

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro

Marcelo Severo Rodrigues

Uruguaiana, junho de 2017.

MARCELO SEVERO RODRIGUES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Fabrício Desconsi Mozzaquatro,
Médico Veterinário, Msc, Dr.

**Uruguaiana
2017**

MARCELO SEVERO RODRIGUES

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Equina

Relatório apresentado e defendido em 27 de Junho de 2017

Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro
Orientador

Med. Vet. Natan da Cruz de Carvalho
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico este trabalho ao meu pai, Sandro Mokfa da Silva, homem que me espelho e admiro pelo sua coragem e pelo pai que és.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado até onde cheguei e ter dado a oportunidade de me tornar Médico Veterinário.

Aos meus pais, Sandro e Maria Gorete, que não mediram esforços para realizações dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, João Alberto e Victor, pelo apoio, palavras de motivação e pela parceria de sempre.

À minha namorada, Débora Lavarda, que mesmo em momentos de estresse me apoiou e me ajudou a não desistir nunca.

Ao professor Fabrício Desconsi Mozzaquatro, por seus ensinamentos e orientação deste trabalho.

Aos demais mestres, pois mesmo com as limitações de estrutura do campus, nos passaram seus conhecimentos e vivências para que fossemos excelentes profissionais.

Ao médico veterinário, Carlos Guilherme de Castro Schutzer, pela convivência, amizade e ensinamentos passados durante o estágio supervisionado.

Aos demais estagiários da Embrio Equi, Renato, Giovana, Michelle, Ricardo, Bruno (japonês) e Arthur (carioca), pela troca de experiências e amizades.

Aos funcionários e amigos de São Simão, Nana, Buiú, Ronaldo, Marcelo, Marcela, Beto, Xanda, Bento Quirino e Noila pelo acolhimento amenizando a saudade de casa.

Aos amigos, José Porto, Silvério Ferrão, Guilherme Magrini, Leonardo Bertei, Belchior Sanes e Willian Klein, pela amizade e parceria.

À equipe do escritório da Tellechea & Bastos Leilões, pela oportunidade de fazer parte desta família.

A estes agradeço.

Não, eu não tenho jeito de campeão. Se eu fosse um cavalo de corrida, ninguém apostaria um centavo em mim. Mas eu corro e, curiosamente, sempre chego onde eu quero chegar.

Augusto Branco

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV). Este foi realizado em reprodução equina, objetivado pelo interesse em trabalhar e adquirir experiência na área. Foram desenvolvidas atividades de acompanhamento da rotina das principais biotécnicas da reprodução equina como manejo reprodutivo, controle folicular, coleta e processamento de sêmen, exames ultrassonográficos diversos, inseminação artificial e transferência de embriões. Como local de estágio optou-se pelo Centro Avançado de Reprodução Equina Embrio Equi, localizado na cidade de São Simão – SP, sob a orientação do professor Doutor Fabrício Desconsi Mozzaquatro e supervisão do Médico Veterinário Carlos Guilherme de Castro Schutzer. O estágio foi realizado entre os dias 02 de janeiro e 28 de abril de 2017, perfazendo um total de 510 horas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Imagens de setores do Haras Bandeirantes (Embrio Equi).....	13
FIGURA 2 - A) Controle folicular feito em doadora; B) Imagem ultrassonográfica com diâmetro folicular	16
FIGURA 3 - Procedimentos de coleta e limpeza de embrião. A) Infusão do líquido; B) Massagem uterina; C) Recuperação do líquido com embrião; D) Placa de petri utilizada na procura e limpeza do embrião; E) Embriões limpos prontos para serem envasados..	18
FIGURA 4 - Procedimentos de lavagem uterina: A) Infusão de líquido; B) Recuperação do líquido.....	20
FIGURA 5 - Frascos coletados de uma lavagem uterina.	21
FIGURA 6 - Sala de preparação da vagina artificial. Vagina artificial montada com materiais necessários para a higienização do pênis do garanhão.....	23
FIGURA 7 - Higienização do pênis do garanhão.....	24
FIGURA 8 - Coleta de Sêmen.....	24
FIGURA 9 - Materiais utilizados para coleta, filtração, diluição e concentração do sêmen....	25
FIGURA 10 - Cálculo para diluição do sêmen com Botucrio®.....	28
FIGURA 11 - Processo de congelamento de sêmen.....	29
FIGURA 12 - A) Descongelamento do sêmen; B) Inseminação artificial na ponta do corno.	31
FIGURA 13 - Padrões preconizados no pós-descongelamento pelo CBRA.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas na Embrio Equi	14
TABELA 2 - Critério de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.	33
TABELA 3 - Características seminais dos Equinos.	37

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	11
2 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	12
2.1 Local de Estágio.....	12
2.2 Tabelas de Atividades Desenvolvidas	14
2.3 Manejo reprodutivo das éguas	14
2.3.1 Controle folicular	15
2.3.2 Transferência de Embriões.....	16
2.3.2.1 Procedimento	16
2.3.2.2 Sincronização de receptoras	18
2.3.3 Endometrite	19
2.3.3.1 Endometrite pós-cobertura	19
2.3.3.2 Endometrite Bacteriana/ fúngica	21
2.3.3.3 Lavagem/infusão uterina para remoção de biofilme	22
2.4 Manejo dos Garanhões.....	22
2.4.1 Coleta de Sêmen.....	23
2.4.2 Análise do sêmen	25
2.4.3 Sêmen a fresco (diluído)	26
2.4.4 Sêmen Resfriado / Refrigerado	26
2.4.5 Sêmen congelado.....	27
2.5 Inseminação Artificial.....	29
2.5.1 Sêmen fresco/diluído / Sêmen resfriado.....	30
2.5.2 Sêmen Congelado.....	30
3 – DISCUSSÃO	32
3.1 Transferência de Embrião	32
3.1.1 Coleta de embriões	34
3.1.2 Receptoras	35
3.2 Congelamento de sêmen	36
4 - CONCLUSÃO	40
5 – REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	44

1 – INTRODUÇÃO

A equideocultura no Brasil é uma área que mesmo em meio a crises, vem crescendo ano após ano. Os dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016) reforçam o crescimento do setor, que em 2015 totalizava uma renda de 16,15 bilhões no país.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2011), o rebanho mundial equino se aproxima dos 60 milhões de cabeças, sendo que o Brasil possui o quarto maior rebanho totalizando 5,3 milhões de cabeças (IBGE, 2015).

Investimentos no setor estão em alta devido à procura de animais com mérito genético. Nesse sentido, a uma maior procura, por parte dos produtores para a utilização de biotecnologias ligadas à reprodução animal.

A escolha do local de estágio levou em consideração a rotina de trabalho e credibilidade da empresa, aplicação de biotecnologias da reprodução em equinos, bem como, o interesse em aprimorar os conhecimentos na área.

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi realizado na empresa Embrio Equi que está localizada na cidade de São Simão no estado de São Paulo. O proprietário e supervisor do estágio foi o Dr. Msc. Carlos Guilherme C. Schutzer que tem mais de 10 anos de experiência na prestação de serviços em reprodução equina das mais variadas raças. O ECSMV ocorreu no período de 02 de Janeiro a 28 de Abril de 2017, sob a orientação do Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro totalizando 510 horas.

O presente relatório tem como objetivo apresentar as diversas atividades desenvolvidas durante o ECSMV.

2 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Local de Estágio

A Embrio Equi está localizada às margens da rodovia Anhanguera (SP-330), no km 274 norte no município de São Simão, estado de São Paulo. A localização estratégica, a 50 km do aeroporto da cidade de Ribeirão Preto e a 150 km do aeroporto de Campinas, facilita o envio e o recebimento de sêmen e embriões para todas as partes do Brasil. A Embrio Equi está inserida no Haras Bandeirantes, pertencente à Fazenda São José.

A figura 1 representa as dependências do haras, que corresponde à área de 70 hectares, contendo 30 piquetes de pastagem de Tifton, *Brachiaria* spp., capim vaqueiro, grama estrela e pensacola. Possui 4 pavilhões de cocheiras, totalizando 103 baias, sendo que dois pavilhões, de 20 cocheiras cada, são destinados a doadoras e também servem de “baias parideiras”. O restante é ocupado por reprodutores e potros desmamados com diferentes idades. Dentro de um dos pavilhões das receptoras há um tronco de contenção para exames ginecológicos das éguas (palpação transretal, exame ultrassonográfico) e aplicação de hormônios e medicamentos.

