



JELIENY APARECIDA CLAUDINO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA
CENTRAL QUIRÓN REPRODUÇÃO EQUINA EM
CAMBUQUIRA - MG**

LAVRAS – MG

2019

JELIENY APARECIDA CLAUDINO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA CENTRAL QUIRÓN
REPRODUÇÃO EQUINA EM CAMBUQUIRA – MG**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Zootecnia, para a obtenção do
título de Bacharel.

Prof. José Camisão de Souza, Ph.D.

Orientador

LAVRAS – MG

2019

JELIENY APARECIDA CLAUDINO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA CENTRAL QUIRÓN
REPRODUÇÃO EQUINA EM CAMBUQUIRA –MG**

**SUPERVISED INTERNSHIP AT THE QUIRÓN EQUINE REPRODUCTION
CENTER - CAMBUQUIRA-MG**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Zootecnia, para a obtenção do
título de Bacharel.

APROVADO em 24 de junho de 2019.

Ph.D. José Camisão de Souza

UFLA

Med. Vet. Giovanna Takakura

UFLA / Quirón Reprodução Equina

Mestre Gabriel Miranda Moreira

UFLA

Prof. José Camisão, de Souza, Ph.D.

Orientador

LAVRAS – MG

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me ensinar todos os dias a confiar e ter fé. Porque não houve um só dia que Ele tenha me deixado sozinha.

Aos meus pais, José e Elaine, por serem meus grandes exemplos, por sonharem junto comigo e fazerem de mim o que sou hoje. Esta conquista é nossa! Obrigada por me mostrarem sempre o caminho certo e me apoiarem em tudo.

Ao meu irmão, Jean, pelo apoio e torcida de sempre e por compartilhar comigo o amor pelos animais.

Ao meu noivo, Paulo Luiz, por ser meu porto seguro, por me ouvir, incentivar e cuidar. Obrigada por estar ao meu lado em qualquer circunstância.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram comigo nesta caminhada.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

Ao professor José Camisão de Souza, pelo privilégio de ter sido sua orientada durante esses anos, por todos os conselhos e grande disposição em ajudar.

À Médica Veterinária e minha supervisora de estágio Giovanna Takakura, por toda paciência, incentivo, exemplo e por ter feito nascer dentro de mim um grande amor pelos equinos.

A todos os professores que transmitiram a mim seus ensinamentos durante esta trajetória.

A todos os funcionários da Central Quirón Reprodução Equina pelos ensinamentos e todo o apoio durante o estágio.

A todos os membros do Grupo de Estudo em Reprodução – GERE, que contribuíram grandemente para minha formação pessoal e profissional.

A todos os funcionários do DZO/UFLA pela disposição em ajudar.

A todos os colegas de curso pelo companheirismo e auxílio nos momentos difíceis, em especial às meninas da “Zoo” que se tornaram grandes amigas e fizeram meus dias muito melhores.

A todos os animais que, de alguma maneira, contribuíram para o meu aprendizado no decorrer do curso, deixando aqui registrado o meu compromisso em sempre honrá-los e respeitá-los.

Eternamente grata a todos!

“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos,
muito mais do que as nossas qualidades.”

Alvo Dumbledore, ROWLING. J. K., Harry Potter and the
Chamber of Secrets.

RESUMO

A criação de equinos faz parte da vida dos seres humanos há milhares de anos e vem se consolidando cada vez mais no mercado mundial. A equideocultura brasileira move um mercado financeiro gigantesco e gera milhares de empregos direta e indiretamente. Os equinos são culturalmente utilizados no desenvolvimento de diversas atividades, como as funções de sela, tração, policiamento, esporte, lazer, etc. A reprodução equina, anteriormente vista como o principal ponto de dificuldade na criação da espécie, hoje demonstra grande sucesso graças às inovadoras biotecnologias que foram sendo desenvolvidas para driblar essa adversidade. Atualmente, as duas técnicas mais utilizadas são a inseminação artificial (IA) e a transferência de embrião (TE), sendo responsáveis pela maior parte da geração de novos descendentes equinos. A TE é uma tecnologia que, dentre muitas outras vantagens, permite que fêmeas equinas produzam, em uma mesma estação de monta, muitos descendentes. Este ponto é muito importante, haja visto que a superovulação (SOV) ainda não demonstra resultados satisfatórios na espécie equina quando comparada a outras espécies. A TE permite a obtenção de crias férteis e perfeitamente saudáveis de éguas senis subférteis, éguas muito jovens, éguas em competição, éguas subférteis por problemas adquiridos como endometrites e lesões cervicais, éguas de elevado potencial genético, entre outras. Nos dias atuais, a TE tem metodologia já consolidada e muito bem desenvolvida, sendo acessível e relativamente simples de ser aplicada a campo. Durante o período de estágio, foi feito o acompanhamento de todo o manejo da Central de Transferência de Embrião – Quirón Reprodução Equina, onde foram desenvolvidas atividades que incluíram todo o processo de aplicação das metodologias de TE e IA. Foi possível ainda a observação de outros pontos como manejo nutricional, manejo de garanhões e disposição das instalações da propriedade.

Palavras-chave: Transferência de Embrião. Biotecnologias Reprodutivas. Equideocultura.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de desenvolvimento do embrião equino	20
Figura 2. Piquetes para alojamento de doadoras	26
Figura 3. Pastos coletivos	26
Figura 4. Esquema de disposição das réguas de madeira nas cercas dos piquetes.....	26
Figura 5. Bebedouro e cocho coberto para sal mineral	27
Figura 6. Sistema de corredores de movimentação	27
Figura 7. Baias de 2,5 x 3 m para alimentação e alojamento de reprodutores	28
Figura 8. Comedouro de madeira dentro da baia.....	28
Figura 9. Bebedouro de cimento dentro da baia.....	29
Figura 10. Lanchonete das doadoras	30
Figura 11. Tronco de contenção próprio para equinos	30
Figura 12. Laboratório de armazenamento, lavagem de materiais e manuseio de sêmen	31
Figura 13. Laboratório de manipulação de embriões	31
Figura 14. Autoclave vertical analógica.....	32
Figura 15. Redondel	32
Figura 16. Pátio para demonstrações de andamento e ministração de cursos	33
Figura 17. Pasto de alojamento das receptoras.....	33
Figura 18. Lanchonete das receptoras	34
Figura 19. Pasto destinado às éguas paridas.....	35
Figura 20. Instalação de <i>Creep-Feeding</i>	35
Figura 21. Ração concentrada	36
Figura 22. Sala de armazenamento de ração	36
Figura 23. Silagem de milho	37
Figura 24. Silo do tipo trincheira.....	37
Figura 25. Cochos abastecidos para alimentação dentro da lanchonete.....	41
Figura 26. Alimentação no próprio piquete.....	42
Figura 27. Garanhão solto no piquete durante o dia.....	42
Figura 28. Potros sendo alimentados em grupos	43
Figura 29. Cochos de sal mineral	43
Figura 30. Folículo dominante apresentando diâmetro de 35 x 35 mm	45

Figura 31. Ficha de controle do ciclo reprodutivo.....	45
Figura 32. Edema uterino de classificação 3	45
Figura 33. Égua a ser inseminada devidamente contida e higienizada	46
Figura 34. Inseminação Artificial.....	46
Figura 35. Desenho esquemático da sincronização entre doadoras e receptoras	48
Figura 36. Quadro de controle de datas de coletas de embrião	48
Figura 37. Infusão de Ringer Lactato no útero.....	49
Figura 38. Transferência do líquido do útero para o filtro de coleta.....	50
Figura 39. Procura do embrião utilizando estereomicroscópio	50
Figura 40. Embrião coletado em fase de Blastocisto Expandido	51
Figura 41. Placa de Petri contendo as gotas de meio de cultivo.....	52
Figura 42. Embrião preparado para a transferência em pipeta de inseminação	52
Figura 43. Transferência do embrião para a receptora	53
Figura 44. Diagnóstico de gestação positivo realizado 5 dias após a TE.....	53
Figura 45. Gel retido pelo filtro e fração rica em espermatozoides no tubo coletor	55
Figura 46. Coleta de sêmen	56
Figura 47. Quantificação de vivos e mortos	56
Figura 48. Gráfico da taxa de prenhez da estação de monta	57
Figura 49. Ponta formada pelo desgaste inadequado dos dentes.....	58
Figura 50. Dentes da receptora após o tratamento odontológico	59
Figura 51. Casco anterior esquerdo no dia 30 de janeiro de 2019, 3 meses após tratamento	59
Figura 52. Cascos anteriores.....	60
Figura 53. Cascos posteriores.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 A fêmea equina	13
2.2 A Transferência de Embriões (TE)	14
2.3 Seleção e manejo de éguas doadoras	17
2.4 Seleção e manejo de éguas receptoras	18
2.5 Recuperação e transferência embrionária.....	18
2.6 Diagnóstico de gestação (DG).....	21
2.7 Tecnologias complementares à TE	21
2.7.1 Criopreservação	21
2.7.1.1 Refrigeração	21
2.7.1.2 Congelamento.....	22
2.7.1.3 Vitrificação	23
2.7.2 Sexagem fetal	23
2.7.3 Bipartição embrionária	23
2.7.4 Injeção intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI	24
3. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DO ESTÁGIO	24
3.1 Instalações.....	25
3.1.1 Unidade das éguas doadoras	25
3.1.1.1 Piquetes para Doadoras de Embrião.....	25
3.1.1.2 Baias para reprodutores	27
3.1.1.3 Lanchonete das doadoras	29
3.1.1.4 Instalações adjacentes.....	32
3.1.2 Unidade das éguas receptoras	33

