma a maximizar a probabilidade de sucesso. Os embriões eram transportados a 37º C num incubador portátil e colocados no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, sendo que eram apenas usados como recetoras os animais que obtiveram melhor pontuação da avaliação prévia ou seja, maior CL e menor tonicidade uterina, uma vez que estavam sempre preparados maior número de animais comparativamente aos embriões disponíveis (350 transferências observadas). Aos 35 dias de gestação era feito um diagnóstico de gestação (DG) com o auxílio de ecografia (400 DG observados) e aos 60 d de gestação os animais previamente positivos ao DG eram submetidos a novo exame ecográfico para sexagem fetal (350 casos observados). Após a sexagem fetal, se o sexo do animal era o pretendido, a recetora com uma gestação de 65 d era vendida ao produtor, enquanto se o sexo fetal não era o desejado era administrada uma PGF<sub>2α</sub> para provocar aborto, podendo a recetora ser novamente utilizada.

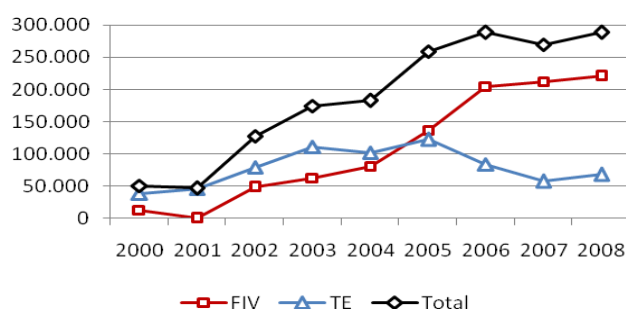
Assisti também á execução do exame andrológico e a congelação de sémen em 45 touros de raça Nelore e Brahman, o qual se destinava á FIV no laboratório da empresa. Durante este

período na Biotran tive ainda a oportunidade de realizar um Curso de TE com componente teórica e prática, num total de 40 h de aprendizagem (Certificado em Anexo).

Estive também presente a assistir á componente teórica de diversos cursos lecionados durante as 4 semanas, nomeadamente: Ultrassonografia – Sexagem fetal e perspetivas futuras; Superovulação, Colheita e Maneio de Dadoras de Embriões; Aspiração Folicular (FIV) e Protocolos de Preparação de Dadoras; IATF – Saiba como interpretar os Protocolos e Usar de Forma Eficiente; os quais foram lecionados pelos veterinários da empresa e também por veterinários colaboradores externos.

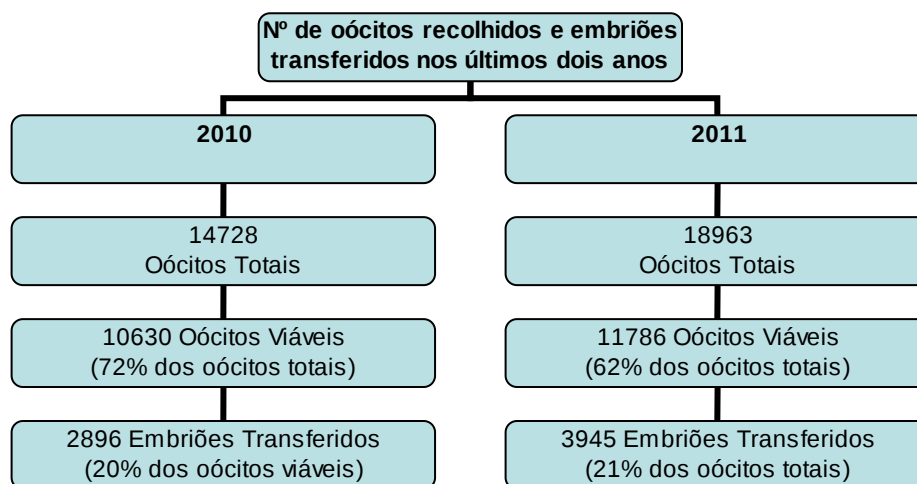
### Considerações

O contacto clínico e laboratorial que tive no Brasil esteve todo ele relacionado com a produção e venda de embriões bovinos sendo a maioria das dadoras vacas selecionadas para a produção de leite. No Brasil, o número de embriões produzidos por FIV ultrapassou nos últimos anos em grande escala o número de embriões produzidos pelo método de TE como refere a Figura 5.



**Figura 5** – Evolução do nº de embriões produzidos por TE e FIV de 2000 a 2008. (Imagem gentilmente cedida pelo Professor António Rocha no âmbito da disciplina Teriogeneologia-I)

Este fenómeno ficou para mim ainda mais claro durante este período na Biotran, uma vez que esta empresa se limita a produzir a maioria dos embriões in vivo durante os cursos de TE lecionados para veterinários e aquando de estudos de investigação, ao passo que a produção de embriões por FIV subiu claramente no de 2010 para 2011, como refere o esquema seguinte.



**Figura 6** – Nº de óocitos recolhidos e embriões transferidos em 2010/2011 (dados gentilmente cedidos por Biotran)

Os dados aqui referidos dizem respeito à totalidade das aspirações realizadas pela empresa Biotran em 2010 e 2011. Pode observar-se um elevado número tanto no número de oócitos totais recolhidos por aspiração (aumento de 29%), como no número de embriões transferidos para as recetoras ao dia 7/8/9 após fecundação (36%). Com estes dados podemos afirmar que o aumento na produção foi elevado (aumento de oócitos totais de 28%) mas também que a eficiência a nível laboratorial melhorou bastante, uma vez que o aumento em percentagem do número de embriões viáveis obtidos no dia 7 após a fecundação (aumento de 36% dos embriões transferidos) foi largamente superior ao aumento de 10% no número de oócitos viáveis colocados para fertilização. Em relação ao número de embriões obtidos pelo método de TE não disponho de resultados concretos, no entanto fazendo uma extrapolação dos números obtidos durante o mês de Novembro (Figura 4) para os restantes meses, rapidamente se percebe que o número de embriões obtidos foi claramente muito baixo em comparação aos obtidos por FIV, o que sustenta os dados evidenciados na Figura 5.

Foi para mim muito interessante ver que uma empresa privada com fins lucrativos funciona de uma forma tão organizada que lhe permite abdicar de tempo e recursos para a realização de vários trabalhos de pesquisa em diversos temas da área reprodutiva. Esta componente de investigação funciona quase que a tempo inteiro paralelamente aos procedimentos reprodutivos e aos cursos lecionados no dia-a-dia da empresa e tem como objetivo a publicação de resultados para toda a comunidade veterinária em geral e para proveito próprio da empresa.

O período de estágio na empresa Biotran contribuiu distintamente para que me tenha tornado proficiente na técnica de Transferência de Embriões e permitiu também adquirir muitos conhecimentos teóricos acerca de sexagem fetal por ecografia.

## **Califórnia**

O terceiro período de estágio decorreu na clínica veterinária Lander na cidade de Turlock na Califórnia de 1 de Dezembro de 2011 a 7 de Janeiro de 2012, sob a orientação da Dra. Lori Lenihan. A clínica de Lander é uma instituição privada constituída por 17 veterinários, os quais fazem acompanhamento e gestão das explorações leiteiras na região. Atuando numa das maiores bacias leiteiras existentes, a clínica Lander é conhecida por ser uma das clínicas veterinárias de grandes animais que maior receita efetua em todo o mundo, devido ao elevado número de explorações onde presta os seus serviços bem como ao elevado número de animais existentes por exploração na região. No total, é dada assistência a cerca de 340 000 animais bovinos distribuídos pelos 17 veterinários (20000 animais/veterinário). Todos eles prestam um serviço base de acompanhamento reprodutivo, existindo no entanto veterinários especializados em outras técnicas específicas como transferência de embriões, nutrição

animal, gestão económica de explorações, consultadoria em bem estar animal e podologia e ainda qualidade de leite. Existe também na clínica um laboratório a trabalhar paralelamente á atividade veterinária, onde efetuam os procedimentos de análise de amostras de leite e pesquisa de resíduos de antibiótico no leite ou urina, entre outras pesquisas laboratoriais de menor frequência. O sistema de produção leiteira no estado da Califórnia e mais especificamente em todo o Central Valley onde a clínica Lander se insere, é extremamente organizado devido á elevada densidade de explorações leiteiras e de toda a indústria de laticínios. O estado da Califórnia caracteriza-se por uma baixa pluviosidade anual (544 mm/ano) onde apenas chove em alguns meses do Inverno, sendo as épocas de Primavera e Verão especialmente secas. Desta forma toda a agricultura se encontra dependente de água canalizada que provém das altas montanhas do estado de Nevada, que tendo neve permanente consegue fornecer água durante todo o ano á produção agrícola e pecuária do estado da Califórnia.

As explorações leiteiras apresentam um efetivo médio de 5000 animais com grandes propriedades de terreno plano, onde cultivam uma variedade de forragens como milho silagem, azevém silagem, luzerna entre outras, para consumo na própria exploração. As explorações com vacas Holstein representam a maioria, existindo também um número significativo de explorações leiteiras que possuem exclusivamente vacas Jersey, uma vez que a indústria de produção de queijo tem bastante peso na região e valoriza um leite com teores de proteína elevados, para uma maior eficácia na produção queijo.