Possui um escritório com almoxarifado, um laboratório, com comunicação externa por meio de janelas, contendo todos os equipamentos e materiais necessários para desempenhar com sucesso os serviços prestados em reprodução equina, além de uma sala destinada a lavagem, esterilização e embalagem de materiais e armazenamento de botijões com nitrogênio. Juntamente com o laboratório, na parte externa, há o local de coleta de sêmen e embriões, que possui um manequim, tronco de contenção, mesa de inox e uma sala para preparação dos materiais necessários para os procedimentos que serão realizados (preparação da vagina artificial, primeira limpeza de materiais, etc). Também há um pavilhão onde são ministrados cursos, com diversos troncos de contenção e um curral para manejar as receptoras com tronco de contenção e vários curros de apartação.

As doadoras ficavam alojadas na sede da central, onde recebiam ração, sal mineral à vontade e vitaminas, quando necessário. Além disso, tinham acesso a piquetes com pasto de qualidade fazendo um rodízio de pastagens conforme a altura do pasto remanescente.

As receptoras permaneciam em piquetes separados com pastagem de qualidade, sal à vontade e se necessário suplementação vitamínica. As receptoras eram manejadas diariamente a fim de controlar o ciclo estral e monitorar o desenvolvimento da gestação.

Muitas das transferências de embriões realizadas na Embrio Equi eram de éguas de clientes externos à empresa, assim quando as receptoras atingiam 60 dias de gestação as fêmeas eram transportadas para as propriedades dos clientes, onde ocorreria o parto.

O veterinário Carlos Schutzer, além de ser o proprietário da Embrio Equi, prestava assistência na Fazenda São João da Cachoeira. Esta propriedade era produtora de gado da raça Nelore e equinos da raça Quarto de Milha. O veterinário ainda prestava serviços de atendimento clínico e reprodutivo a terceiros, além de ser inspetor oficial da ABQM (Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Quarto de Milha) e ABCPaint (Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Paint Horse).

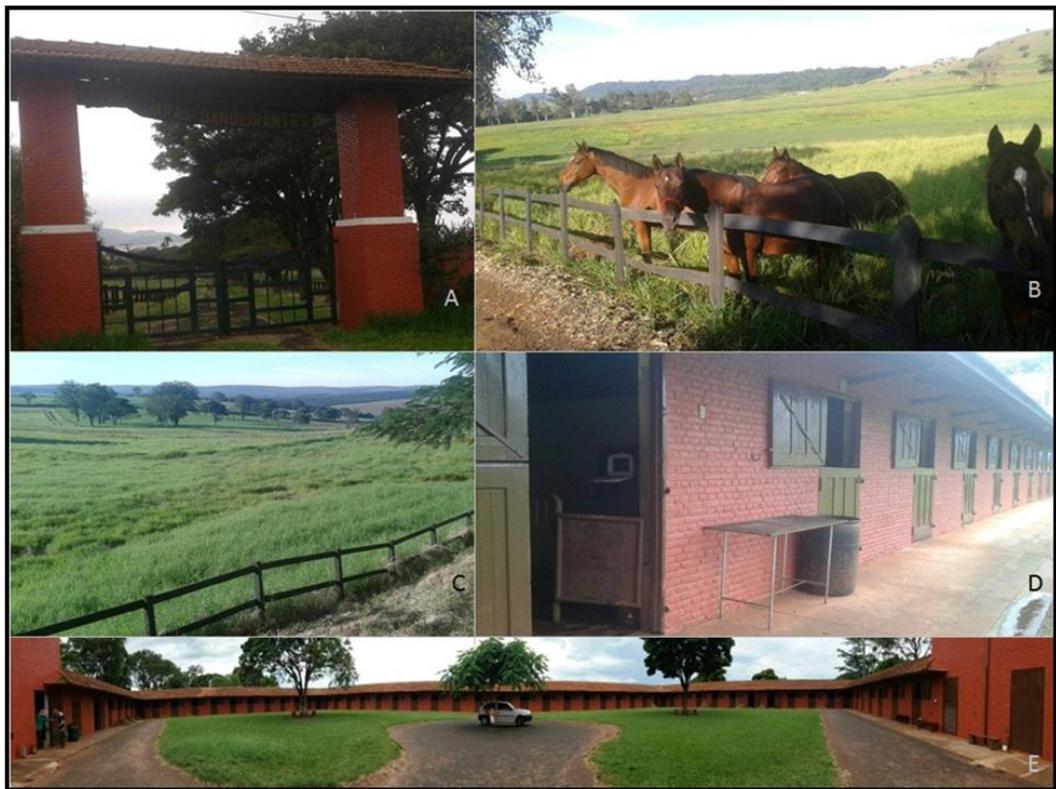


FIGURA 1 - Imagens de alguns setores do Haras Bandeirantes (Embrio Equi). A) Entrada do Haras; B) Piquete das doadoras; C) Piquete das receptoras; D) Pavilhão de cocheiras com tronco de contenção; E) Pavilhão de cocheiras. Fonte: Arquivo pessoal.

2.2 Tabelas de Atividades Desenvolvidas

TABELA 1 - Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas no Centro Avançado de Reprodução Equina Embrio Equi durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Atividades	Número	%
US de acompanhamento/dinâmica folicular	1879	64,83
Diagnóstico de gestação aos 15 dias	59	2,03
Sexagem fetal	9	0,31
Manejo com égua doadora/receptora	339	11,69
Lavagem uterina pós-cobertura/inseminação	35	1,20
Curativos	389	13,42
Coleta de sêmen	22	0,75
Monta controlada	11	0,37
Inseminação artificial	79	2,72
Transferência de embrião	69	2,38
Congelamento de sêmen	4	0,13
Prolapso uterino (bovino)	1	0,03
Vulvoplastia	2	0,06
Total	2898	100

Para um melhor entendimento do texto, serão descritos separadamente os manejos realizados com os machos e com as fêmeas.

2.3 Manejo reprodutivo das fêmeas

A égua é um animal de ciclo estral sazonal. Seu ciclo tem início no mês de outubro até o mês de março período em que os dias são mais longos (fotoperíodo positivo). Com o intuito de antecipar o início da estação reprodutiva, realizavam-se no haras protocolos de iluminação artificial. Este protocolo foi realizado tanto em receptoras como em doadoras e consistia em suplementar 5 horas de luz no período das 17 horas até às 22 horas, fazendo assim com que as éguas começassem a ciclar em agosto tendo o seu ciclo regular em setembro. O protocolo teve

início entre 15 e 20 de Maio e foi mantido até que as éguas ficassem prenhes. A manipulação do fotoperíodo é extremamente desejável para adequar os nascimentos ao ano hípico.

2.3.1 Controle folicular

O controle folicular foi realizado diariamente através da palpação retal e ultrassonografia com o intuito de saber o melhor momento para a realização da inseminação artificial e/ou monta natural nas doadoras, já nas receptoras para verificar o momento exato da ovulação a fim de sincronizar doadora/receptora para programar o procedimento de coleta e transferência de embriões.

Para o exame ultrassonográfico foi utilizado um ultrassom da marca Mindray® modelo DP 2200 e outro da marca Aloka® modelo ssd-550.

O exame tinha a intenção de analisar o crescimento folicular, presença de corpo lúteo, folículos anovulatórios, integridade do útero e grau de edema uterino.

Quando as éguas atingiam o grau de edema uterino igual a 3 com folículos ≥ 35 milímetros de diâmetro (Figura 2) realizava-se a indução de ovulação com deslorrelina (Sincrorelin ®) na dose de 0,750 mg. Em casos de éguas velhas ou animais no final da estação era utilizado a associação de deslorrelina (Sincrorelin ®) com hCG (Vetecor ®) na dose de 1500 UI.

Através deste controle e da indução de ovulação, era possível a programação da inseminação artificial ou monta natural, ou seja, quando utilizado somente a deslorrelina o momento da ovulação seria aproximadamente 40 a 46 horas após a indução e com a associação da deslorrelina e hCG a ovulação iria ocorrer próximo a 36 horas.

Posteriormente à ovulação realizavam-se exames ultrassonográficos com a intenção de verificar a presença de um corpo lúteo funcional. No caso das doadoras, avaliavam-se no exame as condições uterinas das mesmas (presença de líquido, dobras endometriais, tônus uterino).