3.1.2.1	Pasto das éguas receptoras	33
3.1.2.2	Lanchonete das receptoras	34
3.1.3	Pasto das éguas paridas	34
3.2	Manejos nutricional e alimentar	35
3.2.1	Ração concentrada	35
3.2.2	Silagem de milho	36
3.2.3	Análise da silagem	38
3.2.3.1	Interpretação dos resultados	38
3.2.4	Arraçoamento	40
3.2.5	Sal mineral	43
3.2.6	Qualidade da água	44
3.3	Manejo reprodutivo	44
3.3.1	Manejo das doadoras	44
3.3.2	Manejo das receptoras	47
3.3.3	Coleta e transferência de embrião	48
3.3.4	Higienização dos materiais utilizados	54
3.3.5	Manejo de garanhões	54
3.3.6	Índices reprodutivos	56
4.	RELATO DE CASO VIVENCIADO DURANTE O ESTÁGIO	57
4.1	Reflexos da correção odontológica em égua receptora na melhoria da absorção de nutrientes, impactando positivamente na qualidade dos cascos	57
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
7.	ANEXOS	69
	ANEXO 1. Relatório da análise da silagem de milho da central	69

1. INTRODUÇÃO

Os equinos são animais que fizeram e ainda fazem parte da vida de um grande número de pessoas, direta ou indiretamente. Eles são, indiscutivelmente, uma das espécies que mantêm maior laço afetivo com o ser humano, firmando uma parceria de sucesso que existe há milhares de anos.

A sua domesticação data de aproximadamente cinco mil anos atrás e teve como objetivo inicial utilizá-los como mais uma fonte de alimento, o que já ocorria com ovinos, bovinos e suínos. Logo, o homem primitivo entendeu que os equinos também poderiam ser muito úteis como meio de transporte, já que apresentavam características vantajosas como velocidade e resistência para percorrer longas distâncias. Esta descoberta teria grande importância mais tarde, visto que os cavalos tiveram participação indispensável nas guerras antigas, foram o meio de transporte principal por muitos anos e continuam sendo utilizados desta forma até hoje.

O ancestral mais antigo do cavalo é o *Eohippus*, podendo ainda ser denominado *Hyracotherium*, que viveu há 55 milhões de anos. O processo de domesticação dos equinos ao longo dos anos causou enormes mudanças em suas características físicas e comportamentais. Contudo, Segundo Cintra (2013), eles ainda apresentam quatro aspectos inalterados, os quais são denominados de “preceitos equestres”, sendo eles: presa, gregário, liberdade e alimentação. Eles têm comportamento típico de presa, sempre optando pela fuga diante de qualquer situação de risco. São animais gregários, com grande necessidade de companhia e formação de grupos. Prezam grandemente a sua liberdade, sentindo-se assim mais seguros de predadores. E por fim, a alimentação baseada no consumo de forrageiras, sendo as fibras longas indispensáveis à sua saúde e sobrevivência.

Apesar de, em muitos casos, apresentarem grandes diferenças morfológicas entre si, todas as raças, grupos e tipos de cavalos domésticos pertencem a uma espécie: *E. caballus*. A ocorrência de nichos ambientais isolados durante a evolução de *E. caballus* deu origem aos diferentes tipos de cavalos modernos.

Nos dias atuais, segundo dados da FAO (2017), a população mundial de equinos ultrapassa as 60 milhões de cabeças. Nos continentes, a tropa está distribuída da seguinte forma: 7 milhões na África (11,80%), 32 milhões nas Américas (53,13%), 15

milhões na Ásia (25,56%), 5 milhões na Europa (8,86%) e 393 mil na Oceania (0,65%), sendo evidente a concentração de produção e utilização equina nas Américas.

Atualmente o rebanho de equinos brasileiro é de aproximadamente 5,8 milhões de cabeças, ocupando a quarta posição no ranking mundial. Os Estados Unidos ocupam a primeira colocação, seguidos por México e China (MAPA, 2018).

De acordo com dados apresentados pelo senso do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), o estado brasileiro que compreende o maior rebanho equino é Minas Gerais, com 808,349 mil cabeças e 14,69% do total da tropa nacional. Em segundo lugar está o Rio Grande do Sul, com 553,191 mil cabeças e em terceiro a Bahia, com 493,668 mil cabeças.

A região do Sul de Minas se destaca na criação de cavalos por ser o berço da raça Mangalarga Marchador, originada do cruzamento da raça Alter com linhagens regionais há aproximadamente 200 anos. A raça apresenta qualidades como: andamento cômodo, agilidade, resistência e docilidade, o que corresponde à expectativa de vários criadores. Os animais dessa raça podem ser utilizados para se apresentarem em competições propostas pela Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Mangalarga Marchador (ABCCMM), assim como para o lazer.

É importante salientar que, mesmo após o imensurável avanço tecnológico e constante desenvolvimento industrial, os equinos continuam sendo indispensáveis na maioria das propriedades agrícolas nacionais, desempenhando diferentes atividades que contribuem para o sucesso do ramo no Brasil. Dentre estas atividades, encontram-se funções de sela, carga, tração e policiamento. Destacam-se ainda, no aspecto social, as atividades de esportes e lazer, assim como a equoterapia para tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócio-afetiva (LIMA *et al.*, 2006). Na atualidade, existe grande discussão acerca de propostas de que os cavalos sejam incluídos na categoria de animais de companhia, o que passaria a abrangê-los nas leis que protegem cães e gatos.

Tudo isso explica porque um mercado financeiro tão grande gira em torno dos equinos. O complexo do agronegócio equino no Brasil movimentava anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 610 mil empregos diretos e 2,43 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por 3 milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016). De acordo com Lima *et al.*, (2006), o agronegócio equino abrange diversos mercados, como fornecedores de insumos, produtos e serviços para a criação, medicamentos, rações,

selas e acessórios, ferrageamento, veterinários, zootecnistas, treinadores, transporte de equinos, ensino e pesquisa, entre muitos outros.

Tendo em vista esta grande relevância cultural e econômica envolvendo a espécie, era inevitável que haveria enorme interesse em multiplicá-los e gerar descendentes férteis e geneticamente melhorados. Porém, de acordo com Ginther (1992), a espécie foi considerada por muito tempo como a menos fértil entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a problemas de seleção e manejo reprodutivo.

Com o objetivo de obter melhorias neste aspecto, técnicas reprodutivas vêm sendo alvo de pesquisas há anos, buscando o desenvolvimento de biotecnologias inovadoras e viáveis. Dentre as mais promissoras e eficientes técnicas reprodutivas atuais, encontra-se a transferência de embriões (TE), amplamente utilizada e desenvolvida no Brasil e no mundo, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos.

Este trabalho tem, por objetivo, descrever e detalhar as atividades realizadas nas áreas de equideocultura e reprodução equina, com ênfase em transferência de embriões equinos, durante estágio supervisionado na Central de Transferência de Embrião – Quirón Reprodução Equina, localizada na zona rural da cidade de Cambuquira, Minas Gerais. O estágio foi realizado no período de 17 de dezembro de 2018 a 1 de março de 2019, sob supervisão da Médica Veterinária de equídeos Giovanna Santesso Takakura.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A fêmea equina

A égua é um animal poliéstrico sazonal, que apresenta ciclos estrais repetidos durante primavera e verão (estação de monta), onde os dias são longos e as noites são curtas, sob influência do fotoperíodo. Cada ovulação é acompanhada por um período de sinais comportamentais de estro, sob baixas concentrações plasmáticas de progesterona (BRINSKO, *et al.*, 2011). Além do fotoperíodo, outros fatores interferem na regulação do ciclo estral, tais como idade, status reprodutivo, nutrição, condição corporal e temperatura (NAGY, GUILLAUME, DAELS, 2000; SESSIONS *et al.*, 2004).

A duração média do ciclo estral é de 21 a 22 dias, podendo sofrer variação de 18 a 26 dias. É dividido nas fases folicular (estro) e luteal (diestro) (BLANCHARD *et al.* 2003). A característica mais marcante observada durante o estro (4 a 7 dias de duração) é a receptividade da égua ao garanhão, como resposta ao aumento da produção de estrógeno pelo folículo dominante e, concomitantemente, a maioria das éguas apresenta edema endometrial (McCUE *et al.*, 2011). É nesta fase que ocorre o pico de liberação do Hormônio Luteinizante (LH) que resulta na ovulação.

A fase do diestro (14 a 15 dias de duração) é marcada pelo aumento na produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL), o que faz cessarem as manifestações de cio. Ocorre uma estabilização nas concentrações de P4 até o 12º dia e em torno do 15º ao 16º dia do ciclo estral inicia-se a luteólise (GINTHER, 1992).

O ciclo reprodutivo equino, assim como o ovino e o caprino, sofre influência do fotoperíodo devido à alterações na produção do hormônio melatonina. Todos os dias ocorrem oscilações de luminosidade que modificam a síntese de melatonina, interferindo no ciclo reprodutivo das éguas por afetar consideravelmente a produção de hormônios no hipotálamo e hipófise (GINTHER *et al.*, 2004; NAGY *et al.*, 2000).