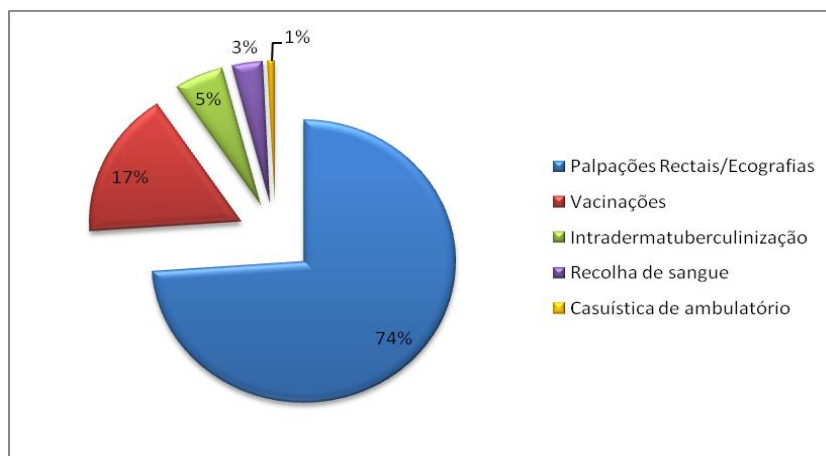
### **Casuística**

Durante as 5 semanas de estágio acompanhei os diversos veterinários todas as manhãs nas visitas de acompanhamento de rotina às explorações onde procedíamos á avaliação reprodutiva das vacas por palpação rectal. Os alunos nestas visitas são colocados a examinar as vacas á frente do veterinário e com um marcador dão o seu parecer acerca do animal. De seguida o veterinário ao verificar o animal que o aluno examinou anteriormente irá confirmar ou corrigir o diagnóstico feito pelo aluno, escrevendo sempre as siglas do diagnóstico final no animal com as cores estipuladas pela exploração. Este procedimento de palpação rectal foi aquele que mais pratiquei e no qual fiquei com uma elevada experiência tanto a nível de palpação manual como por ecografia, uma vez que realizei 8260 palpações durante 5 semanas (295/dia), das quais 4100 foram com o recurso adicional á ecografia portátil (150/dia), perfazendo um total de 74% da casuística geral (Figura 7). Durante o acompanhamento reprodutivo eram discutidos com o responsável pela gestão reprodutiva da exploração diversos pontos importantes como: deteção de cio, inseminação artificial, protocolos de sincronização de cio/ovulação, custos dos diversos protocolos disponíveis no mercado e alterações necessárias

a serem realizadas no efetivo. No final, os registos informáticos reprodutivos, produtivos, sanitários e de movimentos de animais eram recolhidos no *software* do produtor e transferidos para o programa informático de Gestão (DairyComp 305®) usado pela clínica veterinária, onde posteriormente era feito o tratamento de dados e avaliadas possíveis medidas a implementar para manter a exploração o mais eficiente possível. Devido á existência de grandes efetivos, os veterinários prestam serviço de acompanhamento reprodutivo de rotina semanal, sempre no mesmo dia da semana, sem exceção, devido ao facto de todo o “modos operandos” da exploração ter por base o manejo reprodutivo.

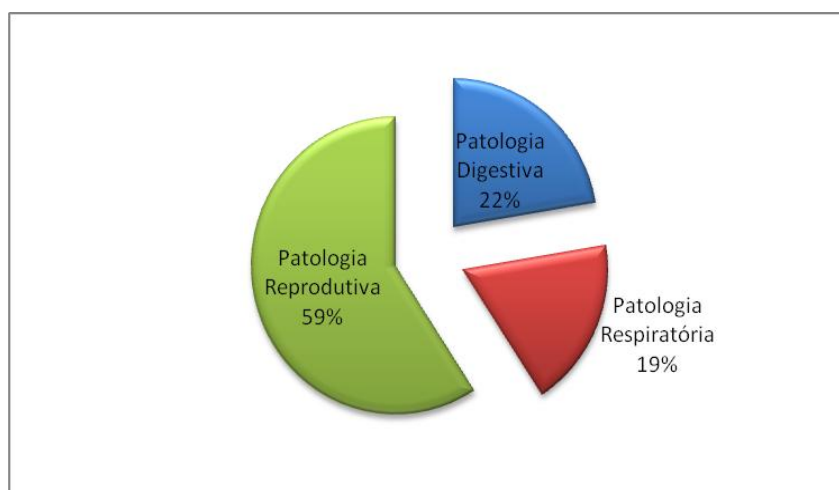
Outro procedimento que efetuei em 1875 animais, correspondendo a 17% da casuística geral (Figura 7), foi a vacinação de bovinos com idade entre 6 e 8 meses, com a vacina RB51 contra *Brucella abortus* a qual decorria no final do acompanhamento reprodutivo de rotina semanal á exploração. Durante a vacinação, obrigatória (segundo o plano de erradicação de Brucelose nacional) era também mandatário a colocação de um brinco laranja metálico com um número de identificação animal bem como uma tatuagem auricular indicativa do ano de vacinação do animal.

Sendo a Califórnia o estado com maior número de animais para consumo humano dos EUA, existe um grande mercado de venda de bovinos para outros estados ou outros países, o que requer atestados para diferentes doenças animais consoante a regulamentação específica de cada estado ou país de compra. Assim, houve animais em que para poderem transitar para outro estado foi necessário realizar testes e procedimentos como, Intradermotuberculização, (5% da casuística geral) e recolhas de sangue para pesquisa de brucelose (3% da casuística geral) (Figura 7). Estes procedimentos foram elaborados em locais próprios de venda onde colocavam todos os animais para serem posteriormente leiloados para compradores de todo o mundo. Os animais só podiam sair para o respetivo estado ou país de compra, após a chegada do resultado laboratorial, ou assim que o teste de campo realizado pelo médico veterinário o permitisse.



**Figura 7** – Casuística geral.

Em relação á casuística geral, os restantes 1 % dizem respeito á casuística ocorrida durante o serviço de ambulatório (Figura 7). A clínica possuía um serviço de secretariado que registava todas as chamadas e os motivos da chamada, de seguida entrava em contacto com os vários veterinários que estivessem disponíveis para cobrirem as chamadas. Desta forma tive oportunidade de acompanhar vários veterinários na resposta a estas chamadas que decorriam nas explorações de bovinos de leite às quais a clínica prestava assistência. Da casuística de ambulatório as patologias reprodutivas foram as que tiveram maior peso (59% dos casos) correspondente a 45 casos observados, seguindo-se da patologia digestiva com 17 casos (22%) e por último a patologia respiratória a perfazer os restantes 19 % que correspondem a 14 casos observados (Figura 8).



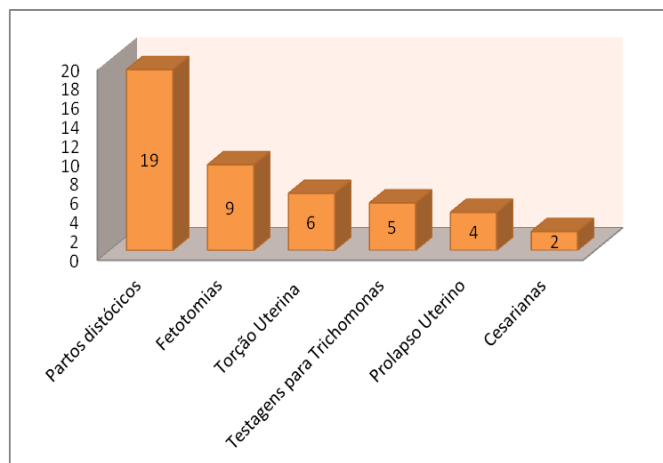
**Figura 8** - Expressão dos 3 tipos de patologias encontradas durante o serviço de ambulatório.

Relativamente aos casos de patologia reprodutiva observados, os mais frequentes foram partos distócicos com 19 casos, correspondendo a 42% das patologias reprodutivas do ambulatório (Figura 9). É de mencionar que um dos casos de parto distócico é referente a um *Shistosomus reflexus* que tive oportunidade de observar numa cabra. Os casos de partos distócicos aqui referidos não dizem respeito a todas as chamadas de parto a que fomos solicitados uma vez que alguns dos partos acabaram por ser solucionados por cesariana (2 casos, correspondentes a 5% dos casos) e por fetotomia (9 casos correspondentes a 20%) (Figura 9). Em relação aos partos distócicos aqui referidos, em todos eles tive a oportunidade de iniciar a aproximação ao animal bem como á decisão clínica acerca do procedimento mais correto a utilizar, tendo-me sido dada completa liberdade na resolução dos mesmos. Nas situações em que foi necessário iniciar a fetotomia, a meu pedido, os médicos veterinários confirmaram sempre se realmente seria o melhor procedimento a realizar sendo que de seguida me permitiram efetuar todo o processo de fetotomia.

A patologia reprodutiva observada também com alguma expressão nos casos de ambulatório foi a torção uterina, com 6 casos observados (13% dos casos) (Figura 9) as quais foram todas resolvidas por manipulação do feto ou com auxílio de uma barra de distorção (em 3 dos 6 casos).

Acompanhei também a realização de 5 testagens a touros Jersey para despiste de *Tritrichomonas fetus* (Figura 9) numa exploração leiteira de vacas Jersey utilizando uma zaragatoa prepucial específica, a TRITRICHOMONAS FOETUS TEST In Pouch™, que é depois enviada para laboratório. Coloco aqui estas testagens como patologias porque efetivamente os 5 touros testados apresentaram resultado positivo, perante o qual, o produtor não os adquiriu para o seu efetivo.

Tive ainda oportunidade de assistir e ajudar em 4 prolapsos uterinos (9% dos casos) (Figura 9) que foram facilmente solucionados com rápida lavagem e recolocação uterina e por fim usada a sutura de Buhner.