FIGURA 2 - A) Controle folicular feito em doadora; B) Imagem ultrassonográfica com diâmetro folicular.
Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.2 Transferência de Embriões

Esta técnica consiste coletar o embrião de uma matriz doadora e transferir à uma matriz receptora com o intuito de acelerar o melhoramento genético. A seguir, serão descritos procedimentos desta biotecnologia acompanhados e realizados na Embrio Equi durante o ECSMV.

2.3.2.1 Procedimento

Na Embrio Equi, a maioria das doadoras era da raça Quarto de Milha. Estas éguas possuíam uma atenção maior por parte da empresa como alimentação diferenciada e casqueamento a cada 30 dias.

Após 8 dias da ovulação, era realizado exame de palpação retal e ultrassonográfico com a intenção de verificar o tônus uterino, a presença um corpo lúteo funcional e as características do útero da égua doadora. Desejava-se que o útero estivesse com uma

consistência firme e na imagem ultrassonográfica não apresentasse nenhum tipo de alteração como pontos de líquidos, pontos de ar, etc.

Era feita uma higienização da região do períneo e iniciado o procedimento de coleta do embrião. Os materiais utilizados eram previamente esterilizados em autoclave e estufa. O responsável pelo procedimento vestia uma luva de palpação retal do avesso e com a ajuda de um auxiliar pegava a sonda de transferência, protegendo a ponta. Após lubrificava o dorso da luva com Kmed® e acoplava a bolsa de soro ringer lactato na sonda. Introduzia-se a sonda no útero da égua posicionando o balão (*cuff*) no corpo do útero e inflava com 20 mL de ar. Após fixação da sonda, a mão era retirada da vagina e introduzida no reto. Este procedimento ajudava o técnico a acompanhar a distensão do útero.

A coleta de embriões foi realizada pelo método fechado. A cada procedimento de lavagem foi infundido em média 1 litro e a saída do líquido era por gravidade e auxiliado por massagem uterina. Este procedimento era repetido por até 3 vezes ou se observar a presença do embrião no filtro coletor (Figura 3).

Após o término da coleta foi aplicado 1 mL de prostaglandina (Estron®) para que essa doadora voltasse a rotina de controle folicular e posteriormente fosse feita nova coleta.

No laboratório foi feita a lavagem do filtro e o seu conteúdo era depositado em uma placa de Petri. Após a localização do embrião, era realizada a lavagem do embrião em 12 gotas do *holding* D-VITTA® (Biodux). Lavava-se o embrião até que todas as sujidades fossem removidas.

O envase do embrião era feito com o próprio *holding* D - VITTA® em uma palheta estéril em que se aspirava um pouco do meio, uma coluna de ar, o meio mais o embrião, uma coluna de ar e completava com o meio até selar a palheta com o auxílio de uma seringa de 1 ml. Para a transferência os procedimentos eram semelhantes com o da inseminação artificial.



FIGURA 3 - Procedimentos de coleta e limpeza de embrião. A) Infusão do líquido; B) Massagem uterina; C) Recuperação do líquido com embrião; D) Placa de petri utilizada na procura e limpeza do embrião; E) Embriões limpos prontos para serem envasados, visualizados com lupa. Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.2.2 Sincronização de receptoras

Todas as receptoras disponíveis fazia-se o acompanhamento folicular para que alguma égua estivesse sincronizada com a doadora em torno de 3 a 4 dias a menos, ou seja a receptora estaria no dia 4 ou 5 em relação a doadora (D8).

Caso a receptora fosse sincronizada artificialmente, aplicava-se 2 mL de estrógeno (Sincrodiol®) durante dois dias. Se o útero estivesse levemente flácido e apresentasse na

imagem ultrassonográfica edema 3, era injetado 10 mL de progesterona (Sincrogest®) semanalmente até 120 dias de gestação.

2.3.3 Endometrite

A endometrite é uma inflamação do endométrio que pode ter origem bacteriana, fúngica ou de algum corpo estranho. Esta inflamação pode ser aguda ou crônica. Segundo Troedsson et al. (1993) esta inflamação representa a maioria dos casos de infertilidade e subfertilidade nos equinos.

2.3.3.1 Endometrite pós-cobertura

Nos equinos, independentemente do tipo de técnica que é utilizada para cobrir a égua, o sêmen era depositado diretamente no útero, gerando uma inflamação. De acordo com Mckinnon (2010), os tratamentos podem ter início a partir de 4 horas após a cobertura, porém era preferível aguardar de 6 a 8 horas após.

Na Embrio Equi, todas as éguas, após 6 horas da cobertura, era aplicado 2 mL de ocitocina com intuito de ajudar na limpeza uterina. Também era realizado, quando necessário a lavagem uterina com soro ringer lactato associado a aplicação de 2mL de ocitocina a cada 12 horas. A tomada da decisão de lavar ou não era feita através da imagem apresentada no exame ultrassonográfico, ou seja, éguas que apresentassem líquido e/ou a persistência de edema após a ovulação era realizada a lavagem uterina. A quantidade de ringer lactado a ser infundida foi variável de “égua para égua”. Foi verificado durante o ECSMV que éguas velhas eram mais acometidas por esse tipo de inflamação, devido a falhas hormonais levando a uma contração uterina inadequada para a limpeza uterina.

Para a realização deste procedimento, foi feita a retirada das fezes da ampola retal, lavagem do períneo 2 ou 3 vezes com detergente líquido e água. A cauda era enfaixada com uma atadura limpa. Após este procedimento, a pessoa responsável pela lavagem calçava uma luva de palpação retal e com um auxiliar pegava a sonda nasogástrica humana nº 02 estéril

acoplando a bolsa de soro ringer lactato. Passava-se na parte superior da luva uma pequena quantidade de lubrificante íntimo (Kmed ®) para a lubrificação e introdução da sonda. Com o braço na vagina é localizado a cérvix introduzindo a sonda e feita a lavagem pressionando o frasco de soro ringer lactato. A retirada do líquido era feita dentro do mesmo frasco para ser avaliado a coloração, odor e presença de debris celular (Figura 4). A lavagem era repetida até que o líquido infundido saísse translúcido (Figura 5). Logo após a lavagem era realizada aplicação de 2 mL de ocitocina, a qual era repetida após 12 horas. Vinte e quatro horas após a lavagem, esta égua era examinada novamente e se necessário, realizada outra lavagem. Esse procedimento era repetido até 3 dias após a ovulação.



FIGURA 4 - Procedimentos de lavagem uterina: A) Infusão de líquido; B) Recuperação do líquido. Fonte: Arquivo pessoal.



FIGURA 5 – Soluções de ringer lactato recuperadas de lavagem uterina após terapia para endometrite persistente pós-cobertura. Nota-se a coloração gradativa do primeiro ao sétimo lavado (da esquerda para direita, respectivamente). Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.3.2 Endometrite Bacteriana/ fúngica

Primeiramente era realizado um teste de triagem (citologia) para verificar se havia ou não a presença de bactérias e/ou fungos. Confirmando a presença, era feita a colheita de material para cultura e antibiograma, determinando assim qual tratamento iria ser administrado.

Previamente a infusão uterina, era realizada uma lavagem uterina com 100 mL de água oxigenada diluída em um litro de soro ringer lactato com a intenção de promover uma ação bactericida no ambiente uterino. Em alguns casos, com a intenção de gerar uma maior irritação, atraindo mais células inflamatórias, utilizava-se 5 ml de PVPI diluídos em 1 litro de soro ringer lactato.

As infusões uterinas se baseavam nos resultados obtidos a partir do antibiograma e ao histórico de cada égua. Quando detectado uma endometrite fúngica, o fármaco de eleição foi o fluconazol. Quando bacteriana, a infusão era feita com amicacina, cloranfenicol ou ceftriaxona diluídos em 30 mL de Botu Killer® (Botupharma). Tratamentos parenterais com

cefetiofur, amicacina e outros fármacos, eram utilizados quando julgados necessários pelo médico veterinário.

2.3.3.3 Lavagem/infusão uterina para remoção de biofilme

O biofilme é uma película protetora para agentes patológicos que é formada em volta do endométrio. Esta proteção faz com que fármacos infundidos ou aplicados via sistêmica não tenham uma boa eficácia. O biofilme costuma ser responsável pela recorrência de infecções após tratamentos antimicrobianos repetidos (SAYE, 2007). Normalmente a presença de biofilme ocorre em éguas mais velhas, porém podem aparecer em éguas novas que apresentem endometrite crônica.