A melatonina é um hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal durante o período escuro, o que informa aos organismos a duração da noite e, conseqüentemente, a estação do ano. Nos equinos, o aumento da exposição à melatonina tem efeito antigonadotrófico, inibindo a secreção de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) pelo hipotálamo. São, por este motivo, denominados animais de dias longos. O oposto ocorre com ovinos e caprinos, considerados animais de dias curtos, onde a melatonina é gonadotrófica, estimulando a secreção de GnRH. Assim, “as diferenças na extensão do dia são reconhecidas e transformadas em sinais capazes de ligar ou desligar a atividade sexual de forma espécie-específica” (SRINIVASAN *et al.*, 2009).

2.2 A Transferência de Embriões (TE)

A transferência de embriões (TE) consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora geneticamente superior e na transferência deste embrião para uma fêmea receptora, que se encarregará de levar a gestação a termo. Trata-se da biotecnologia reprodutiva mais utilizada atualmente no mercado equino, depois da coleta de sêmen e da inseminação artificial (IA); (HARTMAN, 2011).

Na espécie equina, estudos envolvendo a TE foram realizados pela primeira vez no Japão, em 1969, pelos autores Oguri e Tsutsumi. Em 1972, os mesmos pesquisadores relataram um resultado de onze embriões com idades entre 5 e 7 dias, que foram transferidos para receptoras que ovularam no mesmo dia da doadora, porém não resultando em prenhez. Em 1974, estes autores obtiveram o primeiro sucesso de prenhez, após a transferência de 15 embriões equinos, que resultaram em 6 (40%) gestações, das quais 4 (26,7%) chegaram a termo; (FLEURY *et al.* 2001; OGURI; TSUTSUMI, 1974). Entretanto, o primeiro potro nascido advindo de um programa de TE foi relatado em 1972 na Inglaterra, onde foi utilizada a técnica cirúrgica (ANDRADE, 1986).

Um pouco mais tarde, autores como Imel, obtiveram 39 embriões em 47 colheitas (83%) no ano de 1979 e 75 em 104 colheitas (72%) no ano de 1980, demonstrando que em pouco tempo a técnica já havia sido aperfeiçoada e já demonstrava resultados melhores (IMEL, 1981).

No Brasil, a primeira TE em equinos foi descrita em 1987, por Fleury e Alvarenga (1987), que fizeram uma adaptação da metodologia anteriormente descrita por Douglas (1979) às condições brasileiras. A primeira prenhez por TE em equinos no Brasil foi relatada em 1996 pelos pesquisadores Carneiro e Liu (2002), na região Norte-Nordeste, com nascimento do primeiro potro da raça Mangalarga Marchador em 1997.

De acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), o Brasil encontra-se atualmente em primeiro lugar no ranking mundial do emprego da técnica de transferência de embriões equinos. Em 2010, 12,422 mil embriões foram transferidos, o equivalente a 43% de todos os embriões transferidos no mundo (STROUD; BÓ, 2009).

Nas últimas décadas, houve considerável avanço da tecnologia em equinos, incluindo o desenvolvimento de técnicas não cirúrgicas, aumentando as taxas de prenhez de 12,5% a 74,55% (Davies Morel, 2003). Entretanto, mesmo com constante esforço de pesquisadores e profissionais do campo, a técnica da TE ainda não se encontra em sua máxima eficiência. Um dos principais motivos é a falta de interesse de muitas associações de raça em registrar potros nascidos por TE. Além disso, diferentemente da espécie bovina, por exemplo, a superovulação (SOV) ainda é pouco desenvolvida em equinos, o que contribui negativamente para o sucesso da TE (Samper, 2009).

O primeiro relato positivo da SOV em equinos é da década de 1970, por Douglas *et al.* (1974), experimento no qual foi utilizado o extrato de pituitária equina (EPE). O EPE é um produto de valor elevado, difícil de conseguir e ainda não aumenta consideravelmente a taxa de recuperação. Sendo assim, este processo ainda não é rotineiramente utilizado em equinos devido à conformação invertida do ovário das éguas, onde o córtex está situado na parte interna e a medula na periferia. Como o epitélio germinativo é limitado à fossa da ovulação, o número de ovulações é restrito (SQUIRES, 2006).

Apesar destas adversidades, a TE ainda é a ferramenta mais indicada para garantir um maior aproveitamento desses animais, apresentando diversas vantagens como:

- Obter elevado número de progênes de éguas de alto valor zootécnico durante uma estação de monta, o que não pode ser alcançado por meios naturais;
- Auxiliar na identificação de bons machos reprodutores, visto que é comum uma égua produzir potros de diferentes garantões durante uma única estação de monta, contribuindo para os testes de progênie;
- Utilização de éguas que se encontram em competição, permitindo que produzam vários potros em cada estação de monta, sem interferência em suas carreiras atléticas;
- Utilização de éguas muito jovens, as quais podem ainda não conseguir levar uma gestação até o final ou podem ter seu crescimento comprometido devido á gestação, mas que podem ser boas doadoras de embriões, desde que tenham estrutura corporal já bem desenvolvida;
- Obtenção de descendentes de éguas senis que apresentam condições uterinas como endometriose ou endometrite, que podem sofrer de problemas para emprenhar, morte prematura embrionária (MPE) ou aborto;
- Obtenção de descendentes de éguas subférteis por problemas adquiridos, como danos cervicais e infecções uterinas crônicas;
- Fornecer embriões para congelamento e assim garantir diversidade genética futura e a exportação de embriões;
- Oferecer maior controle de doenças quando há transferência de material genético entre estados ou países, assim como facilitar esta movimentação através das exportações de embriões congelados (ARRUDA *et al.*, 2001);
- Auxiliar na criação de diferentes linhagens e equinos exóticos;

- Entre outras;

Inicialmente com resultados insatisfatórios e metodologia complicada, a TE foi totalmente difundida e atualmente tem complexidade relativamente baixa quando comparada com outras biotecnologias mais avançadas. Segundo Hinrichs (2005, citado por LIRA *et al.*, 2009, p. 133), “A dificuldade de um programa de TE está na organização e coordenação de componentes distintos que afetam o sucesso da taxa, como o manejo da égua doadora, qualidade da égua receptora e sincronização e habilidade/técnica na transferência”. O sucesso da TE não se resume a um único fator e sim a um conjunto de medidas e cuidados que juntos garantem o resultado esperado. Estes cuidados incluem a fertilidade das éguas e garanhões envolvidos, manejo sanitário, controle ambiental, nutrição adequada, bem-estar, entre muitos outros.

2.3 Seleção e manejo de éguas doadoras

Para a seleção de uma égua doadora de embrião, alguns pontos devem ser levados em consideração, tais como: histórico reprodutivo, registro na raça de interesse, valor zootécnico, premiações em campeonatos e competições, custo do procedimento e valor potencial do potro (EVANGELISTA, 2012).

O acompanhamento da égua doadora consiste na observação do comportamento reprodutivo, na realização rotineira da palpação transretal e ultrassonografia, juntamente ao uso de hormônios exógenos, com o objetivo de sincronizar estro e ovulação. Quando a égua doadora se aproxima do período de estro, a mesma passa a ser examinada diariamente para monitorar o crescimento folicular, identificando o momento ótimo para a inseminação artificial - IA (VANDERWALL & WOODS, 2007).

O manejo das éguas doadoras visa recuperar um embrião o mais limpo possível e de um tamanho que permita a transferência. Tendo isto em mente, é importante perceber que as doadoras com endometrite normalmente produzem embriões sujos, que dificilmente sobreviverão à transferência. Sendo assim, o ideal é certificar-se de que o útero esteja livre de quaisquer contaminações no momento da IA (HARTMAN *et al.*, 2011). Quando a égua apresenta um folículo com 35 x 35 mm de diâmetro, podem ser administrados fármacos indutores da ovulação, como análogos do GnRH, que resultarão na ovulação após 36-48 horas (EVANGELISTA, 2012).

2.4 Seleção e manejo de éguas receptoras

Autores como Fleury *et al.*, (2007) afirmam a importância da seleção e manejo das éguas receptoras para que ocorra o melhor resultado na transferência de embrião (TE), sendo que a seleção resulta nas melhores condições para o desenvolvimento do embrião. Ao selecionar uma égua receptora, alguns pontos devem ser avaliados, como peso (400 a 550 kg), idade (3 a 10 anos), boa índole, bom desenvolvimento mamário, ciclos estrais normais e livres de anormalidades uterinas e ovarianas (VANDERWALL & WOODS, 2007; SQUIRES *et al.*, 1999).

Assim como as éguas doadoras, as receptoras em cio também devem ser examinadas diariamente para monitoramento do crescimento folicular e ovulação. O ideal é que estejam disponíveis pelo menos duas receptoras para cada doadora (McKinnon & Squires, 2007), permitindo assim escolher a opção que apresente as melhores condições reprodutivas para receber o embrião.

É imprescindível que o aparelho reprodutivo das receptoras esteja em perfeitas condições, como afirmam os autores Fleury *et al.*, (2007),

“Considera-se fundamental a utilização de receptoras com o aparelho reprodutivo em perfeitas condições e que estejam responsivas aos estímulos da progesterona, ou seja, apresentando corpo lúteo, com tônus uterino e cervical elevados e ausência de edema uterino” (Fleury *et al.*, 2007, p. 28).