**Figura 9** – Expressão das diferentes patologias reprodutivas observadas em ambulatório.

Uma vez que a clínica apresenta um serviço de transferência de embriões que realiza em algumas explorações específicas, tive também a oportunidade de acompanhar o médico veterinário responsável por este serviço em alguns dias, o que me permitiu observar e auxiliar na realização de 7 lavagens (recolhas) de embriões e respetivas transferências. Estas transferências de embriões eram feitas com o intuito de melhorar geneticamente o efetivo, sendo utilizadas tanto dadoras como recetoras da própria exploração, com os embriões transferidos a fresco após uma observação cuidada da sua qualidade.

Tive ainda contacto com um surto reprodutivo de Neosporose numa exploração de leite que a Dra. Lori Lenihan dava assistência reprodutiva semanal, com 1800 animais em lactação. Em 3 dias prévios á visita de acompanhamento reprodutivo houve 45 abortos confirmados pelo produtor. As vacas não sofreram qualquer quebra de leite nem foram detetados nenhum outro sinal clínico nos animais além de corrimento de limpeza pós-aborto. Durante o diagnóstico ecográfico foram detetados valores anormais de morte fetal pela ausência de batimento

cardíaco em fetos com idade entre 35-65 d e foram também detetadas mais 9 vacas que se encontravam em processo de aborto, com 5-7 meses de gestação. Foram recolhidas placentas, amostras de sangue, fetos abortados de vários animais e enviado para laboratório para uma pesquisa de agentes etiológicos, com diagnóstico clínico presuntivo de Neosporose. O que viria a ser confirmado 2 semanas depois pelo laboratório através do método de pesquisa de anticorpos usando o teste de ELISA.

### **Considerações**

As 5 semanas que passei como estagiário na clínica de Lander foram extremamente intensas em termos de aquisição de conhecimentos. Esta foi a segunda vez no período de 2 anos que estive na clínica de Lander como estagiário, o que me permitiu uma maior confiança na execução das tarefas e na discussão dos casos clínicos com os veterinários. Como aluno pode-se aprender muita coisa e estar envolvido em diferentes resoluções de problemas ao mesmo tempo, devido ao elevado número de profissionais veterinários, bem como o elevado número de animais a que a clínica presta assistência.

Achei interessante a velocidade com que os veterinários realizam as palpações rectais e o diagnóstico reprodutivo. Nas condições de campo os veterinários da clínica em média conseguem fazer cerca de 70-80 palpações por hora pelo método de palpação rectal ao passo que usando o método do ecógrafo esse número pode ser ligeiramente superior e atingir uma média de 85-90 diagnósticos por hora. Estes dados foram obtidos pela clínica no âmbito de um estudo comparativo entre a rentabilidade do método palpação rectal vs. método da medição da proteína B específica de prenhez (PSPB). A indústria de lacticínios local pretende comercializar este teste aos produtores a quem compra o leite, tentando assim interagir também com o manejo reprodutivo das explorações. Desta forma os veterinários, numa tentativa de explicar aos produtores as razões pelo que não devem alterar o manejo que têm vindo a realizar nos últimos anos, sentiram a necessidade de profissionalizar mais ainda o seu trabalho. Com os cálculos realizados concluiu-se que nas condições locais, o método da PSPB não é rentável quando comparado ao método de palpação manual e com ecógrafo, porque embora o custo para o produtor seja equiparado entre ambos, o produtor irá perder uma quantidade enorme de informação do animal que o teste laboratorial não lhe fornece. Conclui-se também que a utilização de aparelho portátil de ecografia diminui o tempo necessário para intervencionar um animal rentabilizando o tempo que o veterinário se encontra na exploração, uma vez que os pagamentos ao médico veterinário são feitos por hora de trabalho e não por técnica utilizada (palpação vs. ecografia).

Durante uma prova de avaliação feita pela Dra. Lori Lenihan referente às minhas capacidades para executar o diagnóstico reprodutivo utilizando ecografia, fiz 304 intervenções nas quais

apenas dispunha de 45 segundos por animal, para ditar um diagnóstico a ser confirmado pela Dra. Lori. Nesta avaliação, na qual não falhei qualquer diagnóstico, pude avaliar a minha velocidade de palpação por ecografia que foi de cerca de 40 segundos por animal, ao passo que utilizando palpação rectal manual o tempo de diagnóstico foi de 52 segundos. Em ambos os métodos perdia mais tempo com o procedimento de escrever o diagnóstico no animal e deslocar-me para a vaca seguinte do que a fazer a intervenção de palpação propriamente dita. Embora não seja frequente por parte dos veterinários da clínica de Lander darem total liberdade para todo o tipo de intervenções, o facto de ter sido o segundo estágio neste local estive sempre á vontade com todos os veterinários que confiavam de tal forma nas minhas capacidades que não confirmavam os animais que eu diagnosticava chegando mesmo ao ponto de nas visitas de acompanhamento reprodutivo eu fazer metade dos animais a par do veterinário sem que ele confirma-se o meu diagnóstico. Outro ponto que ajudou a que isto fosse possível e o qual é um dado interessante para nós como Portugueses é que cerca de 85% dos produtores e gerentes das explorações de leite da Califórnia são Portugueses ou Americanos descendentes de Portugueses oriundos dos Açores. Esta característica tornou ainda este estágio mais interessante porque permitiu uma relação aberta com os produtores os quais partilhavam toda a informação necessária e solicitada.

Interessante que a Neospora, anteriormente diagnosticada como um sério problema em Portugal (Canada *et al* 2004), e na Califórnia (Dubey *et al* 2007), continua sendo uma patologia importante.

Não existe preocupação com Tricomoniase venérea de bovinos em Portugal. Se na Califórnia, com apertado controlo veterinário, pode ser um problema, talvez não fosse má ideia testar os touros em sistema de produção em que se utilize monta natural

Após 5 semanas de estágio na clínica de Lander acompanhando todos os veterinários lá presentes considero que me tornei proficiente no que diz respeito á palpação manual, ecografia reprodutiva (incluindo sexagem fetal por ecografia) e em todo o tipo de técnicas e manobras obstétricas referidas anteriormente.

# **Sexagem Fetal Bovina por Ecografia**

## **Equipamento de ecografia**

O aparelho de ecografia consiste de uma sonda acoplada a um cabo que por sua vez está ligado a um dispositivo eletrônico com ecrã. As características do aparelho e o formato do ecrã podem variar consoante as diferentes categorias de aparelhos existentes. Assim estão disponíveis 3 tipos de ecógrafos que podem ser usados na avaliação reprodutiva em fêmeas bovinas: ecógrafo hospitalar não transportável, ecógrafo hospitalar transportável que pode ser usado em campo e o ecógrafo portátil (o de maior dinâmica). A qualidade da imagem obtida será tanto melhor quanto melhores as características da sonda e a maneira como a imagem é processada (Gayrard *et al* 2010).

A sonda ecográfica é constituída por cristais piezoelétricos (quartzo, alguns tipos de cerâmica), os quais quando estimulados com impulsos elétricos dilatam e contraem produzindo ondas ultrassônicas. As sondas são classificadas de acordo com a realização de um scanner dos tecidos do tipo sectorial ou linear. Uma sonda linear apresenta um grande número de cristais dispostos longitudinalmente entre 5 a 15 cm o que resulta numa imagem em forma retangular da região examinada. No caso da sonda convexa os cristais aparecem dispostos de forma convexa o que dá uma imagem aumentada e em forma de cunha da região visualizada.

As sondas lineares são preferíveis para ecografia dos órgãos reprodutivos em bovinos por via transrectal porque a sua forma permite um maneo mais prático e seguro no interior do reto. A maioria destas sondas apresenta relevos ou indicadores com o intuito de facilitar a sua manipulação e a orientação da imagem ecográfica (Nylan *et al* 1995).

A sonda no formato linear é aquela usada por rotina em reprodução bovina sendo que o formato sectorial apenas apresenta aplicação prática em ecografia reprodutiva de pequenos ruminantes e na aspiração folicular transvaginal eco guiada em bovinos (Durocher *et al* 2002).

O número de oscilações dos cristais piezoelétricos por segundo designa-se de frequência, a qual é medida em hertz (Hz) e depende das características dos cristais (tipo de cristais e espessura). Em imagiologia médica estão disponíveis frequências de 2 a 10 megahertz (MHz), no entanto alguns aparelhos de ecografia possuem sondas com cristais de diferentes ressonâncias o que permite obter variações de frequência sem que seja necessário alterar a sonda (Gayrard *et al* 2010). A frequência utilizada apresenta uma grande influência na qualidade de imagem porque controla a resolução axial que não é mais que a capacidade de distinguir entre duas estruturas adjacentes localizadas ao longo do eixo de propagação dos ultrassons. Desta forma, para obter uma boa resolução axial é necessária uma elevada frequência, mas uma vez que a penetração dos ultrassons é inversamente proporcional à frequência, é a profundidade do exame ecográfico que dita a escolha da frequência a utilizar

(Goddard 1995). A resolução lateral é a capacidade do equipamento para distinguir entre duas estruturas adjacentes, localizadas á mesma profundidade, sendo que a resolução depende do diâmetro do feixe de ultrassom, o qual varia com a frequência e a profundidade de observação. Assim, as distâncias focais das sondas usadas em palpação transrectal são 7.0, 3.5 e 2.0 cm de profundidade consoante o uso das frequências correspondentes de 3.5, 5.0 e 7.5 MHz (Ginther 1998).