McCue e Ferris (2016) descrevem protocolos hormonais e terapêuticos para serem utilizados a campo que apresentam resultados positivos. A Embrio Equi adota estes protocolos como está descrito a seguir:

Tratamentos utilizados para remoção de biofilme no estágio:

Acetilcisteína (20%) 200mg/ml + Soro Ringer Lactato = Além de ser utilizado nos tratamentos de endometrite crônica, é um excelente mucolítico.

DMSO (50 -200 mL/ litro) + soro ringer lactato = tem efeito anti-inflamatório, ajuda na redução da produção de muco e é muito efetivo na redução de biofilme.

Tris-EDTA e Triacid® (250-500 mL) + soro ringer lactato = Reduz a quelação e promove inativação de agentes antimicrobianos além de ser muito efetivo na remoção de biofilme.

A decisão de qual tratamento usar era tomada através da disponibilidade do fármaco e do histórico da égua.

2.4 Manejo dos Garanhões

Os reprodutores ficavam em piquetes individuais com manjedoura, cocho para ração, cocho d'água e sombra. Alguns destes passavam as noites nas cocheiras. A base nutricional

desses animais era composta por volumoso de boa qualidade, grama Tifton, grama estrela e feno de Tifton, suplementados com concentrado e sal mineral.

Os garanhões alojados nas dependências da Embrio-Equi eram provenientes de diversos lugares do país. Geralmente eram garanhões vitoriosos dentro de suas associações, por este motivo, havia uma grande demanda em relação a pedidos de sêmen para estes animais. Os garanhões eram coletados semanalmente e as doses de sêmen eram enviadas refrigeradas ou congeladas para várias partes do Brasil.

2.4.1 Coleta de Sêmen

A coleta de sêmen era realizada sob demanda. Era recomendado que os veterinários solicitassem as doses de sêmen com antecedência de 24h, este prazo era respeitado para dar tempo de coletar o garanhão, preparar o sêmen e despachar o material em tempo hábil.

A colheita do sêmen era realizada com o auxílio de uma vagina artificial modelo Botucatu, com uma temperatura interna de 42 a 44°C. Previamente a coleta, uma égua em cio era devidamente contida e preparada para servir como manequim para a coleta do sêmen. O garanhão era aproximado a égua em cio para que ocorresse a exposição do pênis. Assim era realizada a limpeza do mesmo com auxílio de algodão embebido em água morna. Este processo esta demonstrado nas figuras 6 e 7 respectivamente.



FIGURA 6 - Sala de preparação da vagina artificial. Vagina artificial montada com materiais necessários para a higienização do pênis do garanhão. Fonte: Arquivo pessoal.



FIGURA 7 - Higienização do pênis do garanhão. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a higienização, o garanhão era novamente estimulado pela égua para uma maior excitação e realizado o salto no manequim. Após o salto o pênis do reprodutor era tracionado para o lado com a intenção de penetrar na vagina artificial. A ejaculação era percebida pelo do balanço da cauda e pela contração sentida com a mão na base do pênis, como mostra a FIGURA 8. Realizada a coleta, o copo coletor era levado à janela que separava as áreas: suja e limpa.



FIGURA 8 - Coleta de Sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.2 Análise do sêmen

A análise do sêmen é dividida em imediata e mediata, a primeira é realizada macro e microscopicamente logo após a coleta e a segunda somente microscopicamente que pode ser analisado posteriormente.

A análise imediata compreende o volume do ejaculado, cor, odor, densidade, motilidade espermática e vigor espermático. Já a mediata compreende a concentração espermática e patologias espermáticas.

Previamente a coleta do garanhão, eram preparados todos os materiais que seriam utilizados sempre procurando mantê-los em uma temperatura de 37 a 38 °C, os materiais utilizados estão descritos na FIGURA 9.



FIGURA 9 - Materiais utilizados para coleta, filtração, diluição e concentração do sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

Após a filtração do sêmen para a retirada da fração gelatinosa, com o auxílio de uma palheta, coletava-se uma gota de sêmen que era depositada em um microtubo contendo 19 gotas de água destilada para ser feita a concentração espermática na câmara de Neubauer. Esta diluição facilitava a contagem pelo profissional, pois bastava contar as células e o resultado era dado em mL, ou seja, se contássemos 120 espermatozoides em cada lado da câmara, teria uma concentração de 120×10^6 espermatozoides por mL.

Após a diluição de 1:1, com o diluente Botu Special® , Botu Turbo®, Botu Sêmen® (Botupharma) ou D-VITTA ® (Biodux) (sendo escolhido de acordo com a disponibilidade), coletava-se uma gota e a depositava entre uma lâmina e uma lamínula onde se analisava a motilidade e o vigor com o auxílio de um microscópio óptico. A motilidade é um percentual subjetivo que era dado ao número de células móveis, já o vigor é a intensidade com que estas células se movimentavam era classificado em uma escala de 1 a 5, em que, 1 era indesejado onde as células se movimentavam em uma velocidade muito baixa e 5 é o máximo que se desejava. O sêmen era considerado viável para uso após as análises descritas acima serem feitas.

2.4.3 Sêmen a fresco (diluído)

Feitas as análises citadas acima, o sêmen estava pronto para ser utilizado. Este tipo de sêmen era utilizado em fêmeas que residiam no haras ou naqueles animais que estavam em haras próximos ao Embrio Equi.

Os diluentes utilizados na rotina eram BotuSpecial®, BotuSêmen®, BotuTurbo® (Biotech Botucatu) ou D-VITTA® (Biodux). A escolha era de acordo com a disponibilidade do produto.

Como rotina, centrifugava-se por 10 minutos a 600 g todo o sêmen a ser utilizado com intenção de diminuir o volume a ser depositado no corpo do útero da fêmea. O *pellet* era ressuspenso em 30 ml de diluente para ser inseminado.

2.4.4 Sêmen Resfriado / Refrigerado

Esse tipo de sêmen era utilizado quando as fêmeas inseminadas estavam em locais distantes. A logística era feita através de transporte por motoboy, quando solicitado dentro do estado ou por transporte aéreo quando a distância era longa.

Canisso et al. (2008), classifica o sêmen como resfriado aquele que está a uma temperatura de 15 – 20 °C e refrigerado aquele que está a uma temperatura de 4 – 6 °C. O que

vai determinar a temperatura é a quantidade de gelo posta no container de transporte. Ou seja, quando era posto um gelo no container o sêmen era considerado resfriado, já o sêmen refrigerado era aquele que no container era utilizado dois gelos reciclados. Ainda era necessário adicionar junto ao frasco do sêmen, dois frascos contendo água para que não ocorresse uma queda brusca na temperatura.

Normalmente o sêmen era centrifugado, o plasma seminal descartado, adicionado a 10 ml de diluente em cada tubo Falcon para ressuspender o *pellet* e depois envasado no Botu IA® para ser enviado. No caso de não centrifugação, a diluição do sêmen foi realizada de acordo com a concentração e com o destino a ser enviado. Quanto à distância a ser percorrida, o cálculo para diluição variava entre 50 e 30 milhões de espermatozoides por ml quando o tempo de transporte fosse menor do que 12 horas e maior que 12 horas respectivamente, para que se tivesse substrato disponível para que continuasse viável.

2.4.5 Sêmen congelado

Durante o ECSM foram acompanhados 4 congelamentos de sêmen de um mesmo garanhão da raça Mangalarga Marchador. Este reprodutor iria passar por uma cirurgia complexa e seu proprietário optou pelo congelamento de sêmen.

Após serem feitas as análises imediatas e mediatas, já citadas acima, era dado o início do processo de congelamento sêmen do garanhão com a centrifugação do sêmen a 600g/10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foi ressuspenso com Botucrío® (Botupharma) para ser envasado. A quantidade de diluente a ser adicionada para a ressuspensão era calculada multiplicando a quantidade de palhetas pelo volume da palheta + a perda pelo selamento (Figura 10).