Segundo Evangelista (2012), as receptoras selecionadas devem ser, se possível, éguas já utilizadas anteriormente e com histórico de sucesso. O ideal é que sejam adquiridas antes do início da estação, para que possam ser avaliadas previamente, evitando a introdução de doenças no rebanho. Esses animais devem ser livres de doenças infectocontagiosas, como Leptospirose, Mormo, Anemia Infecciosa Equina, dentre outras. Quando possível, as éguas devem ser dóceis, possuir cérvix com boa conformação, ter bons instinto e habilidade materna e nenhum tipo de alteração uterina ou ovariana.

2.5 Recuperação e transferência embrionária

Existem duas técnicas utilizadas para a recuperação e transferência dos embriões equinos, sendo uma por meio cirúrgico e a outra por meio não cirúrgico. A metodologia cirúrgica foi a primeira a ser testada e ainda é utilizada por alguns, com resultados semelhantes ou inferiores à metodologia não cirúrgica, desenvolvida mais recentemente. A técnica cirúrgica é pouco utilizada por ser muito mais invasiva, necessitando de anestesia geral para exteriorizar os úteros das éguas doadoras e receptoras durante a realização dos procedimentos de coleta e transferência.

Nos dias atuais, a técnica mais comumente utilizada é a TE não cirúrgica, que foi realizada a primeira vez com algum sucesso consistente no Texas em 1979 (DOUGLAS, 1979; VOGELSANG *et al.*, 1979). Resumidamente, a metodologia consiste na avaliação e monitoramento das éguas doadoras e receptoras, com o intuito de realizar, à base de hormônios, a sincronização entre seus ciclos estrais, o que permite que o embrião seja captado no útero da égua doadora (através de lavagem transcervical) e transferido para o útero da égua receptora (através de transferência não cirúrgica coberta). Este procedimento tornou-se cada vez mais popular por não haver a necessidade de anestesia geral e, portanto, acarretar riscos menores.

Os embriões equinos chegam ao útero entre os dias 5 e 6 após a ovulação, os quais estão na fase de mórula compacta para desenvolvimento inicial de blastocisto. O embrião aumenta rapidamente de tamanho ao entrar no lúmen uterino, desenvolvendo-se para blastocisto expandido. Os embriões podem ser recuperados entre os dias 6 e 9 após a ovulação, sendo os dias 7 e 8 ideais. Segundo Squires & Seidel (1995, citado por LIRA *et al.*, 2009, p. 135) “Embriões não são rotineiramente coletados no dia 9, porque o sucesso destes nas taxas de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando comparado à recuperação entre os dias 7 e 8”. Embriões para congelamento devem ser coletados no dia 6, em fase de mórula, tendo em vista que embriões maiores são mais prejudicados durante o processo (ALVARENGA *et al.*, 2008). Os embriões produzidos a partir de sêmen congelado devem ser coletados no 9º dia após a ovulação, pois podem apresentar maturação retardada (ALVARENGA *et al.*, 2008). Segundo os dados de Camargo *et al.*, foram relatadas taxas de recuperação embrionária de 62,1% para sêmen fresco, 62,2% para sêmen resfriado e 51,1% para sêmen congelado (CAMARGO *et al.*, 2013).

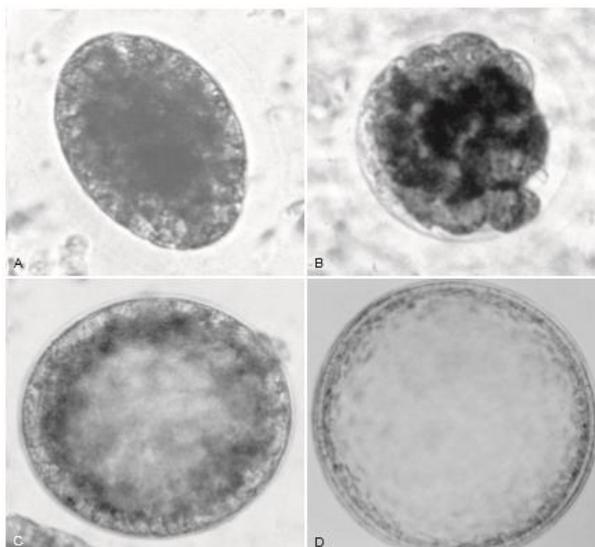


Figura 1. Estágios de desenvolvimento do embrião equino
 A, Oócito não fertilizado; B, Mórula compacta; C, Blastocisto precoce; D, Blastocisto expandido;

Fonte: BLANCHARD, *et al.* (2003)

Estudos recentes têm sugerido que, quando as éguas são inseminadas após a ovulação, a chegada do embrião ao útero pode ser retardada (LISA & MEADOW, 2008). Segundo estes estudos, ocorre certo atraso no desenvolvimento embrionário em éguas inseminadas pós-ovulação em relação a éguas inseminadas antes da ovulação. Desta maneira, o lavado uterino não deve ser realizado antes do dia 7,5 – 8 (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2009).

A janela de sincronização entre a ovulação da receptora e da doadora é de +1 (receptora ovulando um dia antes da doadora) a -3 (receptora ovulando três dias após a doadora), não sendo as taxas de gestação entre elas diferentes neste intervalo (IMEL, 1981; IULIANO *et al.*, 1985; SQUIRES *et al.*, 1985; SQUIRES & SEIDEL, 1995; McKINNON & SQUIRES, 2007).

Após a recuperação do útero da doadora, o embrião é avaliado e classificado quanto ao tamanho, estágio do desenvolvimento, integridade e qualidade. O embrião é, em seguida, lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção (FLEURY *et al.*, 2001; CAMILO *et al.*, 2003; DAELS, 2007). O objetivo deste procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida, transferindo-o o mais limpo possível ao útero da receptora.

Atualmente, a técnica de inovulação mais utilizada é a não-cirúrgica coberta, que consiste em depositar o embrião no corpo do útero através do cérvix, utilizando-se pipeta de inseminação coberta por uma bainha plástica, que visa proteger o embrião da

contaminação vaginal. Existem relatos de 54% de prenhez com o uso da bairha de proteção, comparado com 23% sem o uso da mesma (SQUIRES, 1982).

2.6 Diagnóstico de gestação (DG)

O diagnóstico de gestação pode ser realizado através de palpação retal, observando modificações uterinas como aumento de tamanho do corno uterino gestante. Contudo, este é um método mais tardio, já que apresenta maior precisão quando realizado 20 dias pós-cobertura ou IA (SIMPSON *et al.*, 1982).

A ultrassonografia transretal é o método mais confiável e prático de diagnóstico, sendo possível a visualização da vesícula embrionária como uma estrutura esférica, não-ecogênica, de 10 a 15 mm de diâmetro, 10-14 dias pós-ovulação (DELACORTE *et al.*, 1994). Deve-se levar em conta a presença de batimentos cardíacos fetais e um reexame entre 50 e 60 dias para confirmação final da prenhez, sendo que a partir desta fase a placenta já se encontra completamente formada, sendo menores os riscos de perda da gestação.

2.7 Tecnologias complementares à TE

2.7.1 Criopreservação

Tendo em vista o grande potencial da TE equina, outras tecnologias complementares foram aperfeiçoadas. Um exemplo são as técnicas de preservação de embriões pelo frio, que se tornaram indispensáveis dada a logística atual da criação equina no mundo. Refrigeração, congelamento e vitrificação são métodos utilizados para viabilizar a preservação e transporte deste material genético.

2.7.1.1 Refrigeração

A refrigeração veio para facilitar a rotina da TE, permitindo armazenar embriões a 5°C por até 24 horas. Segundo C. F. Moya-Araujo, G.H.M. Araujo, C. Meira (2010, p. 59), “A refrigeração preserva células por reduzir o metabolismo e a divisão celular, possibilitando o transporte de embriões entre propriedades ou para centrais de receptoras, sendo então transferidos”. Desta forma, o transporte de embriões se torna mais seguro, sendo dispensável o deslocamento de éguas doadoras, evitando gastos

desnecessários e possíveis acidentes (MOUSSA *et al.*, 2003). Diferentemente dos outros dois processos de criopreservação, a refrigeração é amplamente utilizada pelos praticantes da TE.

2.7.1.2 Congelamento

O congelamento de embriões equinos proporciona um maior aproveitamento do potencial reprodutivo de animais, assim como permite armazenar embriões em um banco de germoplasma para a espécie. Entretanto, o emprego em escala comercial ainda é limitado, pois a baixa taxa de recuperação embrionária limita o número de embriões obtidos por doadora, além de haver resistência pela maioria das associações das raças em relação ao uso de embriões congelados. Assim, em poucas ocasiões há disponibilidade de embriões comerciais para o congelamento (BASS *et al.*, 2004; SQUIRES, 2005; C.F. MOYA-ARAÚJO, G.H.M. ARAÚJO, C. Meira, 2010).

As vantagens do processo de congelamento incluem importação e exportação de embriões congelados; redução considerável dos custos para introdução de nova genética no país; possibilidade de preservação de material genético; e redução do número de receptoras necessárias em um programa de TE (SQUIRES, 2005).

No congelamento convencional, um ponto de extrema importância é a remoção da água das células antes e durante o resfriamento, o que diminui a formação de cristais de gelo intracelulares, que causam injúrias irreversíveis às células (MUNAR, 1988). Para assumir esta função, agentes crioprotetores são adicionados ao meio de congelamento. Duas classes de crioprotetores são utilizadas: os não permeáveis ou extracelulares, como a glicose, a sacarose, a rafinose, as proteínas e as lipoproteínas; e os permeáveis ou intracelulares, como o DMSO, o glicerol, o propanodiol, o propilenoglicol e o etilenoglicol (SEIDEL Jr *et al.*, 1989; KASAI, 1996).