O feixe de ultrassons emitidos pela sonda penetra os tecidos corporais onde sofre várias reflexões das quais resultam ondas refletidas ou ecos, os quais são captados pela sonda onde a informação ultrassonora é convertida em sinais elétricos. Os ecos recebidos de tecidos mais profundos são mais fracos que os ecos mais superficiais o que em termos de imagem representaria uma diferença de brilho, que não acontece, porque um amplificador existente no aparelho amplia os impulsos provenientes de ecos mais profundos igualando assim o brilho da imagem. O operador pode ainda na maioria dos aparelhos ajustar a qualidade da imagem observada ao ajustar o ganho geral da imagem ou os ganhos superficiais ou profundos (Gayrard *et al* 2010).

Os diferentes brilhos da imagem provêm de diferentes ecos recebidos. Assim, estruturas anecogénicas (líquido folicular, urina, fluido alantoide e amniótico) aparecem como preto e estruturas hiperecogénicas (osso, gás) aparecem brancas, enquanto as estruturas com ecogenicidade intermédia são representadas em diferentes escalas de cinzentos. A velocidade de formação de imagem é normalmente de 20 a 30 imagens por segundo o que permite que a imagem ecográfica visualizada no ecrã se altere quando a sonda é movida ou quando o tecido observado se movimenta (bater do coração) (Pierson *et al* 1988).

Os aparelhos de visualização da imagem ecográfica disponíveis atualmente são peça monocular (Imagem 1), peça binocular (Imagem 2) e monitor (Imagem 3) (Colloton *et al* 2010).



**Imagem 1** – Dra. Lori Lenihan com aparelho de peça monocular – Califórnia. (Imagem obtida pelo autor).



**Imagem 2** – Bruno Carneiro durante o estágio, com aparelho de peça binocular – Califórnia. (Imagem obtida pelo autor).



**Imagem 3** – Aparelho de ecografia com monitor utilizado pela Biotran. (Imagem obtida pelo autor).

## **Marcas anatômicas**

O tubérculo genital é a estrutura primária que precisa ser identificada durante o exame ecográfico para a sexagem fetal. Na fêmea, o tubérculo genital irá dar origem ao clítoris aparecendo desta forma ao nível da base da cauda (Imagem 4). No macho, o tubérculo genital irá desenvolver-se e dar origem ao pênis, pelo que a sua localização será sempre imediatamente caudal ao cordão umbilical (Imagem 5). Para uma técnica apurada de sexagem fetal devem ser conhecidas as várias evoluções anatômicas que as estruturas reprodutivas primárias e secundárias de cada sexo sofrem durante o seu desenvolvimento embrionário e fetal (Curran *et al* 1989).

### **Morfologia embrionária e desenvolvimento fetal**

O período embrionário é tradicionalmente definido como o período entre a fecundação e o final da organogénese que ocorre por volta do dia 42 de gestação.

O início do período embrionário pode ser descrito como uma série de divisões celulares e diferenciação que conduz á forma de blastocisto, aos 6 a 7 dias após a fertilização. A zona pelúcida desaparece aos 9 dias e o embrião passa a um formato alongado por volta do dia 12-13 de gestação (Barone 1990).

Durante todo o período pré-implantação o concepto (embrião mais membranas alantoide e coriônica) cresce no interior do lúmen uterino ipsilateral ao corpo lúteo. A variação de tamanho da vesícula embrionária não é significativa desde o dia 10 ao dia 18 de gestação. A acumulação de fluido aumenta consideravelmente aproximadamente ao dia 25, quando o embrião se destaca da parede uterina facilitando a sua deteção por ecografia (Descôteaux *et al* 2010).

Durante o dia 18 ao dia 35 de gestação o concepto adquire uma aparência definitiva apresentando cerca de 30 cm de comprimento e 3 cm de largura.

A implantação do conceito no útero começa ao dia 19 de gestação, e ao dia 20 desenvolve-se as primeiras vilosidades da placenta. A partir do dia 27 diversas vilosidades localizadas ao longo das carúnculas uterinas formam os primeiros cotilédones (Pierson *et al* 1984).

O embrião é bem demarcado aproximadamente após o dia 18, com uma curva acentuada no seu eixo anterior-posterior. A esta altura o embrião mede 3-4mm de comprimento, o tubo neural encontra-se em encerramento e o coração começa a bater. Aproximadamente ao dia 25 os membros anteriores começam a aparecer de forma alongada. No dia 26 o embrião curva-se sobre si mesmo e mede cerca de 7-8 mm de comprimento. Desde o momento que se torna visível e até ao dia 50 de gestação o embrião cresce a uma média de 1.1mm por dia (Kolour *et al* 2005).

A partir do dia 35 o embrião assume uma forma de “L”, o pescoço encontra-se claramente desenvolvido e os dígitos são visíveis em todos os quatro membros (Barros & Visitin 2001).

No dia 40 de gestação o tubérculo genital encontra-se localizado de forma proeminente na linha média entre os membros posteriores. As pregas urogenitais, as quais representam o prepúcio embrionário nos machos e os lábios vulvares na fêmea, são visíveis caudalmente ao tubérculo genital. As pregas lábio-escrotais, as quais formam o escroto no macho, são visíveis entre o umbigo e o tubérculo genital, ao lado da linha média. A esta altura não existe qualquer diferença macroscópica no tubérculo genital entre os dois sexos, mas a presença do orifício urogenital e da rafe anal-genital indicam que o embrião é macho (Inomata *et al* 1982).

Aproximadamente ao dia 45 de gestação o feto perde a sua forma embrionária rudimentar e a face, pescoço, membros e cauda aumentam e tornam-se mais definidos. Os mamilos primordiais são reconhecidos em ambos os sexos e os membros podem ser vistos separadamente (Descôteaux *et al* 2010).

O primeiro centro de ossificação ocorre no crânio, o qual aparece bastante ecogénico na imagem ecográfica por volta do dia 55-60 de gestação. A ossificação da maxila e mandíbula completa-se até ao dia 100 de gestação.

As vértebras cervicais, torácicas lombares e sacrais começam a ossificar entre os dias 61 e os 65 de gestação com a vértebra coccígea a começar ao dia 70 de gestação.

A nível do tórax as costelas são detetadas por ecografia entre os dias 55 e 60 de gestação enquanto o esterno apenas se torna visível após o dia 81. Nesta fase a quase totalidade da cavidade torácica é ocupada pelo coração o qual por ecografia é facilmente detetado pelo seu rápido movimento das 4 camaras separadas pelo septo e pelas válvulas (Kahn 1989).

Ao dia 65 de gestação a cavidade abdominal é na maioria ocupada pelo fígado, sendo que a partir do dia 70 este espaço começa a ser substituído pelos quatro estômagos.

As escápulas, o ílio e o ísquio tornam-se ossificados e visíveis por ecografia aproximadamente ao dia 70 de gestação. Durante o segundo mês de gestação as úngulas podem ser vistas em

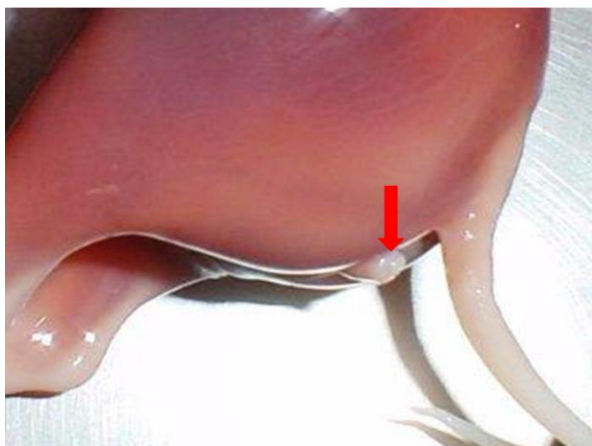
forma de tubérculo em cone na extremidade dos membros. Os membros começam a ossificar aos 61 a 65 dias de gestação ao passo que os dígitos apenas se tornam visíveis por volta dos 81 a 85 dias (Descôteaux *et al* 2010).

Estas noções acerca das alterações morfológicas que vão ocorrendo no período embrionário e início do período fetal são importantes para a execução de uma técnica de sexagem mais apurada. O operador sabendo quais as marcas anatómicas visíveis a nível fetal nas diferentes idades de gestação pode ter uma melhor noção da idade real a que o feto se encontra e direcionar a sonda de uma forma mais precisa às estruturas reprodutivas primárias e secundárias existentes aquela idade.

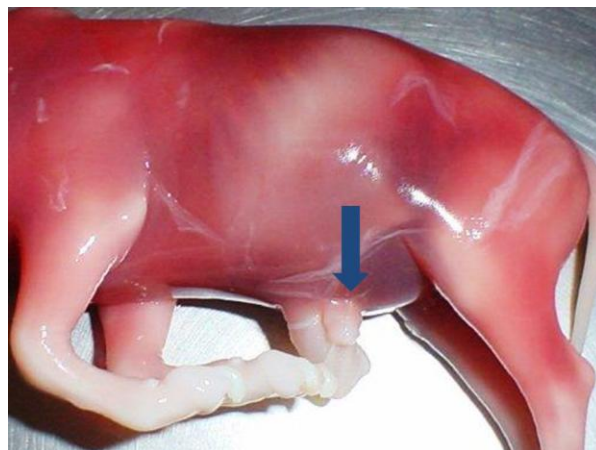
### **Alteração morfológica e posição anatómica do tubérculo genital**

Por volta do dia 47 de gestação nos fetos machos o tubérculo genital começa a migrar em direção ao umbigo, resultando num aumento relativo na distância de separação do tubérculo à cauda fetal e completando a migração por volta do dia 56-58 após inseminação (Seta azul - Imagem 5). As pregas urogenitais fundem-se com o tubérculo genital no dia 55 de gestação (Ginther 1998).