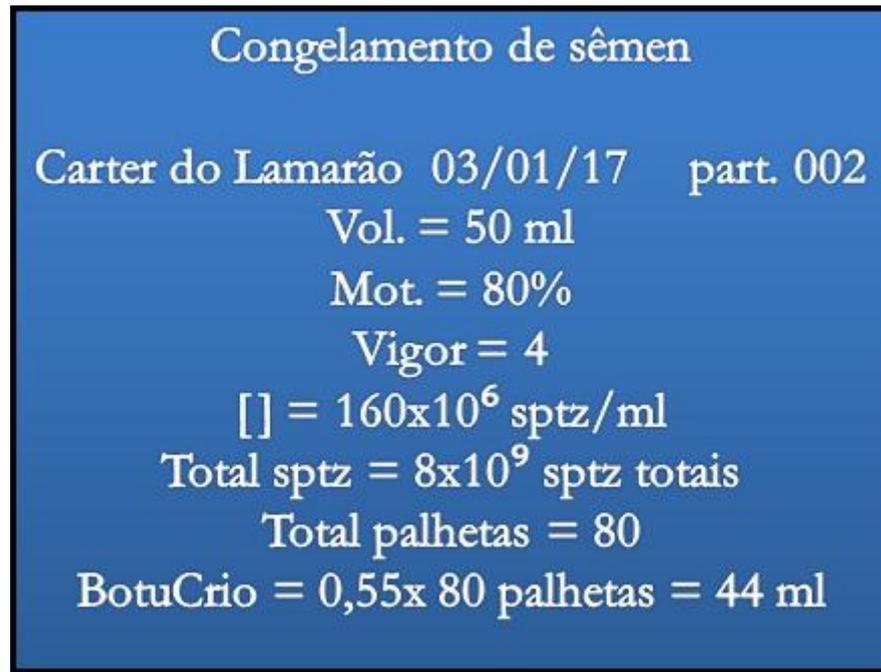


FIGURA 10 - Cálculo para diluição do sêmen com BotuCrio®. Fonte: Arquivo pessoal.

A concentração por palhetas foi ajustada para 100 milhões de espermatozoides/palhetas preconizando no pós-descongelamento uma motilidade e vigor maior que 30% e 3, respectivamente. O envasamento do sêmen realizou-se através de sucção com a boca e selamento com esferas de metal em palhetas de 0,5 mL.

No segundo momento, realizou-se a curva de resfriamento lento ($0,5 \text{ }^\circ\text{C/ min.}$) na máquina de congelação modelo TK 3000® até atingir $5 \text{ }^\circ\text{C}$, logo após, foi imerso o “copo” em nitrogênio e aguardado 15 min fazendo com que atingisse uma temperatura de -60°C e logo em seguida eram colocadas diretamente em nitrogênio, concluindo assim o congelamento do sêmen (Figura 11).



FIGURA 11 - Processo de congelamento de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

2.5 Inseminação Artificial

A inseminação artificial em equinos é a biotecnologia mais difundida no mundo (CANISSO et al., 2008). Segundo Papa et al. (2005), os Estados Unidos é o país que mais utiliza a inseminação artificial com sêmen resfriado no mundo, seguido do Brasil. É a forma mais simples para e uma genética desejada.

2.5.1 Sêmen fresco/diluído / Sêmen resfriado

A inseminação artificial com sêmen fresco/diluído ou com sêmen resfriado consiste na técnica de depositar o sêmen no corpo do útero da égua que se deseja emprenhar com uma pipeta própria (rígida) acoplada no recipiente que se encontra o sêmen. Após conter a égua, era feita a limpeza da ampola retal, lavado 2 a 3 vezes a região do períneo da égua com detergente e água e após era enfaixada a cauda. O procedimento de IA consistia dos seguintes passos:

- 1) Colocar luva de palpação levemente lubrificada (kmed®);
- 2) Com a pipeta protegida dentro da mão, introduzia-se o braço pela vagina;
- 3) Com o dedo indicador se localizava a cérvix;
- 4) A pipeta era introduzida no corpo do útero;
- 5) O sêmen era depositado no corpo do útero.

2.5.2 Sêmen Congelado

A inseminação artificial com sêmen congelado consiste na técnica de depositar o sêmen na ponta do corno com uma pipeta flexível (Figura 12). O procedimento era realizado da seguinte forma:

- 1) Realizava-se higienização do períneo (como citado acima);
- 2) Descongelava-se o sêmen utilizando um descongelador eletrônico a 37°C com o tempo de 60 segundos;
- 3) Com a mão enluvada, introduzia-se a pipeta flexível na vagina da égua;
- 4) A pipeta era direcionada para a ponta do corno ipsilateral ao ovário com folículo ovulatório/ovulação;
- 5) Depositava-se lentamente o volume de 4 palhetas de sêmen perfazendo uma dose inseminante de 200 a 400 milhões de espermatozoides móveis.



FIGURA 12 - A) Descongelamento do sêmen; B) Inseminação artificial na ponta do corno. Fonte: Arquivo pessoal

3 – DISCUSSÃO

3.1 Transferência de Embrião

O Brasil destaca-se na utilização de biotecnologias ligadas a reprodução animal. Em relação aos equinos ele ocupa o terceiro lugar perdendo apenas para os Estados Unidos e Argentina (GONÇALVES, 2008). Em 2002 a *American Quarter Horse Association*, liberou o uso da coleta e transferência de embriões sem limitações no registro de produtos nascidos de uma égua por ano. Esta normativa também foi acolhida pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Quarto de Milha no ano de 2004. A Embrio Equi é uma empresa que trabalha com todas as raças, porém teve um crescimento muito grande devido a procura de criadores de cavalos da raça Quarto de Milha.

Segundo Andrade (1986) a transferência de embriões é uma tecnologia que consiste na colheita de um embrião de uma égua denominada doadora e transferência para o útero de uma égua receptora. Dentre as principais vantagens da transferência de embrião destaca-se a obtenção de mais de um potro por ano de éguas geneticamente superiores e de fêmeas em competições. Ley (2006) ainda descreve como vantagens a obtenção de potros de éguas jovens de primíparas e produtos de éguas “problemas” como éguas velhas, acometidas por laminite crônica, pelve fraturada, entre outras. Durante o ECSMV pode-se acompanhar a coleta de todos os tipos de éguas, especialmente éguas em campanha e éguas velhas.

Squires & Seidel (1995) descrevem que o momento ideal para a realização da colheita do embrião é entre o dia 7, 8 e 9 após a ovulação, porém a realização deste procedimento pode ser feito no dia 6, caso haja interesse na criopreservação. Na Embrio Equi a utilização desta biotecnologia era feita no 8º dia após a ovulação em éguas novas e em éguas velhas ou inseminadas com sêmen congelado no 9º dia. Acredita-se que este atraso de um dia que ocorre em éguas mais velhas seja por uma falha hormonal, o que não ocorreria em éguas jovens. Lisa & Meadows (2008), relatam que éguas inseminadas após a ovulação apresentam um retardo da entrada do embrião no útero e do desenvolvimento deste equivalente a 1 dia, quando comparadas com éguas inseminadas antes da ovulação. Isso justifica a realização da técnica no dia 9.

Segundo Ginther, (1998), o embrião equino nos dias 7 e 8 pós-ovulação, encontram-se no estágio de blastocisto inicial a blastocisto expandido, variando seu tamanho em 300 à 1500 µm. Neste período ocorre a formação de uma cápsula glicoproteica externamente à zona pelúcida, e após a formação desta, a zona pelúcida se degenera e ela se torna a estrutura mais externa do embrião. Esta cápsula embrionária desempenha várias funções até sua degeneração por volta do dia 21, dentre elas destaca-se: ser uma camada de glicoproteínas que possibilita resistência e elasticidade às contrações uterinas previne aderência do embrião, contribuindo para sua mobilidade. Durante as coletas realizadas no ECSMV pode-se ser avaliado a capsula através da forma do embrião, em que se apresentava de forma arredondada e lisa, sugerindo assim um embrião íntegro.

Squires & Seidel (1995) afirmam que o sucesso da transferência de embrião está ligado diretamente ao grau de qualidade do embrião, ou seja, embriões que possuem um grau igual ou maior que 3 terão uma menor taxa de prenhez. Isso se deve a não clivagem correta das células, problemas com a blastocela e células degeneradas como esta descrito na TABELA 2. Durante o ECSMV na Embrio Equi, todos os embriões colhidos foram de grau 1.

TABELA 2 - Critério de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.

Classificação	Qualidade
Grau 1	Excelente - Ideais, esféricos, com tamanho, cor e textura uniformes.
Grau 2	Bom - Pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação detrofoblasto.
Grau 3	Razoável - Problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocela colapsada
Grau 4	Pobre - Blastocela colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária.
Grau 5	Degenerado - Oócito não fertilizado ou embrião totalmente degenerado

Fonte: Lira et al. 2009.