O primeiro potro nascido a partir de embrião D6 congelado foi relatado por Yamamoto *et al.* em 1982. Um pouco mais tarde, Takeda *et al.* (1984) congelaram embriões equinos D6 em ampolas de 1 mL utilizando o glicerol como crioprotetor, e observaram resultados similares (50% de taxa de gestação) aos encontrados por Yamamoto *et al.* (1982), indicando que os embriões de seis dias de idade resistem bem ao congelamento. No Brasil, Meira e Alvarenga (1993) relataram o nascimento de dois potros no ano de 1991 a partir de embriões congelados, utilizando também o glicerol.

2.7.1.3 Vitrificação

Segundo autores como Fahy *et al.*, e Vajta *et al.*, (1984, 1998 citados por MOYA-ARAÚJO *et al.*, 2010,p.62), “O processo de vitrificação é definido como a solidificação de uma solução por meio da elevação da viscosidade durante o rápido resfriamento, sem a formação de cristais de gelo”. A vitrificação apresenta tempo de procedimento e custos com equipamentos menores quando comparada ao Congelamento convencional. (CARNEVALE *et al.*, 2004b; ELDRIDGE-PANUSKA *et al.*, 2005; CARNEVALE, 2006). Segundo Rall e Fahy (1985), Carnevale *et al.* (2004b) e Moussa *et al.* (2005), durante esse procedimento, o embrião é exposto a altas concentrações de crioprotetores por curto período de tempo e resfriado a alta velocidade para que ocorra a formação de um estado vítreo em vez de cristais de gelo.

2.7.2 Sexagem fetal

As técnicas utilizadas hoje em dia permitem também a sexagem dos embriões, possibilitando a identificação do sexo do embrião antes de sua transferência para a receptora. Entretanto, a técnica não é ainda muito difundida a campo, devido à necessidade de mão-de-obra altamente qualificada em associação à utilização de equipamentos modernos, que geram um custo bastante elevado. A técnica consiste na micromanipulação do embrião para a retirada de um fragmento para a realização de biópsia, o qual por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia Polimerase) o sexo será evidenciado. Segundo Luz *et al.*, (2000), a metodologia envolve a visualização dos cromossomos sexuais a partir de cariótipo ou da detecção de uma sequência de DNA, específica do cromossomo Y, apresentando uma alta acurácia e sensibilidade. Contudo, a técnica ainda apresenta entraves como o elevado custo e baixas taxas de prenhez devidas à manipulação do embrião.

2.7.3 Bipartição embrionária

É uma técnica ainda pouco estudada, que surgiu como uma alternativa para melhorar os índices de gestação na TE, tendo em vista a atual inviabilidade da SOV em equinos. A bipartição, como o nome sugere, consiste na realização de divisão do embrião em dois hemi-embriões, produzindo gêmeos monozigóticos (idênticos). Além

de maximizar os resultados de prenhez em programas de TE, a Bipartição Embrionária poderá também, em associação com as técnicas de congelamento e sexagem embrionária, permitir a estruturação de bancos de hemi-embriões congelados e sexados.

2.7.4 Injeção intracitoplasmática de espermatozoides - ICSI

A ICSI é um método moderno e inovador de reprodução assistida em equinos que consiste em produzir embriões *in vitro* através da injeção de um único espermatozoide dentro de um óvulo. Na inseminação artificial convencional, milhões de espermatozoides são necessários para a fertilização, sendo que através da ICSI, apenas um espermatozoide é necessário. Desta forma, o aproveitamento de sêmens caros, raros ou de baixa qualidade se torna muito maior. A técnica veio, ainda, para possibilitar a prenhez em casos em que a TE convencional não é suficiente, como por exemplo, em éguas com infecções uterinas crônicas, em que a recuperação embrionária é inexistente ou muito limitada.

Esta metodologia consiste na obtenção, maturação e desnudação dos ovócitos das éguas, sendo utilizados aqueles que já apresentarem o primeiro corpúsculo polar. Apenas a cabeça do espermatozoide é injetada dentro do ovócito, ativado ou não quimicamente, podendo então ser cultivado *in vitro* ou transferido para o oviduto de uma égua receptora (Squires et al., 1996). Atualmente, os resultados documentados de taxas de prenhez para a ICSI atingem aproximadamente 60% (Choi et al., 2002b).

3. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DO ESTÁGIO

O estágio supervisionado foi realizado na Central de Transferência de Embrião – Quirón Reprodução Equina, no período de 17 de dezembro de 2018 a 1 de março de 2019, sob orientação da Médica Veterinária Giovanna Santesso Takakura, mestranda pelo programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia em Produção e Reprodução Animal, pela Universidade Federal de Lavras.

A propriedade está localizada na cidade de Cambuquira - MG e possui área de 120 hectares, dos quais 60 são destinados à Central de Transferência de Embriões. A área restante é utilizada para a produção de café e milho, sendo o milho utilizado na produção de silagem para alimentação dos animais.

Durante o período de estágio, aproximadamente 120 receptoras e 10 doadoras estavam alojadas na central. O número alto de receptoras é explicado pelo grande número de doadoras que permaneciam alojadas em propriedades particulares, sendo seus embriões transportados até a central para serem então transferidos. Dentro da propriedade, o inventário de animais é muito variável, já que muitos entram e saem do programa durante a estação de monta.

3.1 Instalações

A central é dividida em duas unidades, sendo a primeira destinada ao alojamento e manejo de éguas doadoras e garanhões e a segunda ao alojamento e manejo de éguas receptoras.

3.1.1 Unidade das éguas doadoras

A primeira unidade é destinada às éguas doadoras e aos garanhões. Esta área fica localizada próxima à sede da propriedade.

3.1.1.1 Piquetes para Doadoras de Embrião

A unidade contém 20 piquetes de grama jiggs (*Cynodon dactylon*), que alojam as doadoras individualmente ou em duplas (quando os animais são de mesma origem ou acostumados a permanecerem de tal forma); (Figura 2) e quatro divisões de pastos coletivos de Tifton (*Cynodon spp.*), com capacidade para alojar até seis animais por divisão (Figura 3). Os piquetes são divididos com arame farpado, arame liso ou réguas de madeira. O arame liso pode causar ferimentos graves e de difícil cicatrização, tendo em vista que os animais se sentem motivados a forçar a cerca que, aparentemente, não machuca. O arame farpado, apesar de mais respeitado do que o arame liso, pode causar sérios acidentes caso, por algum motivo, o animal tente arrebentar a cerca. Desta forma, a melhor opção para a criação de equinos são as réguas de madeira, que são bastante seguras e resistentes, desde que as réguas sejam instaladas pelo lado interno dos piquetes, já que a pressão realizada pelos animais ocorre de dentro para fora (Figura 4). Os piquetes da Central contêm cochos para alimentação, bebedouros e cochos cobertos para sal mineral (Figura 5). A movimentação dos animais para manejo reprodutivo e

fornecimento de alimentação suplementar é facilitada por um sistema de corredores (Figura 6), que interligam os piquetes e a lanchonete.



Figura 2. Piquetes para alojamento de doadoras
Fonte: Do autor (2019)



Figura 3. Pastos coletivos
Fonte: Do autor (2019)



Figura 4. Esquema de disposição das régulas de madeira nas cercas dos piquetes

Fonte: Do autor (2019)



Figura 5. Bebedouro e cocho coberto para sal mineral
Fonte: Do autor (2019)



Figura 6. Sistema de corredores de movimentação
Fonte: Do autor (2019)

3.1.1.2 Baias para reprodutores

O local conta com seis baias individuais destinadas a alimentação e alojamento de reprodutores (Figura 7), sendo três baias de 4 x 4 m, uma de 4 x 3 m e duas de 2,5 x 3 m. As baias menores são utilizadas apenas para potros ou éguas em espera, sendo apenas as baias maiores (4 x 4 m) utilizadas para garanhões maduros. As baias devem ter dimensões suficientes para que o garanhão consiga realizar uma volta completa em seu interior. As mesmas devem dispor de um espaço mínimo de 4 x 3 m, sendo o mais recomendado 4 x 4 m (16 m²). As baias devem conter aberturas que permitam que o animal visualize a área externa e garantam uma boa ventilação de ar. Outro ponto importante destacado por Meyer e Cintra (1995, 2010 citado por MAPA, 2017, p. 24) é que “a iluminação deve ser natural e adequada para permitir visualização do ambiente

externo e suficiente para evitar um desconfortável contraste entre as distintas intensidades de luz”. Os garanhões mais maduros sexualmente, que consequentemente têm maior libido, passam a noite dentro das baias e o dia soltos em piquetes individuais. Os reprodutores jovens, ainda com pouco comportamento de garanhão, são soltos a noite e passam o dia nas baias. Este manejo é importante para evitar incidentes durante a noite, enquanto não há vigilância dos funcionários, como por exemplo, fugas para rufiação de fêmeas no cio. As baias possuem piso forrado com cama de maravalha e são equipadas com cochos de madeira e bebedouros de cimento (Figuras 8 e 9, respectivamente).