Nas fêmeas, o tubérculo genital migra em direção ao ânus a partir dos dias 48-49 para atingir a sua posição final aproximadamente aos 53 dias pós-inseminação (Seta vermelha - Imagem 4). A prega lábio-escrotal atrofia progressivamente a partir do dia 50, acabando por desaparecer completamente. (Descôteaux *et al* 2010).



**Imagem 4** – Tubérculo genital feminino na base da cauda com 69 dias de gestação. (Imagem gentilmente cedida por Biotran).

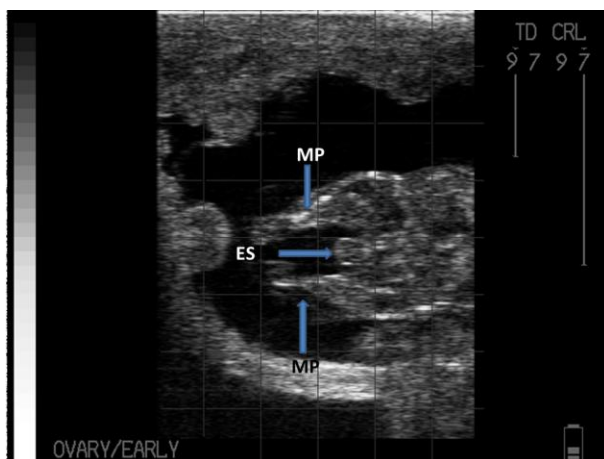


**Imagem 5** – Tubérculo genital masculino caudal ao cordão umbilical com 69 dias de gestação. (Imagem gentilmente cedida por Biotran).

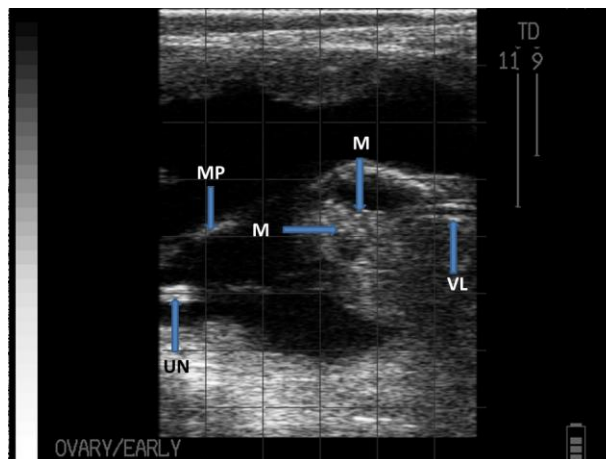
Após o dia 70 de gestação, o tubérculo genital é coberto por uns pequenos lábios ou pelo prepúcio diminuindo a sua ecogenicidade. Desta forma, começando nesta fase, não se visualiza mais o tubérculo genital uma vez que os órgãos genitais externos tomam o seu lugar.

No feto macho aos 60 dias de gestação, as pregas escrotais fundem-se na linha média para formar o escroto. A largura do escroto aumenta ao longo da gestação, medindo 4, 10 e 33 mm, respectivamente, aos 2, 3 e 7 meses de gestação (Kastelic *et al* 1988). Os testículos atravessam o espaço inguinal durante o quarto mês de gestação e mantêm a sua posição definitiva no saco escrotal entre os 3 e os 5 meses. Assim, um escroto vazio parecendo dois círculos brancos com centro preto, é frequentemente observado até ao final do terceiro mês de gestação (Imagem 6) (Descôteaux *et al* 2010).

Nos fetos femininos, as pregas lábio-escrotais são menores que nos machos e estas não se movem da sua posição entre os membros posteriores, contudo, desaparecem completamente por volta do dia 75 de gestação. Os tetos rudimentares são claramente visíveis por ecografia, revelando quatro pontos hiperecogénicos em quadrado ou rombos (Imagem 7). Apesar de estarem igualmente presentes no feto macho, não são normalmente visíveis por ecografia, com os aparelhos de campo. As pregas urogenitais elevam-se e formam dois lábios que envolvem completamente o tubérculo genital durante o quinto mês de gestação. Estas são visíveis por ecografia como um sinal (=) imediatamente abaixo da cauda (Hughes & Davies 1989).



**Imagem 6** - MP-Membro Posterior; ES-Escroto; Corte transversal da região inguinal onde se observa o escroto num macho de 80 dias de gestação. (Imagem obtida pelo autor).



**Imagem 7** - MP-Membro Posterior; UN-Úngula; VL-Vértebras lombares; M-Mamilos; Fêmea de 79 d de gestação em corte longitudinal. (Imagem obtida pelo autor).

## Possíveis utilizações práticas

A sexagem fetal por ecografia pode ser útil de várias formas para criadores de bovinos de leite e de carne. Explorações de reprodutores de raça pura podem saber tão cedo quanto 60d de gestação, o sexo do feto resultante da transferência embrionária ou de inseminação com sêmen de elevado valor genético. A sexagem também pode ser utilizada como forma de avaliar a eficácia do uso de sêmen ou embriões sexados, sem se ter de esperar pela confirmação no dia do parto. Os criadores podem ainda incluir esta informação na decisão de refugo dos animais ou no manejo da exploração (DesCôteaux *et al* 2010).

A técnica é também usada nas recetoras de embriões por forma a saber se o número de fêmeas ou machos pretendidos pelo cliente foi atingido com a técnica de FIV ou TE ou se novo procedimento de aspiração folicular ou superovulação deve ser feito na vaca dadora por forma a cumprir o contracto estipulado (Quintela *et al* 2011).

Rajamahendran *et al* (1994), referem ainda potencial vantagem para os produtores ao poderem abortar vacas gestantes, de gémeos de sexos diferentes, evitando assim que ocorra freemartinismo.

## **Ecografia no diagnóstico do sexo fetal**

### **Abordagem inicial**

O primeiro passo ao fazer a sexagem fetal é localizar o feto no útero fazendo uma exploração do corpo do útero bem como dos cornos uterinos ao longo de toda a sua extensão. Uma vez que é conhecido o grande impacto que uma gestação com gémeos (ou mesmo triplos) pode trazer para a lactação seguinte, deve ser feito um exame cuidado de todo o útero para confirmar o número de fetos presentes.

O segundo passo é ter a certeza que o feto está vivo e normal. Durante a manipulação uterina deve ser verificado o aspeto do líquido amniótico bem como a presença de batimento cardíaco para se certificar que existe viabilidade fetal. Ter em atenção que por vezes o único sinal de morte fetal pode ser a ausência de movimento cardíaco, especialmente se a morte fetal ocorreu recentemente. Apesar da maioria das anomalias fetais não serem visíveis por volta dos 60 dias de gestação deve sempre ter-se em atenção se o feto apresenta conformação normal. Por fim, o operador estará pronto para completar o procedimento com a determinação do sexo fetal através da obtenção de uma boa imagem ecográfica em corte longitudinal ou transversal (Durocher *et al* 2002).

### **Aparência do tubérculo genital**

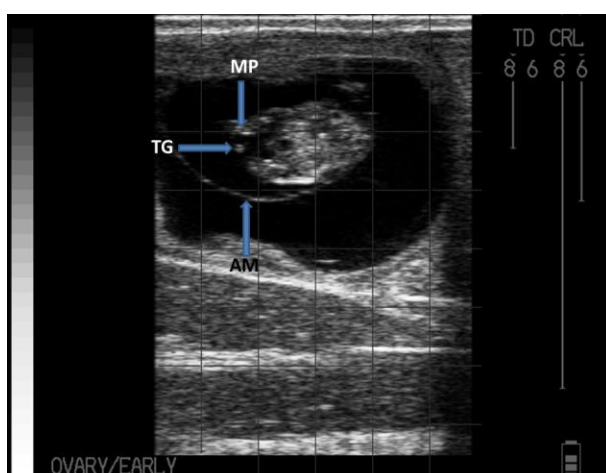
O tubérculo genital tanto nos machos como nas fêmeas, bem como as intumescências genitais e a prega urogenital nos machos, são estruturas que se apresentam hiperecogénicas. Ambos os tubérculos genitais de macho ou fêmea aparecem no ecrã como estruturas bilobadas cuja ecogenicidade é semelhante à de tecido ósseo (Christmas & Colloton 2007).

A aparência ecográfica do tubérculo genital é a mesma no macho e na fêmea, pelo menos a partir dos dias 58 a 65 de gestação. Contudo, a sua posição irá determinar o diagnóstico (Durocher *et al* 2002).