Após avaliação e classificação do embrião, este deve ser lavado 10 vezes em meio específico (CAMILO et al., 2003). O objetivo dessa lavagem era a retirada de sujidades presentes na zona pelúcida. Na Embrio Equi, a lavagem era feita 12 vezes consecutivas e em

meio específico trocando a palheta de manipulação a cada 4 gotas. Após esta lavagem o embrião estará pronto para ser envasado na palheta para posterior inovulação ou transporte em container.

3.1.1 Coleta de embriões

Os métodos para a realização da coleta do embrião permanecem praticamente inalterados desde seu surgimento. Há basicamente dois métodos para a realização da coleta, o cirúrgico e o não cirúrgico, sendo o segundo o procedimento mais utilizado no mundo inteiro (SQUIRES et al., 2003). Uma sonda de silicone com aproximadamente 70 centímetros de comprimento, com um diâmetro de 8 mm, com um “*cuff*” próximo a extremidade é introduzida no útero cerca de 10 centímetros (VANDERWALL, 2003). O “*cuff*” é insuflado e tracionado caudalmente para que se ajuste no óstio cervical. Infunde-se cerca de 1 litro de soro ringer lactato e este é recolhido por gravidade e filtrado em um filtro específico. A escolha do líquido que será infundido é pessoal, podendo ser utilizado a Solução Salina Tamponada de Dulbecco (DPBS) associada a 1% de soro fetal bovino. No Brasil e na Argentina a solução mais comum para realizar o lavado é o ringer com lactato (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009). Na Embrio Equi a coleta era realizada de acordo com a literatura e por questões econômicas o líquido utilizado era o ringer lactato.

Hudson & McCue (2004) sugerem que caso o embrião não seja recuperado entre o primeiro e terceiro lavado, seja feito uma quarta lavagem deixando o líquido durante 3 minutos e a aplicação de ocitocina. Em 32 éguas, foi realizado o lavado extra, obtendo-se uma taxa de recuperação embrionária de 10% (HUDSON E McCUE, 2004). Durante o ECSM, quando o embrião não era recuperado no primeiro lavado o médico veterinário tinha como protocolo infundir o líquido no útero e aguardar alguns minutos. O procedimento de sifonagem nestes casos era sempre com o auxílio de massagem uterina. A aplicação de ocitocina durante o procedimento de coleta não era empregado como rotina na central. O Dr Carlos Schutzer preconizava a massagem uterina em substituição ao uso de ocitocina.

Logo após o último lavado, Hartman (2011) recomenda que seja feito um exame ultrassonográfico para garantir que todo líquido que foi infundido tenha sido recuperado.

Este procedimento era realizado em todas as doadoras na Embrio Equi. Caso alguma égua, na avaliação ultrassonográfica, fosse detectado presença de conteúdo pós-coleta, era indicado a utilização de ocitocina.

3.1.2 Receptoras

Nos programas de transferência de embriões, as receptoras tem um papel importantíssimo para o sucesso da técnica, porém muitos proprietários não dão os devidos cuidados para esta classe de animais, sendo assim um grande problema para o sucesso do procedimento.

Ley (2006) sugere que a idade ideal para que uma fêmea seja receptora é entre 3 a 10 anos de idade. Já Morel (2003) cita que a faixa etária ideal é de 5 a 10 anos de idade e que tenha gerado um produto, provando assim sua habilidade materna. A justificativa de se utilizar éguas novas como receptoras se dá pelo histórico de não ter patologias uterinas e ovarianas, vulva em posição vertical e glândula mamária funcional. Também deve se levar em conta o tamanho desta fêmea, que de preferência deverá ser maior que a doadora. A Embrio Equi preconiza a idade das fêmeas receptoras e o tamanho de acordo com a literatura. Tem em seu plantel de receptoras éguas Quarto de Milha puras de origem e éguas mestiças (Quarto de Milha x Bretão).

A mortalidade embrionária precoce é um entrave na técnica de transferência de embriões podendo ser explicada por fatores uterinos e externos. Acrescenta-se ainda à idade da receptora, condição corporal e nutricional, falhas no reconhecimento materno da gestação, fatores imunes e problemas hormonais (CARNEVALE et al., 2000). Além disso, deve ser analisado o tônus uterino ao escolher a receptora.

Segundo Squires (1993), as melhores candidatas a serem inovuladas são aquelas receptoras que ovularam após a doadora. Este fato é devido a necessidade de um maior tempo para o reconhecimento da gestação.

Os protocolos de sincronização são diversos. Durante o EC SMV foi acompanhado o protocolo em que constava a aplicação de 2 mL por dois dias de benzoato de estradiol (SINCRODIOL®), no terceiro dia a verificação de edema uterino através de exame ultrassonográfico e aplicação de 10 mL de progesterona (SINCROGEST®), dando assim o dia 0 no momento da aplicação da progesterona. Com a aplicação do estrógeno esperava-se

encontrar na palpação transretal um útero levemente flácido e edema 3 sem nenhuma alteração na imagem ultrassonográfica para que fosse feita a aplicação de progesterona.

Nos casos de sincronização através da ovulação natural da receptora, está de acordo com o descrito por Ley (2006), que relata o controle diário das éguas e a utilização de deslorrelina e/ou HCG.

Allen (2005) descreve o protocolo de sincronização de doadores e receptoras com a utilização de prostaglandina sozinha, porém estas fêmeas devem estar em diestro (D6 – D14).

Mozzaquatro (2008), ainda relata a utilização de aspiração folicular para que ocorra a formação de um corpo lúteo funcional, com a intenção de sincronizar doadoras e receptoras.

3.2 Congelamento de sêmen

A criopreservação do sêmen equino possibilita a preservação do material genético de animais considerados superiores, possibilitando assim a introdução ou a reintrodução de características desejáveis. Terraciano et al. (2013) relata a otimização de um reprodutor, podendo ser utilizado em éguas que estejam distantes do local em que o garanhão esta, alavancando assim o potencial genético do produto. Além da diminuição de patologias provocadas pelo coito e na utilização deste sêmen em centenas de éguas (OLIVEIRA et al., 2013).

Durante o ECSMV pode-se acompanhar 4 congelamentos de sêmen do mesmo reprodutor da raça Mangalarga Marchador.

O CBRA (1998) preconiza que um garanhão deve apresentar como parâmetros desejáveis para realizar a monta natural 70% de motilidade progressiva e vigor 3. O garanhão avaliado na Embrio Equi não apresentava histórico prévio em relação aos parâmetros reprodutivos. Na avaliação realizada previamente ao congelamento observou que o sêmen apresentou 60% de motilidade progressiva e vigor 3. Embora os parâmetros estivessem aquém dos preconizados pelo CBRA (1998), o proprietário desejou realizar o procedimento. O CBRA (1998) descreve valores mínimos para que o sêmen seja considerado apto a ser utilizado na tabela abaixo:

TABELA 3 - Características seminais dos Equinos.

Variável	Valores Médios
Volume	60
Movimento de massa	Ausente
Vigor	3
Nº total de espermatozoides	9x10 ⁹
Motilidade espermática	70%
Espermatozoides normais	70%
Ejaculados/semana	3-10

Fonte: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal – CBRA – 2ª Edição, 1998.

Foram realizados 4 congelamentos. Nenhum dos congelamentos obteve os parâmetros mínimos preconizados pelo CBRA (1998) para sêmen pós-descongelamento.

No primeiro e segundo congelamento/descongelamento a motilidade obtida foi de 15% e vigor 1-2. No terceiro congelamento obteve-se a motilidade de 25% e vigor 1-2 o quarto congelamento apresentou motilidade de 20% e vigor 2, não obtendo assim os parâmetros descritos pelo CBRA que são de $\geq 30\%$ e ≥ 3 respectivamente.

Além disso, foram realizados exame de morfologia espermática em câmara úmida com microscopia de contraste de interferência diferencial, juntamente a Universidade de São Paulo (USP – Pirassununga), pode ser constatado 70% de defeitos totais, quando são aceitos até 40% (FIGURA 13) .