Figura 7. Baias de 2,5 x 3 m para alimentação e alojamento de reprodutores
Fonte: Do autor (2019)



Figura 8. Comedouro de madeira dentro da baia
Fonte: Do autor (2019)



Figura 9. Bebedouro de cimento dentro da baia

Fonte: Do autor (2019)

A altura e profundidade dos bebedouros e comedouros são pontos extremamente importantes quando se trata da criação de equinos. Por ser uma presa, a profundidade deve ser adequada para que o animal possa comer/beber água sem a necessidade de inserir totalmente a cabeça dentro do cocho/bebedouro, permitindo-lhe a visualização ao redor, que os deixa mais seguros. A altura também deve ser adequada, respeitando a anatomia do animal, permitindo que ele possa se alimentar de cabeça baixa, assim como na natureza. Proporcionar uma posição anatômica correta para a apreensão dos alimentos, além de facilitar a alimentação e digestão, evita problemas dentários, como deslocamentos da mandíbula/maxila. O ideal para cochos e bebedouros é uma altura de 30 a 50 cm e 20 cm de profundidade. O material utilizado nas camas deve ser não abrasivo, confortável, não pulverulento, não palatável e não tóxico. Precisa estar em quantidade ou altura suficiente para que o cavalo, ao se movimentar, não exponha o piso da baia.

3.1.1.3 Lanchonete das doadoras

No local, há uma instalação utilizada para alimentação, realização de exames de rotina, como palpação e ultrassonografia transretal, administração de fármacos, manejo sanitário e avaliação física dos animais. Tais avaliações são realizadas com os animais contidos em troncos dispostos lado a lado, em esquema de lanchonete (Figura 10), com capacidade para 20 animais por vez. Este tipo de instalação, além de facilitar o manejo dos animais, também permite o fornecimento de alimentação complementar durante o exame, diminuindo o estresse causado.



Figura 10. Lanchonete das doadoras

Fonte: Do autor (2019)

Ao lado da lanchonete, existe uma instalação equipada com pia e tronco de contenção próprio para equinos (Figura 11), utilizado para procedimentos reprodutivos mais elaborados, que necessitam uma contenção mais eficaz dos animais e maior higiene, tais como: inseminação artificial, coleta de embrião e tratamentos reprodutivos e clínicos.

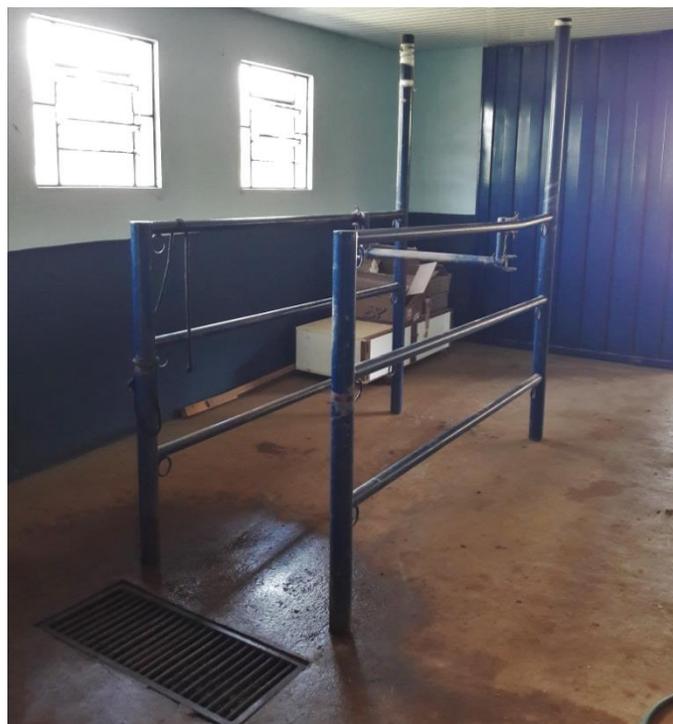


Figura 11. Tronco de contenção próprio para equinos

Fonte: Do autor (2019)

Na parte interna da mesma instalação, estão situadas duas salas de laboratório. A primeira é destinada a procedimentos considerados “sujos” (Figura 12), como manuseio de sêmen, análises de amostras uterinas e sanguíneas, higienização de material utilizado

em coletas de embrião, lavagens uterinas e inseminações, acondicionamento de botijões de sêmen, armazenamento de fármacos e matérias utilizados na rotina da central, entre outros.

A segunda sala é destinada aos procedimentos que necessitam de um ambiente o menos contaminado possível, como manipulação e lavagem dos embriões (Figura 13). Nesta sala ficam estocados os materiais estéreis como placas, filtros e sondas utilizados na coleta de embrião. A sala é também equipada com estufa (FANAMEN®- estufa de secagem e esterilização modelo 315 SE) para higienização de materiais, pia, geladeira para estocagem de materiais que precisam ser criopreservados - como o meio de cultivo (Holding Plus®, Vitrocell, Embriolife) e agentes indutores (Strelin ®- Deslorrelina) - estereomicroscópio para procura e manuseio de embriões e um destilador de água.



Figura 12. Laboratório de armazenamento, lavagem de materiais e manuseio de sêmen

Fonte: Do autor (2019)



Figura 13. Laboratório de manipulação de embriões

Fonte: Do autor (2019)

Anexo ao laboratório há espaço reservado à autoclave vertical analógica (Figura 14), utilizada para esterilização de sondas utilizadas para coleta de embrião, tratamento uterino e lavagem uterina.



Figura 14. Autoclave vertical analógica
Fonte: Do autor (2019)

3.1.1.4 Instalações adjacentes

Esta área da propriedade conta também com outras instalações que facilitam a rotina com os animais, como dois currais de manejo e alimentação, um redondel utilizado para doma e coleta de sêmen (Figura 15), embarcador, sala de depósito de equipamentos de sela, pátio para demonstrações de andamento e ministração de cursos (Figura 16), alojamento para estagiários, entre outras.

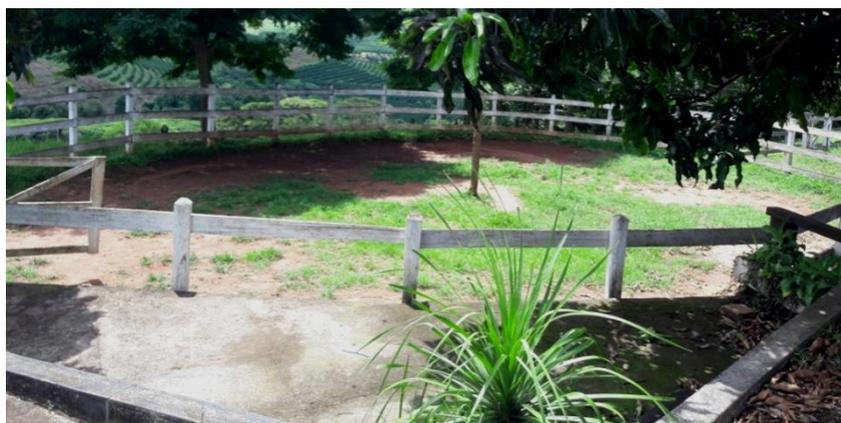


Figura 15. Redondel
Fonte: Do autor (2019)



Figura 16. Pátio para demonstrações de andamento e ministração de cursos
Fonte: Do autor (2019)

3.1.2 Unidade das éguas receptoras

As receptoras são mantidas em outra área dentro da central, que fica a aproximadamente 2 km de distância da sede.

3.1.2.1 Pasto das éguas receptoras

A área disponível é dividida em dois pastos grandes, formados com “brachiarão” (*Brachiaria brizantha*) e capim nativo e com acesso a água, local onde as éguas receptoras são alojadas em dois grandes grupos (Figura 17).



Figura 17. Pasto de alojamento das receptoras
Fonte: Alves, 2018

3.1.2.2 Lanchonete das receptoras

Para alimentação e manejo reprodutivo das receptoras, há também uma instalação no esquema de lanchonete, com capacidade para 80 éguas por vez (Figura 18). Dentro da mesma instalação, há uma sala com bancada para manuseio dos embriões a serem transferidos, pia e armário para depósito de fármacos.



Figura 18. Lanchonete das receptoras
Fonte: Do autor (2019)

3.1.3 Pasto das éguas paridas

Afastado das duas unidades principais da Central, há uma área destinada exclusivamente para o abrigo das éguas paridas e seus potros (tropa pessoal) até o desmame, sendo um local grande, com poucos animais e, conseqüentemente, grande volume de pastagem nativa disponível (Figura 19).

No local, há instalações de *creep-feeding*, utilizadas para o fornecimento de ração concentrada aos potros (Figura 20).

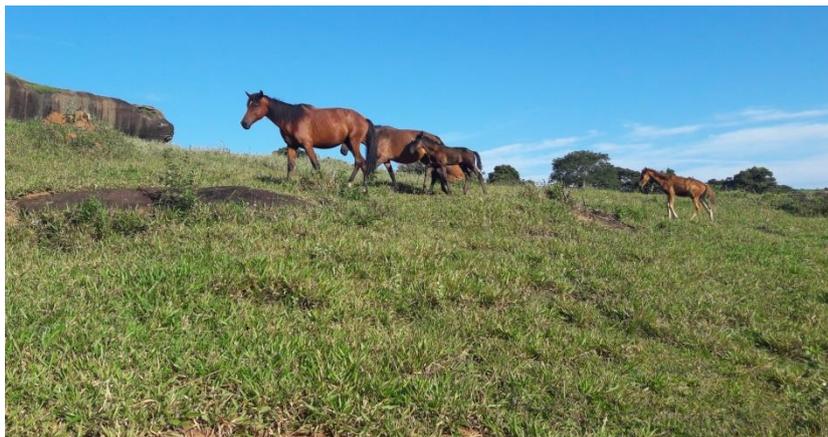


Figura 19. Pasto destinado às éguas paridas
Fonte: Do autor (2019)



Figura 20. Instalação de *Creep-Feeding*
Fonte: Do autor (2019)

3.2 Manejos nutricional e alimentar

Além dos piquetes e pastos de excelente qualidade e grande disponibilidade de volumoso, é feita complementação da dieta dos animais com ração concentrada e silagem de milho.