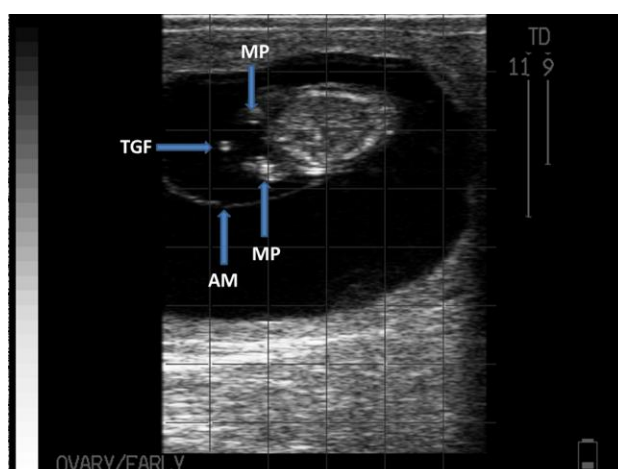
## Procedimento prático

Os primeiros diagnósticos de sexagem fetal foram realizados por Müller e Wittkowski em 1986, identificando o aumento do prepúcio e dos mamilos entre 73 e 120 dias de gestação, utilizando transdutores de frequências 3 e 5 MHz.

O exame ecográfico da vaca com vista á sexagem fetal pode ser feito entre os dias 54 e 100 de gestação, sendo no entanto a idade de gestação ideal entre os dias 60 e 70. Apesar do tubérculo genital ser detetável por ecografia a partir do dia 45 (Imagem 8), este não atinge a sua posição definitiva até ao dia 58 na maioria dos animais. Esta migração pode por vezes ocorrer de forma mais rápida, permitindo um diagnóstico definitivo por volta do dia 54 ou 55 (Imagem 9).



**Imagem 8** – AM-Âmnio; MP-Membro Posterior; TG- Tubérculo Genital Indiferenciado. Tubérculo genital indiferenciado aos 45d. (Imagem obtida pelo autor).



**Imagem 9** – AM-Âmnio; MP-Membro Posterior; TGF- Tubérculo Genital Feminino. Tubérculo genital feminino na base da cauda aos 54d. (Imagem obtida pelo autor).

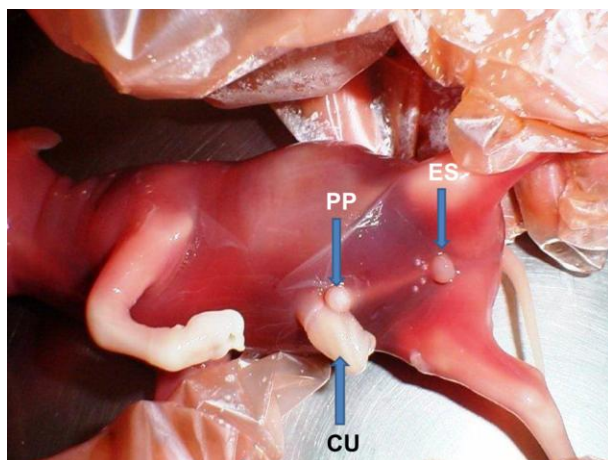
A possibilidade de estabelecer um diagnóstico adequado numa fase mais avançada de prenhez (90 a 100 dias) irá depender da posição do útero na cavidade abdominal e da habilidade do operador para manipular e analisar o corno uterino grávido com a sonda.

Segundo um estudo de revisão no qual foram removidos os fetos para visualização, a genitália externa adquire as características de adulto quando o feto macho apresenta cerca de 20 cm (Dia 113) e o feto fêmea a partir de 45cm (Dia 163) (Ginther 1998).

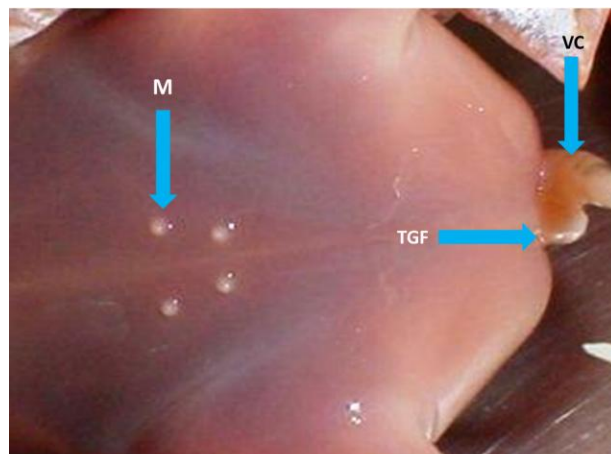
A diferenciação do trato feminino completa-se á volta dos 70 dias de gestação e os mamilos apresentam cerca de 0.6 a 3mm de diâmetro nos dias 80 a 130. A descida dos testículos nos bovinos ocorre por volta dos 90 a 130 dias. Uma vez que a partir do dia 70 de gestação a observação do tubérculo genital não se pode efetuar de forma clara, devido à sobreposição das pregas urogenitais, o termo “genitália externa” deveria ser usado após este dia, e o termo tubérculo genital já não se deve utilizar (DesCôteaux *et al* 2010).

No macho, o tubérculo genital, as pregas urogenitais e as intumescências genitais dão origem respetivamente ao pénis, ao prepúcio e ao escroto (Imagem 10), ao passo que na fêmea as

intumescências genitais iniciam uma atrofia gradual e eventualmente desaparecem por volta do dia 50. O tubérculo genital torna-se em clitóris, e as pregas urogenitais formam os lábios vaginais (Imagem 11) (Christmas & Colloton 2007).



**Imagem 10** – CU-Cordão Umbilical; ES-Escroto; PP-Pênis mais Prepúcio; Feto macho com 90 dias apresentando a genitália externa bem desenvolvida. (Imagem gentilmente cedida por Biotran).



**Imagem 11** – M- Mamilos; VC-Vértebras caudais; TGF-Tubérculo genital feminino mais pregas urogenitais. Feto fêmea com 89 dias apresentando desenvolvimento dos tetos rudimentares e dos lábios vulvares + clitóris. (Imagem gentilmente cedida por Biotran).

A eficácia do diagnóstico depende da experiência do operador, da qualidade do equipamento, e das condições de trabalho. Sob condições normais de campo, um operador experiente consegue um diagnóstico preciso e definitivo em cerca de 100% dos animais intervencionados (DesCôteaux *et al* 2010).

### Obtenção da imagem

Após familiarização do operador com a anatomia fetal e estruturas importantes de orientação, este deve iniciar a tentativa de obtenção de uma imagem de qualidade no ecrã.

Cada operador desenvolve as suas próprias capacidades de ecografia uterina à medida que vai adquirindo experiência. Alguns preferem inicialmente palpar o útero para o recuar e de seguida utilizar a sonda ecográfica, enquanto outros optam por iniciar o procedimento de ecografia com o útero na sua posição natural. De forma a obter uma melhor performance o operador deverá desenvolver uma metodologia eficiente e sistemática.

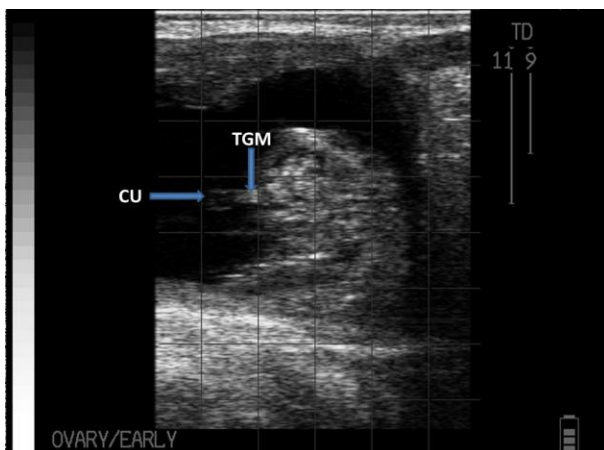
Ao contrário da radiografia, a imagem ecográfica representa apenas uma fina secção do tecido por baixo da sonda. Desta forma a sonda deve ser movida lentamente de forma a localizar e identificar as estruturas pretendidas. Ao localizar o feto este deve ser centrado na imagem e a sonda deve ser movida lentamente em ambas as direções para obter uma imagem adequada da cabeça, batimento cardíaco e cordão umbilical uma vez que serão pontos de referência importantes (Christmas & Colloton 2007).

Assim que o operador se encontrar orientado com a imagem fetal podem ser usadas 3 cortes de imagem diferentes de forma a analisar o feto: o corte (ou vista) lateral, o corte longitudinal e o corte transversal. Destes, o corte transversal é o mais comumente utilizado uma vez que é o corte mais fácil de obter, e quando utilizado a sonda deve ser movida ao longo do feto até à inserção do cordão umbilical no abdómen ventral sendo de seguida movida lentamente para a frente e para trás por forma a detetar a presença ou ausência do tubérculo genital masculino (caudal á inserção do cordão umbilical). O tubérculo genital em condições normais apresenta sempre maior ecogenicidade comparativamente ao cordão umbilical. Caso o tubérculo genital masculino seja detetado o diagnóstico definitivo de “macho” fica estabelecido, ao passo que, se este não for detetado, ou o operador não estiver completamente confiante que tenha visualizado o tubérculo genital masculino, a sonda deve ser movida caudalmente em direção á região perineal do feto. É totalmente desaconselhável que o operador diagnostique o feto como fêmea apenas pela não observação do tubérculo genital masculino. Este movimento caudal da sonda e visualização do períneo pode parecer fácil em teoria, mas na prática a região perineal é relativamente difícil de ecografar porque se encontra geralmente escurecida pela parede uterina ou por algum placentoma. É difícil distinguir a diferença de ecogenicidade entre o tubérculo genital feminino e a vértebra coccígea da cauda. No entanto o tubérculo genital feminino apresenta-se bilobado ou trilobado enquanto a vértebra coccígea se apresenta unilobada. Outra causa comum de identificação incorreta de uma fêmea como macho deve-se ao facto de por vezes o feto apresentar a cauda entre as pernas podendo as vértebras caudais aparecerem na imagem como um ponto de ecogenicidade e localização semelhante ao tubérculo genital masculino. (Quintela *et al* 2011).