PADRÕES DE JULGAMENTO DE SÊMEN DE DOADORES (portaria SDR-26; 5/09/96)	
Sêmen congelado:	
<i>Será considerado fora do padrão quando apresentar as seguintes características após a descongelção:</i>	
a) Motilidade progressiva	< 30%
b) vigor	< 3
(descongelção 35 -37 °C, por um tempo mínimo de 30 seg. ou conforme recomendações do estabelecimento produtor)	
c) anormalidades espermáticas	
defeitos totais	> 40 %
defeitos maiores	> 20 %
d) número de espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelção	< 200X10 ⁶ por dose.
Sêmen resfriado:	
<i>Será considerado fora do padrão quando apresentar as seguintes características dentro do período de longevidade declarado em certificado:</i>	
a) motilidade progressiva	< 30%
b) vigor	< 3
c) anormalidades espermáticas	
defeitos totais	> 40 %
defeitos maiores	> 20 %
d) número de espermatozoides com motilidade progressiva no ato da inseminação	< 200X10 ⁶ por dose.
Todo o sêmen resfriado deverá ser acompanhado quando da comercialização, de um certificado de longevidade com a técnica utilizada, emitido pelo veterinário responsável do centro.	

FIGURA 13 - Padrões preconizados no pós-descongelamento pelo CBRA. Fonte: Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal – CBRA – 2ª Edição.

Já na segunda, terceira e quarta partida, o sêmen teve um aumento de 20%, 10% e 10% respectivamente comparadas a primeira (análise antes do congelamento). O número e qualidade de espermatozoides por ejaculado é afetado pela frequência de ejaculações, tamanho das reservas de espermatozoides extragonodais entre outros (Hafez & Hafez, 2004). Porém quando analisadas no pós-descongelamento as partidas obtiveram resultados semelhantes a primeira.

A técnica de criopreservação do sêmen equino ainda não está estabelecida, pois apesar de haver uma série de modificações no processo de congelamento do sêmen, ainda há ganhões com índices de fertilidade insatisfatórios no pós-descongelamento (ALVARENGA et al., 2005). Mesmo não estando estabelecida a técnica de congelamento de sêmen, melhorou muito desde seu surgimento sendo comprovada pelo número de ganhões que são congelados na atualidade.

Fatores como a inexperiência do médico veterinário, o não ajuste da temperatura ideal de resfriamento, o próprio ganhão, entre outros estão diretamente ligados ao resultado do pós-descongelamento do sêmen. Keith (1998) destaca ainda a concentração de glicerol utilizada no crioprotetor, onde em equinos deve ser menor do que 7%.

Durante o ECSMV, todos os congelamentos foram realizados com o crioprotetor Botu Crio® (Botupharma), em que é sabido a presença de glicerol, porém seus outros constituintes não são revelados.

Papa et al. (2014) descreveram a técnica de congelamento de sêmen, devendo conter 100 milhões de espermatozoides viáveis por palheta, o que diverge do que foi visto na Embrio Equi, em que era utilizado 100 milhões de espermatozoides totais por palhetas. Porém se preconizava a motilidade e vigor maior de 30% e 3 respectivamente, e dose inseminante maior que 200 milhões de espermatozoides concordando com o que é preconizado pelo CBRA e descrito por Brandão et al. (2003) que afirma a dose inseminante de 200 a 400 milhões de espermatozoides, justificando assim o uso de 4 palhetas para a inseminação artificial.

Existem dois métodos de criopreservação, o manual e o automatizado. Kneißl (1993, apud TERRACIANO et al., 2008) descreve o congelamento manual em que, logo após o resfriamento a 5°C, as palhetas devem ser dispostas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido, posicionada a 3 cm acima do nível, por 20 minutos e mergulhadas imediatamente no nitrogênio.

O congelamento automatizado realiza todos os procedimentos de resfriamento dentro da máquina, necessitando apenas a manipulação para mergulhar as palhetas em nitrogênio líquido. Quando comparados os métodos de criopreservação, o método automatizado é considerado mais seguro pelo maior controle da temperatura. A sobrevivência dos espermatozoides ao congelamento é reduzida se a taxa de resfriamento usada abaixo da temperatura considerada ótima.

Moran (1992) cita que a região da curva de congelamento que os espermatozoides dos equinos são mais sensíveis é de 20°C e 8°C. Se as células resfriam muito rapidamente a água intracelular congela produzindo cristais de gelo intracelulares, que danificam as membranas (MOORE et al. 2006). Entretanto se os espermatozoides são resfriados muito vagorosamente uma desidratação celular excessiva ocorre, causando danos irreversíveis aos compartimentos celulares (MOORE et al. 2006).

4 - CONCLUSÃO

O estágio curricular supervisionado em medicina veterinária faz-se o momento mais importante da graduação, bem como um momento de incertezas e questionamentos que nos impulsionam a buscar novos conhecimentos, superar dificuldades e aprimorar as habilidades.

Sendo a Embrio Equi, referência nacional na área de reprodução equina possibilita ao estagiário a vivência das rotinas e procedimentos, consolidando conhecimentos teórico-práticos adquiridos durante a graduação.

O sucesso do programa de reprodução equina está diretamente ligado ao manejo correto do ciclo das éguas e da avaliação dos garanhões, de modo que os protocolos utilizados na central foram decisivos para os resultados positivos obtidos ao final dos procedimentos.

Além disso, as tecnologias empregadas na reprodução equina de forma rotineira favoreceram o treinamento na utilização de biotécnicas requisitadas no mercado de trabalho.

5 – REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, 4^o Ed. Berlin, 2005, v. 40, p. 310-329.

ALVARENGA, M. A. et al. **Amides as cryoprotectants for freezing stallion sêmen: A review**. Reproductive Science, Proceeding, International Symposium on Stallion Reproduction Animal. 4^o, Ed., 2005 Germany v. 89, p. 105-113.

ANDRADE, L.S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. In: **Fisiologia e manejo da reprodução equina**. 2^a Ed. Recife: S.C.P., 1986, p. 57-63.

BRANDÃO, F. Z. et al. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n. 1, p. 61-67, 2003.

CAMILO F. et al. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. **Reprod. Dom. Anim**, Medford, v. 38, p. 380-385, 2003.

CANISSO, I.F. et al. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CARNEVALE, E.M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**. v. 24, p. 965- 979, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2^a Ed, Belo Horizonte, 1998, p.49. Disponível em: <<https://www.passeidireto.com/arquivo/6463634/manual-para-exame-andrologico-e-avaliacao-de-semen-animal---cbra>>. Acesso em:26/05/2017

Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Estatísticas**. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/est/statistical-data/es/>>. Acesso em: 29/03/2017

GINTHER, O. J. Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus, **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, Baltimore. v. 44, p. 73-104, 1998.

GONÇALVES, P.B.D. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2^a Ed. São Paulo: Roca, 2008.

HAFEZ E. S. E., HAFEZ B. Equinos. In: HAFEZ E. S. E., HAFEZ B. **Reprodução Animal**. 7^o Edição. Barueri: Manole, 2004. cap.14, p. 193-218.

HARTMAN, D.L. Embryo Transfer. In: McKINNON, A.O. et al. **Equine Reproduction**. 2^a Ed. Oxford: Wiley – Blackwell, 2011, v. 2, cap.303. p. 2879.

HUDSON, J. J. & McCUE, P. M. How to increase embryo recovery rates and transfer success. **AAEP Proceedings**, Denver, Colorado, v. 50, p. 1473-1204, 2004.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. 2015. Disponível em:< <https://sidra.ibge.gov.br/home/pms/brasil>>. Acesso em: 29/03/2017

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Colorado, 1998, p.104, Tese (Master of Science). Colorado State University, Fort Collins, 1998.

LEY, W.B. **Reprodução em Éguas para Veterinários de Equinos**, 1ª ed., São Paulo: Roca, 2006.

LIRA, R. A., PEIXOTO, G. C. X., SILVA, A. R. Transferência de embrião equino: Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 4, p. 132-140, 2009.

LISA, H. M. & MEADOWS, S. **Essential management practices in commercial equine embryo transfer**. Proceedings 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge. 2008, p.101-102.

McCUE P.M. & FERRIS A.R. **Formulary and Protocols in Equine Reproduction**. Fort Collins: Colorado State University. 2016. 18p.

MCKINNON, A. O. **Reprodução da égua problema**. Conferência Anual da Associação Brasileira dos Veterinários de Equinos, 2010 .Disponível em: <http://www.itarget.com.br/newclients/abraveq2012/down/2012/conf_sp_egua_problema.pdf>. Acesso em: 03/05/17

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - (MAPA). **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília.2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em: 27/06/17

MOORE, A. I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine veterinary Science**, v.26, n. 5, p. 215-218, 2006.

MORAN, D. M. **Effects of cooling rate storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa**. Fort Collins, 1992. Dissertação (Mestrado). Colorado State University, 1992.

MOREL, D. M. C. G. Embryo Transfer in the Mare. **Equine Reproductive Physiology Breeding and Stud Management**. 2º Ed. New York: Editora Cabi Publishing, 2003, cap.21 p. 310-317.