3.2.1 Ração concentrada

A ração concentrada (Figura 21) é fornecida uma vez ao dia, juntamente com a silagem de milho, para complementar a alimentação dos animais na central, sendo utilizada a seguinte composição:

- 10 sacos de milho desintegrado com palha e sabugo (Milho DPS)
- 3 sacos de farelo de soja
- 3 sacos farelo de arroz
- 2 latas de sal mineral



Figura 21. Ração concentrada
Fonte: Do autor (2019)

A mistura dos ingredientes da ração é feita em sala de misturador próprio e posteriormente é armazenada em tambores em sala próxima à lanchonete, facilitando o ar्राçoamento (Figura 22).



Figura 22. Sala de armazenamento de ração
Fonte: Do autor (2019)

3.2.2 Silagem de milho

O milho é cultivado na propriedade e conservado na forma de silagem (Figura 23), em silos do tipo trincheira (Figura 24).



Figura 23. Silagem de milho
Fonte: Do autor (2019)



Figura 24. Silo do tipo trincheira
Fonte: Do autor (2019)

Na propriedade, o desabastecimento algumas vezes não é feito diariamente, sendo que nesses casos a silagem pode ficar estocada por até 3 a 4 dias na carreta para só então ser fornecida aos animais. Este é um ponto falho do manejo alimentar da propriedade. A manutenção da massa sob ausência de oxigênio é um ponto determinante na qualidade final da silagem, que necessita atenção redobrada desde a vedação eficiente do silo até o desabastecimento correto. Com relação a vedação, um ponto que pode ser melhorado é a instalação de lonas nas paredes laterais durante a ensilagem, o que diminui consideravelmente as perdas de silagem da periferia. Após a abertura do silo trincheira, existe uma fatia mínima diária de 30 cm (0,3 m) a ser desabastecida do painel para não comprometer a anaerobiose do sistema. Com base nesse valor e no volume de silagem necessário para a alimentação diária dos animais é que a largura ideal do silo deve ser calculada. Esse dimensionamento deve ser feito antes da construção do silo, seguindo a seguinte fórmula:

$$L = V / (H \times TD)$$

Em que: L = Largura do silo (m)

V = Volume por dia (m³/d)

H = Altura do painel (m)

TD= taxa de desabastecimento diário (0.3 m/d)

A silagem é uma forma de conservação de forragem na ausência de oxigênio, onde ocorre o desenvolvimento de microorganismos produtores de ácidos responsáveis pela conservação da massa. As bactérias ácido-láticas (BAL) são os principais microorganismos benéficos responsáveis pela conservação da silagem, sendo produtoras de um ácido forte que garante a conservação da massa: o ácido láctico. Os principais gêneros de BAL são: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. O silo deve manter alguns parâmetros para garantir a proliferação das BAL, sendo eles: Matéria seca da planta ensilada entre 30 e 45 %, ausência de ar (oxigênio) e Nutrientes (Açúcares) disponíveis. Estas bactérias consomem os açúcares e liberam ácido láctico, dentro das condições acima citadas, mantendo o pH abaixo de 4,0 (ideal). Caso a anaerobiose do sistema seja comprometida, seja pelo desabastecimento inadequado ou pela manutenção da silagem desabastecida mais de um dia fora do silo, as BAL perdem eficiência. Na presença de oxigênio, a proliferação de microorganismos maléficos e indesejáveis é favorecida, como as enterobactérias, os clostrídeos, as leveduras e os fungos. Estes microorganismos consomem nutrientes da forragem (principalmente os açúcares) e até mesmo o próprio ácido láctico e liberam ácidos fracos (acético, fórmico e butírico – pouco eficientes na manutenção do pH baixo), Álcool, Amônia, Aminas e Toxinas (micotoxinas no caso dos fungos). Com a proliferação desses organismos, o pH do sistema sobe e a forragem deixa de ser conservada, entrando em decomposição e podendo causar graves danos á saúde dos animais.

3.2.3 Análise da silagem

Foi coletada do centro do silo uma amostra da silagem para a realização de Análise bromatológica por meio do Método NIRS (*Near Infrared Spectroscopy*) para forragens, pelo Laboratório 3r lab, em Lavras, MG. O relatório da Análise emitido pelo laboratório está anexado ao final deste trabalho.

3.2.3.1 Interpretação dos resultados

O teor de matéria seca (MS) da silagem deve manter-se entre 30 e 40%, como já discutido anteriormente, para garantir a atividade das BAL e a conservação da massa. Outro ponto importante é que, se a MS estiver abaixo do recomendado, as BAL não terão a mesma eficiência e a quantidade de ácido láctico produzido poderá ser menor, favorecendo o aumento do pH e a proliferação de microorganismos indesejados. O teor de MS da amostra da silagem da propriedade foi de 29,94, um valor que, em termos práticos, se enquadra no valor de referência, mas que pode acarretar problemas caso diminua com o tempo. O ideal seria um valor um pouco mais alto para maior segurança.

O pH da silagem analisada estava em 3.98. Este valor deve manter-se sempre abaixo de 4.0 para evitar a proliferação de microorganismos maléficos e garantir a máxima eficiência das BAL. O pH da silagem está adequado, mas muito próximo ao limite. É preciso estar atento à vedação e ao desabastecimento corretos para que, com o tempo, esse valor não passe de 4.0.

Para avaliar o teor de fibra de uma silagem, deve-se levar em conta o valor de duas frações: a Fibra em Detergente Neutro (FDN) e a Fibra em Detergente Ácido (FDA). A FDN determina a quantidade de fibra contida na silagem. O ideal é que os valores dessa fração se mantenham entre 45 e 52% MS. Valores baixos de FDN indicam, geralmente, silagens com maior quantidade de grãos, haja visto que os grãos possuem pouca fibra. Sendo assim, os valores maiores de FDN indicam menores quantidades de grãos e/ou que a silagem pode ter sido colhida um pouco depois do ponto ideal. Com base nesta afirmação, o valor da FDN pode demonstrar o teor de energia da silagem, sendo que os valores baixos de FDN indicam mais grãos e, consequentemente, mais energia. O resultado da análise bromatológica demonstrou um valor de FDN igual a 48,05% MS, estando dentro dos parâmetros pré-estabelecidos. A FDA, por outro lado, é uma fração que indica a porção da “fibra de baixa qualidade” que, por sua vez, está diretamente correlacionada com a menor digestibilidade da silagem. Desta forma, o ideal é que o valor de FDA esteja sempre abaixo de 30% MS. A silagem analisada demonstrou um valor de FDA igual a 30,70 % MS, estando ligeiramente acima do ideal e podendo, como consequência, tornar a silagem um pouco menos digestível.

A Proteína Bruta (PB) é uma fração normalmente de baixo teor na silagem. Ao contrário do que muitos possam acreditar, a fração mais importante e esperada da silagem é a Energia, sendo que a PB da dieta pode ser complementada pela ração concentrada, normalmente rica em ingredientes proteicos. Na presente análise, o valor

de PB está em 8,10 % MS, um valor conivente com os resultados normalmente encontrados em silagens de milho, onde a PB fica entre 5 e 10% MS.

A energia da silagem, principal fração que justifica o seu uso, é estimada através da análise de Nutrientes Digestíveis Totais (NDT), um cálculo que incorpora todos os nutrientes que fornecerão energia ao organismo do animal. O resultado do NDT na silagem analisada foi de 65,88, um valor razoável. Porém, quanto mais alto o NDT, melhor a silagem em termos de energia.

Com relação aos ácidos produzidos durante a fermentação, foi possível observar o teor de 3,01% MS de ácido láctico e 2,97% MS de ácido acético, sendo que para o ácido butírico o teor encontrado foi nulo. O teor ideal para o ácido láctico é entre 4,0 e 6,0% MS, valor que deve ser mantido para garantir um pH ideal. Sendo assim, pode-se concluir que a população de BAL está abaixo do que deveria, podendo acarretar problemas futuros na conservação da massa. O valor de ácido acético demonstra que enterobactérias provavelmente estão presentes na silagem, considerado que estas são as principais liberadoras de ácido acético em sua fermentação.

Outra fração extremamente importante na silagem é o teor de amido. O amido é o principal açúcar utilizado como nutriente pelas BAL. Desta forma, é esperado um teor médio de 28% MS de amido em uma silagem de milho. Sendo assim, o valor de 24,87% MS de amido na presente análise demonstra que o teor de amido está abaixo do ideal.

De acordo com os gráficos disponibilizados na análise, as curvas de digestibilidade da FDN e do amido com o passar das horas estão entre as curvas do mínimo e da meta, ou seja, estão adequadas.

Com base nos valores encontrados para PB, NDT e amido, foi possível concluir que a planta de milho ensilada provavelmente foi colhida antes do indicado.