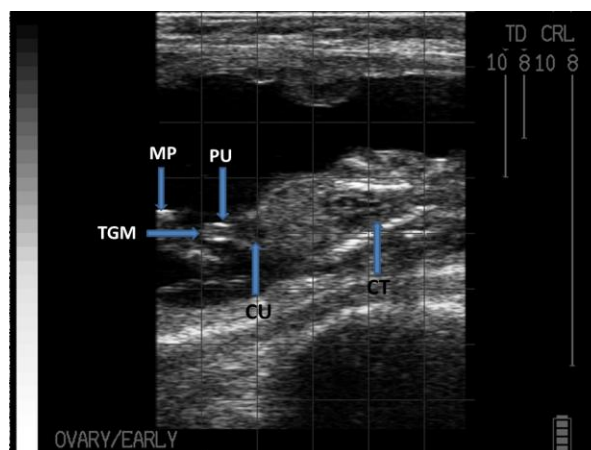
O corte longitudinal é ligeiramente mais difícil de obter que o corte transversal. No entanto fornece uma melhor orientação ao operador bem como a vista mais clara possível do tubérculo genital e de outras estruturas anatómicas úteis á sexagem fetal como escroto, mamilos e pénis (Christmas & Colloton 2007).

### **O macho em diferentes projeções**

Por volta do dia 58 de gestação, o tubérculo genital atinge a sua posição final, ligeiramente caudal ao umbigo (Imagem 12 e 13).



**Imagem 12** - CU-Cordão Umbilical; TGM-Tubérculo Genital Masculino. Corte transversal da região do cordão umbilical apanhando também o tubérculo genital masculino com 60 dias de gestação. (Imagem obtida pelo autor).



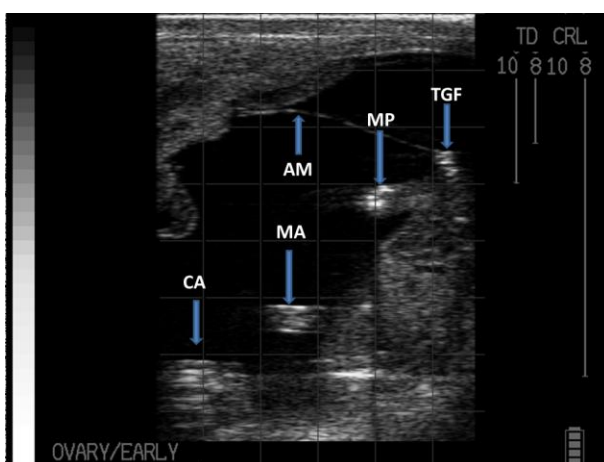
**Imagem 13** - MP-Membro Posterior; PU-Pregas Urogenitais; CU-Cordão Umbilical; CT-Cavidade Torácica; TGM- Tubérculo Genital Masculino em corte longitudinal com as pregas urogenitais aos 68 dias de gestação. (Imagem obtida pelo autor).

Entre os dias 65 e 70 de gestação, a maioria dos fetos macho irão mostrar uma alteração na aparência do tubérculo genital. A estrutura com dois lóbulos visualizada inicialmente dá origem a uma estrutura com 4 lóbulos que representa o tubérculo genital e as pregas urogenitais (Imagem 13).

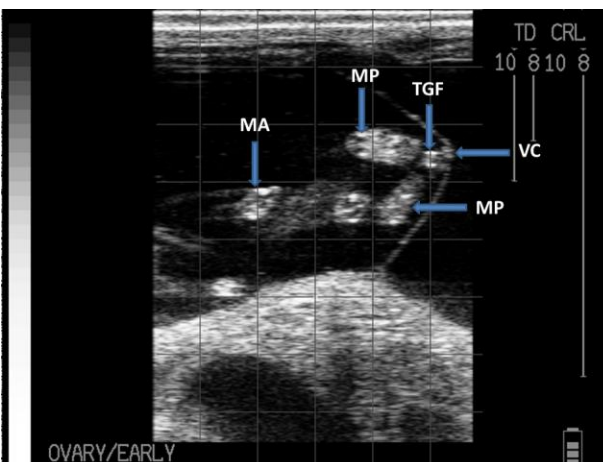
Nesta fase, as intumescências genitais encontram-se fundidas perto da linha média. Estas estruturas são a origem do escroto e aparecem na forma de duas pequenas linhas brancas em cada lado da linha branca entre os membros posteriores.

### A fêmea em diferentes projeções

Por volta do dia 58 de gestação, o tubérculo genital atinge a sua posição final por baixo da cauda fetal (Imagem 14 e 15).



**Imagem 14**- CA-Cabeça; AM-Âmnio; MA-Membro anterior; MP-Membro posterior; TGF- Tubérculo genital feminino em corte lateral. (Imagem obtida pelo autor).



**Imagem 15**- CA-Cabeça; AM-Âmnio; MA-Membro anterior; MP-Membro posterior; VC-Vertebra caudal; TGF- Tubérculo genital feminino em corte longitudinal. (Imagem obtida pelo autor).

## **Resultados de sexagem fetal**

Ginther (1998), através de um estudo com 16 animais, demonstra que o primeiro dia a partir do qual os diagnósticos se tornaram 100% eficazes em machos foi o dia 52 de gestação e o dia 53 para fêmeas. Nos restantes dias até ao dia 60 de gestação a eficácia manteve-se de 100%.

Estes resultados estão de acordo com outros autores, (DesCôteaux *et al* 2010; Christmas & Colloton 2007), os quais mais recentemente consideraram o dia 55 de gestação como o dia mais precoce para o início da sexagem por ecografia, devido à migração do tubérculo genital se encontrar bastante avançada. Os mesmos autores mencionam ainda que a eficácia do diagnóstico pela localização do tubérculo genital pode ser de tal forma elevada que acham mais provável que havendo algum erro, este resulte de um erro de comunicação e não de um erro de observação ecográfica.

Em condições de campo, a sexagem pode ser feita de forma rápida e eficaz se for feita por um operador experiente, podendo ser incorporada no trabalho de acompanhamento reprodutivo de rotina da exploração. O diagnóstico de sexagem fetal, como exame altamente especializado que é, apresenta-se como uma técnica difícil de aprender, mas assim que se aprende torna-se simples, rápida e eficaz. É necessária uma grande habilidade no reconhecimento das estruturas fetais e uma grande destreza com a sonda ecográfica e com a mão para a colocar onde desejado por forma a obter uma imagem favorável e adequada à visualização das características fetais primárias e secundárias de macho e fêmea.

## **Experiencia adquirida durante o estágio**

Nos 3 diferentes locais onde efetuei o estágio fui tendo contacto com a ecografia reprodutiva e com a sexagem fetal por ecografia de diferentes formas e com diferentes finalidades.

No período de estágio realizado em Évora pude discutir o tema de sexagem fetal com a Dra. Carolina Maia. Na sua prática de dia a dia, a Dra. Maia utiliza o ecógrafo nos acompanhamentos de rotina às explorações, não utilizando no entanto o procedimento de sexagem fetal por rotina. Embora tenha elevada experiência em ecografia reprodutiva e tenha conhecimentos e prática suficiente para realizar a sexagem fetal, este procedimento ainda não é visto como uma mais-valia pelos produtores. A razão apontada para esta fraca aceitabilidade por parte dos produtores é o custo acrescido que a técnica traz à exploração uma vez que o tempo gasto na visita de rotina aumentará e consequentemente a fatura paga ao Médico Veterinário será maior uma vez que o pagamento é feito por hora de serviço prestado.

Em relação ao Brasil o contacto com a ecografia reprodutiva e com a sexagem fetal foi diferente. A Biotran como empresa de produção de embriões vende aos seus clientes as recetoras com uma gestação de 60d, do sexo que o produtor pretender. Assim as recetoras são submetidas a uma avaliação para diagnóstico de gestação 26 a 29 dias após a

transferência dos embriões sendo os animais com diagnóstico de gestação positivo posteriormente avaliados aos 60 dias de gestação para diagnóstico do sexo fetal. Este procedimento é crucial para a empresa porque no contrato efetuado com o cliente está especificado quantos animais ele pretende obter por doadora através da técnica de FIV ou TE, bem como o sexo que pretende. Caso o produtor pretenda obter exclusivamente fêmeas e aquando da sexagem fetal é diagnosticado um ou vários machos, é efetuado o aborto naquelas recetoras de forma a poderem estar aptas á transferência de outro embrião o mais cedo possível.

Toda esta dependência da empresa neste procedimento permitiu-me adquirir novos conhecimentos e aplicabilidades acerca da sexagem fetal por ecografia. Um dos cursos que tive oportunidade de assistir (não como inscrito) ao longo das 4 semanas foi sobre “Sexagem Fetal e Perspetivas Futuras do Uso do Ultrassom” onde pude assistir a toda a revisão anatómica das estruturas primárias e secundárias de sexagem em peças frescas de matadouro, bem como praticar a sexagem com ecógrafo em peças de matadouro. Uma vez que na Biotran os ecógrafos utilizados na prática de campo eram sempre equipamentos transportáveis com grande ecrã, embora não tenha praticado muito o manuseamento da sonda e do útero para obter uma boa imagem do tubérculo genital, pude adquirir uma elevada experiência na observação da imagem ecográfica de sexagem fetal.