MOZZAQUATRO, F.D. **Aspiração folicular na égua para indução da função lútea**. Santa Maria: UFSM, 2008, p. 36. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Santa Maria, 2008.

O LIVEIRA G. C. et al. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. vol. 7, n. 1, p. 23-28, 2013.

PAPA, F.O. et al. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 19-27, 2005.

PAPA, F.O. et al. **Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino**, São Paulo, 2014.

SAYE D. E. Recurring and antimicrobial-resistant infections: considering the potential role of biofilms in clinical practice. **Ostomy Wound Manage.** [S.l.]. 2007. v. 53, p. 46-8, 50, 52.

SQUIRES E.L. Progesterone. In: McKINNON, A.O., VOSS J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, cap. 6, p. 57-64.

SQUIRES, E. L. et al. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, Países Baixos, v. 59, p. 151-170, 2003.

SQUIRES, E. L. & SEIDEL, G. E. **Collection and transfer of equine embryos**. Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin. Colorado State University. Fort Collins. 1995.

TERRACIANO P.B. et al. Criopreservação de espermatozoides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Cienc. Rural [online]**, vol.38, n.7, p.1972-1977, 2008. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/cr/v38n7/a27v38n7.pdf>. Acesso em: 14/06/2017.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Function of uterine and blood derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: Phagocytosis and Chemotaxis. **Biology of Reproduction**, n.49, p. 507-514. 1993.

VANDERWALL, D. K. Embryo collection, storage and transfer. In: RONBINSON, N. E. **Current therapy in equine medicine**. 5ª Ed. Philadelphia:Saunders, 2003. p. 280-285.

ANEXO A – Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária



EMBRIO - EQUI

Centro Avançado de Reprodução Eqüina

*Dr. Carlos Guilherme de Castro Schutzer
Médico Veterinário CRMV/SP-10462*

CERTIFICADO

Certifico que, **Marcelo Severo** aluno de medicina veterinária, concluiu estágio curricular na Embrio-Equi na área de reprodução equina no período de 02/01/2017 a 28/04/2017, perfazendo um total de **510 horas**, sob minha supervisão.

Por ser expressão da verdade, firmo o presente.

São Simão, 28 de abril de 2017.

Carlos Guilherme C. Schutzer
Médico Veterinário
Habilitado nº 083 - SP
CRMV - SP nº 10.462

Dr. Carlos Guilherme de C. Schutzer
CRMV/SP-10462

ANEXO B – Certificado do Estágio Extracurricular em Medicina Veterinária



EMBRIO - EQUI

Centro Avançado de Reprodução Equina

*Dr. Carlos Guilherme de Castro Schutzer
Médico Veterinário CRMV/SP-10462*

CERTIFICADO

Certifico que, **Marcelo Severo** aluno de medicina veterinária, concluiu extracurricular na Embrio-Equi na área de reprodução equina no período de 01/05/2017 a 02/06/2017, perfazendo um total de **216 horas**, sob minha supervisão.

Por ser expressão da verdade, firmo o presente.

São Simão, 02 de junho de 2017.

Carlos Guilherme C. Schutzer
Médico Veterinário
Habilitado nº 083 - SP
CRMV - SP nº 10.462

Dr. Carlos Guilherme de C. Schutzer
CRMV/SP-10462

ANEXO C – Certificado de participação como colaborador na área de Inspeção Veterinária no XXVII Congresso Brasileiro da Raça Quarto de Milha



**Associação Brasileira de Criadores de
Cavalo Quarto de Milha**

CERTIFICADO

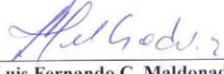
Certifico, para os devidos fins, que **MARCELO SEVERO**, estagiou na área de Inspeção Veterinária dos animais participantes do XXVII Congresso Brasileiro da Raça Quarto de Milha, realizado no período de 12 a 23 de Abril de 2017, em Avaré-SP, perfazendo um total de 96 horas, sob nossa supervisão.



Dr. Carlos Guilherme C. Schutzer
CRMV/SP-10462
Inspetor Oficial ABQM



Dr. Mateus Menoita Russo
CRMV/SP-18504
Inspetor Oficial ABQM

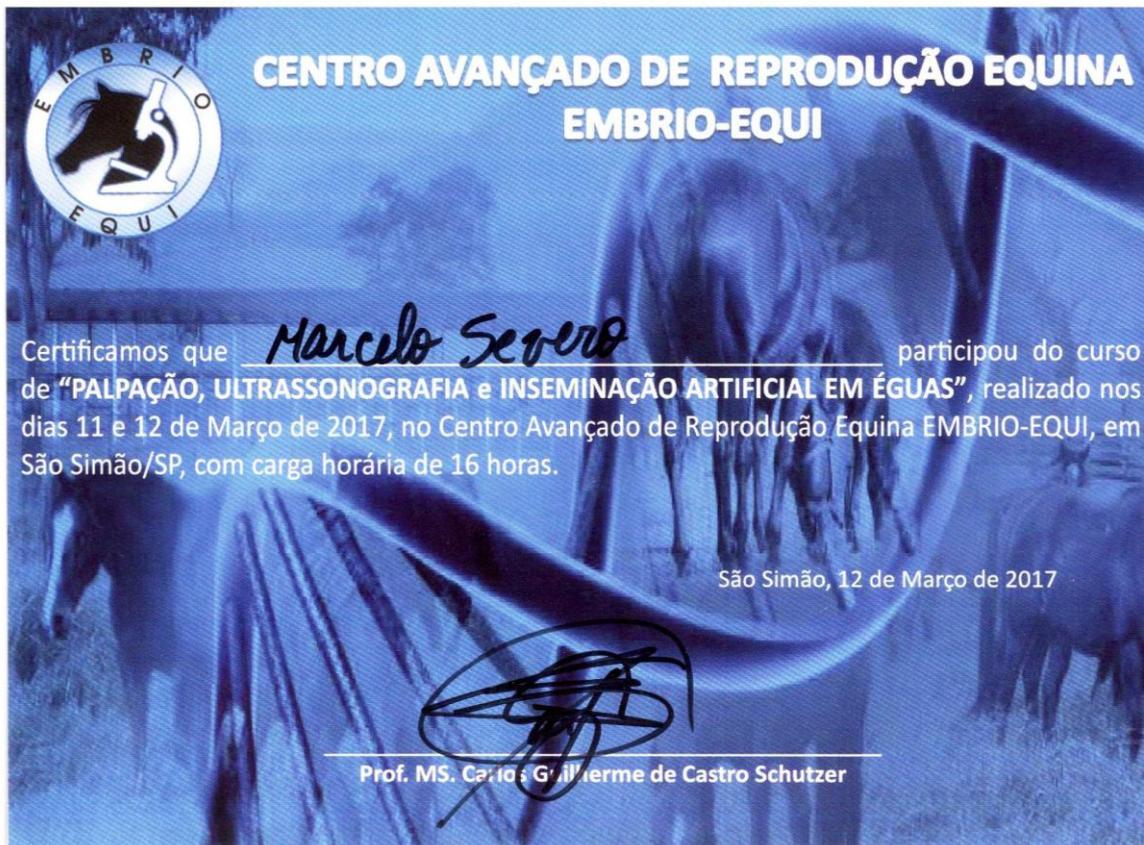


Dr. Luis Fernando C. Maldonado
CRMV/SP-5838
Inspetor Oficial ABQM



Dr. Renato Vilem
CRMV/SP 6656
Inspetor Oficial ABQM

ANEXO D – Certificado de participação do curso de Palpação, Ultrassonografia e Inseminação Artificial em Éguas.



ANEXO E – Certificado de participação no curso de Transferência de Embriões

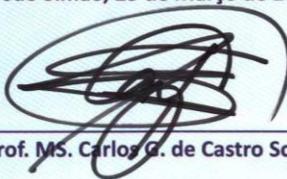


**CENTRO AVANÇADO DE REPRODUÇÃO EQUINA
EMBRIO-EQUI**

Certificamos que Marcelo Severo participou do curso de **"TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES"**, realizado nos dias 23, 24 e 25 de março de 2017, no Centro Avançado de Reprodução Equina EMBRIO-EQUI, em São Simão/SP, com carga horária de 24 horas.

São Simão, 25 de Março de 2017.


Dr. Márcio Teoro do Carmo


Prof. Ms. Carlos G. de Castro Schutzer