Durante as 5 semanas de estágio efetuado na clínica de Lander o contacto com a técnica foi acentuado. Aqui dispus de um aparelho de ecografia portátil, que utilizava em exclusividade de forma a proceder aos diagnósticos de gestação e á sexagem fetal aquando das visitas de acompanhamento reprodutivo com a Dra. Lori Lenihan. Nas explorações onde é utilizada a ecografia como procedimento de rotina nos acompanhamentos reprodutivos, a sexagem fetal é realizada na quase totalidade dos animais colocados para reconfirmação do diagnóstico de gestação por volta dos 60 a 70 dias.

Embora os serviços veterinários nestas explorações se façam pagar por tempo gasto, os produtores são favoráveis ao investimento extra porque consideram uma mais-valia o facto de poderem saber em antecipação qual o sexo do feto que as suas vacas produtoras de leite carregam no seu interior. Esta aceitação, por parte dos produtores, da técnica de sexagem fetal por ecografia tem diferentes objetivos nas diversas explorações com que tive contacto. Em algumas o objetivo era prever qual a percentagem de machos e fêmeas que teria numa dada altura do ano para poder pré estabelecer contractos de venda com potenciais compradores de animais. Noutros casos a sexagem fetal era feita de uma forma não contínua, sendo utilizada em períodos em que diferentes sémenes sexados estavam a ser testados na exploração de forma a poder ter uma noção sobre os lotes que melhor satisfaziam os seus objetivos. Uma das explorações realizava este procedimento, única e exclusivamente por curiosidade, não tirando

qualquer proveito económico da técnica. Outro motivo com o qual me deparei numa exploração (exclusivamente de vacas Jersey) foi a seguinte: os animais eram avaliados para a reconfirmação do diagnóstico de gestação e sexagem fetal aos dias 56 a 60 de gestação, e se nas gestações gemelares detetadas anteriormente se verificasse a existência de um macho e uma fêmea ou de 2 machos, a gestação era interrompida, sempre que o período de lactação fosse inferior a 120 dias. No entanto, o ponto que a maioria dos produtores considerava mais útil era o facto de terem a informação de qual o sexo do feto transportado por uma vaca, que por motivos vários poderá ser eliminada. Se estivermos perante uma exploração de leite onde o objetivo é obter o maior número de fêmeas possíveis, o produtor poderá decidir com maior objetividade se será ou não rentável manter o animal na exploração.

Após todo o estágio realizado, considero que fiquei proficiente na utilização da técnica de sexagem fetal por ecografia, o que poderá ser para mim de extrema utilidade no futuro.

## **Considerações Finais**

A técnica de sexagem fetal por ecografia é um procedimento altamente especializado o qual requer ao operador um elevado grau de conhecimentos teóricos e experiência prática de forma a poder ser instaurado como procedimento de rotina nas explorações leiteiras ou mesmo explorações de gado de corte. Esta técnica encontra-se atualmente disseminada por todo o mundo com diferentes finalidades para os produtores. Em Portugal existem vários profissionais veterinários habilitados e com capacidades para realizarem a sexagem fetal nas explorações, embora não o façam de uma forma rotineira.

Na minha opinião é um procedimento que de futuro será uma mais-valia para a exploração podendo ser utilizada de forma rentável. Tal como referido anteriormente são várias as finalidades pelas quais os produtores podem utilizar a técnica de uma forma rentável. Uma exploração leiteira a utilizar esta ferramenta de forma sistemática pode ter um maior controlo do efetivo futuro da exploração fazendo assim previsões produtivas mais eficientes. Entre outros, o facto de se saber com antecipação o sexo fetal permite ter uma melhor expectativa acerca da dificuldade de parto, uma vez que há mais partos distócicos com fetos machos. Desta forma a exploração poderá promover um controlo mais rigoroso aos animais que se encontram em fase pré parto e ter cuidados acrescido com as fêmeas gestantes de machos, sem, claro deixar de prestar os cuidados necessários aos restantes partos. Isto poderá diminuir drasticamente o número de partos distócicos implementando uma maior vigia dos partos de machos.

As explorações que fazem recria e pretendem vender alguns animais excedentes de forma a obter receita extra, podem também realizar contractos futuros de venda baseados na quantidade de fêmeas ou machos esperados. Talvez o ponto com maior retorno económico

para a exploração é o facto de o produtor possuir mais um dado acrescido para poder decidir com maior objetividade económica se deve ou não refugar um animal, consoante este esteja gestante de um feto macho ou fêmea, ou um parto gemelar com um macho e uma fêmea. Considerando todos estes pontos dever-se-ia, na minha opinião, ser dado a conhecer ao produtor as possíveis vantagens desta técnica, e serem discutidos diferentes planos de pagamento ao veterinário por forma a rentabilizar este serviço tanto ao produtor como ao veterinário.

# Bibliografia

Barone R, (1990), "Splanchnologie II, Appareil urogénital, fœtus et ses annexes, péritoine et topographie Abdominale", in **Anatomie comparée des mammifères domestiques**, 4<sup>a</sup> Ed, Vigot Ed, 506 - 674

Barros BJ, Visitin JÁ, (2001), "Controle ultra-sonográfico de gestações mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fœtos bovinos zebuínos". **Brazilian Journal Veterinary Rescherch Animal Science**, 38, 74-79

Canada N, Carvalheira J, Costa JMC, Rocha A, (2004), "Prevalence of Neospora caninum infection in dairy cows and its consequences for reproductive management", **Theriogenoly**, 62, 1229-1235

Christmas RA, Colloton J, (2007), "Ultrasound Determination of Fetal Gender", in **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2<sup>a</sup> Ed, Elsevier Inc., 303-307

Colloton J, DesCôteaux L, Gnemmi G (2010), "Scanning Techniques and Common Errors in Bovine Practice" in **Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography**, 1<sup>a</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 21-26

Curran S, Kastelic JP, Ginther OJ (1989), "Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle", **Animal Reproduction Science**, 19, 217 – 227

DesCôteaux L, Colloton J, Picard-Hagen N, (2010), "Bovine Pregnancy" in **Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography**, 1<sup>a</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 81-99

DesCôteaux L, Picard-Hagen N, Durocher J, Buczinski S, Colloton J, Chastant-Maillard S, Curran S, (2010), "Bovine Fetal Development After 55 Days, Fetal Sexing, Anomalies, and Well-Being" in **Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography**, 1<sup>a</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 101-124

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, (2007), "Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*", **Clinical Microbiology Reviews**, 20, 323-367

Durocher J, DesCôteaux L, Carrière PD, (2002), "Évaluation échographique du tractus reproducteur bovin: Détermination du sexe du fœtus", **Le Médecin Vétérinaire du Québec**, 32, 132 – 134

Gayrard V, Carrière PD, DesCôteaux L (2010), "Recommendations, Essential Concepts, and Common Artifacts in Ultrasound Imaging" in **Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography**, 1<sup>a</sup> Ed, Wiley-Blackwell, 3-19

Ginther OJ (1998), "Pregnancy: Applied Aspects", in **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Cattle**, Equiservices Publishing, 196-205

- Goddard PJ (1995), "General principles", In **Veterinary Ultrasonography**, CAB International, Wallingford, 1-9
- Hughes EA, Davies DAR (1989), "Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle", **Veterinary Record**, 124, 456-458
- Inomata T, Eguchi Y, Yamamoto M, Asari M, Kano Y, Mochizuki K (1982), "Development of the external genitalia in bovine fetuses", **Japanese Journal of Veterinary Science**, 44, 489 - 496
- Kähn W, (1989), "Sonographic fetometry in the bovine", **Theriogenology**, 31, 1105 – 1121
- Kastelic JP, Curran S, Pierson RA, Ginther OJ (1988), "Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus", **Theriogenology**, 29, 39 – 54
- Kolour AK, Batavani RA, Ardabili FF, (2005), "Preliminary observations on the effect of parity on first day ultrasonic detection of embryo and its organs in bovine", **Journal of Veterinary Medicine**, 52, 74 - 77
- Muller E, Wittkowski G (1986), "Visualization of male and female characteristics of bovine fetuses by real-time ultrasonics", **Theriogenology**, 25, 571-574
- Nyland TG, Mattoon JS, Wisner ER (1995), "Physical Principles, Instrumentation, and Safety of Diagnostic Ultrasound", In **Veterinary Diagnostic Ultrasound**, WB Saunders Company, 3-18
- Pierson RA, Ginther OJ (1984), "Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers", **Theriogenology**, 22, 225 – 233
- Pierson RA, Kastelic JP, Ginther OJ (1988), "Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses", **Theriogenology**, 29, 3 – 20
- Quintela LA, Becerra JJ, Pérez-Marín CC, Barrio M, Cainzos J, Prieto A, Díaz C, Herradón PG, (2011), "Fetal gender determination by first-trimester ultrasound in dairy cows under routine herd management in Northwest Spain", **Animal Reproduction Science**, 125, 13-19
- Rajamahendran R, Ambrose DJ, Burton B, (1994), "Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction: a review", **Canadian Veterinary Journal**, 35, 563 – 572
- Rocha A, Martins A, Carvalheira J, (2010), "Fertility Time Trends in Dairy Herds in Northern Portugal", **Reproduction of Domestic Animals**, 45, 896-899
- Rocha A, Rocha S, Carvalheira J, (2001), "Reproductive Parameters and Efficiency of Inseminators in Dairy Farms in Portugal", **Reproduction Domestic Animals**, 36, 319-324

## Anexos



Anexo I – Certificado do “Curso de Transferência de Embriões em Bovinos”, coordenado pelo Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.