Por fim, as análises demonstraram que a silagem de milho da propriedade se encontra dentro do esperado. Porém, foi possível observar que seus valores estão muito próximos ao mínimo tolerado para ser considerada uma silagem de milho ideal, sendo que em quase todos os tópicos ela se encontra no limite do aceitável.

3.2.4 Arraçamento

Tanto doadoras como receptoras recebem, uma vez ao dia, silagem e ração concentrada ao mesmo tempo. Algumas éguas são adaptadas a receber a alimentação dentro das lanchonetes (Figura 25) e as demais são alimentadas em cochos dentro dos

próprios piquetes (Figura 26). A alimentação é conjunta e sem quantidade definida para cada animal. Como os piquetes já são bem formados com pastagens de qualidade e em disponibilidade suficiente, esse fornecimento tem função apenas de complementação da dieta.

A forma de arração é outro ponto que pode ser melhorado no manejo alimentar da propriedade. Os equinos são animais de estômago pequeno em relação ao tamanho corporal e, portanto, com pouca capacidade de armazenamento de alimento em seu trato digestivo. Desta forma, é preciso muito cuidado ao fornecer grandes quantidades de alimento de uma vez só aos animais, podendo causar cólicas por compactação no estômago. O ideal é que o trato seja fracionado em mais vezes durante o dia. Outro ponto é o fornecimento de concentrado junto ao volumoso. Como são animais com digestão eficiente de fibras no intestino grosso, o volumoso passa rapidamente pelo estômago e intestino delgado. Desta forma, se o concentrado for fornecido ao mesmo tempo ou logo após o volumoso, também passa rapidamente pelo estômago, onde o seu aproveitamento seria maior, e vai diretamente ao intestino grosso, onde o aproveitamento é menor.



Figura 25. Cochos abastecidos para alimentação dentro da lanchonete
Fonte: Do autor (2019)



Figura 26. Alimentação no próprio piquete
Fonte: Do autor (2019)

Os garanhões recebem a mesma alimentação que doadoras e receptoras quando estão soltos nos piquetes (Figura 27). Quando estão dentro das baias, a silagem não é fornecida. A silagem, por ser um alimento fermentado, pode proporcionar maior produção de gases pelo organismo. Quando o animal está contido em baia, a sua movimentação fica restrita, diminuindo a atividade intestinal e podendo comprometer a liberação dos gases produzidos. Portanto, silagem e baia não são uma boa combinação, podendo predispor os equinos às cólicas. Desta forma, os garanhões recebem capim-napier (*Pennisetum purpureum*) picado e a ração concentrada nos períodos em que estiverem alojados em baias. A silagem é mais indicada para animais alojados em locais amplos e abertos, que permitam a sua livre movimentação.

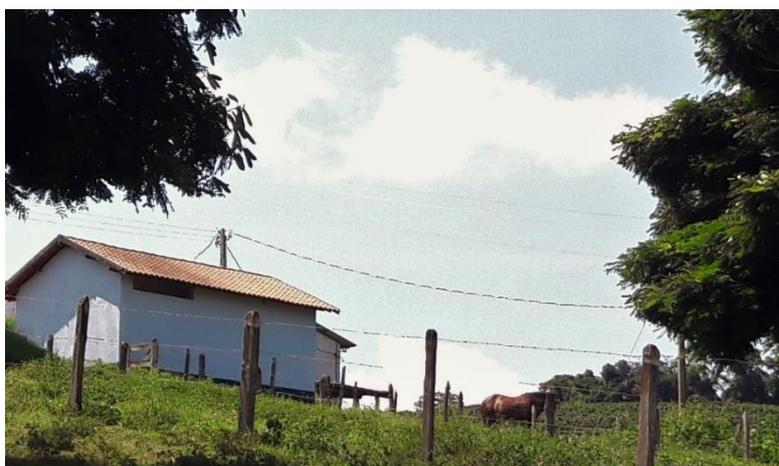


Figura 27. Garanhão solto no piquete durante o dia
Fonte: Do autor (2019)

Potros após o desmame também recebem ração concentrada e silagem de milho, uma vez por dia, em grupos (Figura 28).



Figura 28. Potros sendo alimentados em grupos
Fonte: Do autor (2019)

3.2.5 Sal mineral

A mineralização adequada é um ponto de extrema importância. O sal mineral repõe os sais perdidos pelo suor, visto que o cavalo tem uma grande quantidade de glândulas sudoríparas (CINTRA, 2010). Deficiência ou excesso de minerais podem causar graves problemas à saúde, podendo trazer danos irreversíveis aos animais e até levá-los à morte. Todos os animais da Central têm constantemente disponível sal mineral próprio para equinos *Ad libitum*, fornecido em cochos protegidos de chuva em todos os pastos e piquetes (Figura 29).



Figura 29. Cochos de sal mineral
Fonte: Do autor (2019)

A localização dos cochos de sal é extremamente importante, principalmente para animais que são alojados em grupo. Devido à hierarquia estabelecida entre eles, os

animais dominantes consumirão o sal antes dos demais. Como são animais de comportamento de bando, se o cocho for distante, os outros animais não ficarão para trás, afastados do grupo, para consumirem o sal. Desta maneira, animais subordinados podem sofrer problemas de desmineralização. Para evitar problemas, o ideal é que haja mais de um cocho, com quantidade suficiente e disponibilidade constante de sal mineral, localizados próximos à área onde os animais costumam ficar a maior parte do tempo, permitindo assim o acesso em qualquer hora do dia. Também é de extrema importância que os cochos sejam protegidos da chuva, que causa petrificação do sal, dificultando o consumo e ocasionando perda de propriedades.

3.2.6 Qualidade da água

Os equinos são animais que demandam grande volume de água, sendo que os adultos consomem de 30 a 45 litros de água por dia. Os animais devem ter disponível água fresca, livre de contaminação (se possível tratada), em quantidade suficiente disponível a qualquer momento e de fluxo constante. Deve-se atentar para a higienização regular de caixas d'água e bebedouros para evitar a proliferação de agentes infecciosos. O fluxo dos bebedouros deve ser constante, de forma a evitar que hora tenha água disponível, hora não tenha. Animais com cólicas recorrentes podem ser reflexos de bebedouros com problema, necessitando constante atenção.

3.3 Manejo reprodutivo

3.3.1 Manejo das doadoras

As éguas doadoras eram avaliadas assim que chegavam à Central, determinando ausência de prenhez, características uterinas e fase do ciclo estral. Quando detectada presença de folículo dominante com diâmetro superior a 30 mm (Figura 30), o controle folicular passava a ser realizado diariamente. A atividade ovariana era acompanhada através de palpação retal e ultrassonografia transretal, sendo tudo registrado através de uma ficha de controle contendo nome da égua, data e estágio do ciclo reprodutivo (Figura 31). As éguas que apresentavam folículos de diâmetro de 35 x 35 mm ou superior e edema uterino classificado entre 2 e 3 (Figura 32), em uma classificação de 1 a 3 (sendo 1 - edema pouco pronunciado e 3 - edema muito pronunciado), recebiam a administração de agentes indutores de ovulação (análogos de GnRH –Strelin-Botupharma ou Deslorrelina).

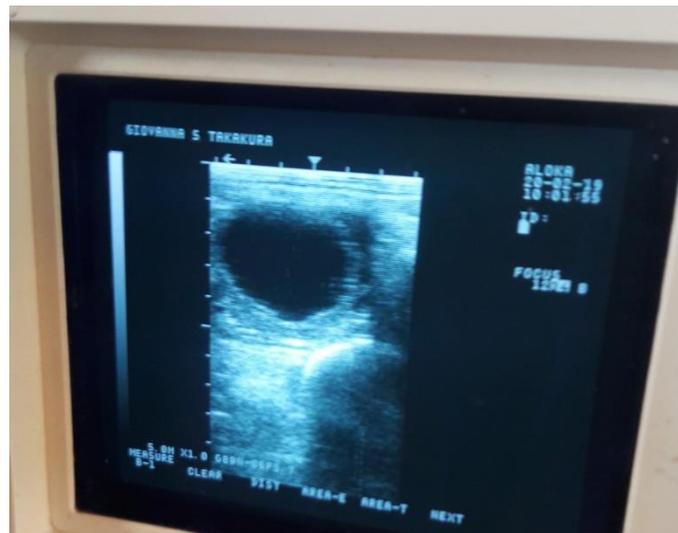


Figura 30. Folículo dominante apresentando diâmetro de 35 x 35 mm
Fonte: Do autor (2019)

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7
MOVIMENTO																										
ALTA																										
BAIXA																										
OBSCSSIVO																										
FRIO																										
BAIXA																										
OBSTACULO																										
BOCORNO																										
MAQUINA																										
QUARTA																										
OPINIA																										
BOCORNO																										

Figura 31. Ficha de controle do ciclo reprodutivo
Fonte: Do autor (2019)



Figura 32. Edema uterino de classificação 3
Fonte: Do autor (2019)

A Inseminação Artificial (IA) era realizada no dia seguinte à administração do indutor de ovulação. Após rigorosa avaliação do sêmen quanto à motilidade, vigor e concentração espermática em microscópio óptico, a égua a ser inseminada era devidamente contida em tronco de contenção próprio para equinos. Para garantir maior higiene e segurança durante o procedimento de IA, a cauda da égua era envolta com uma luva de palpação e amarrada no próprio animal, evitando assim eventuais acidentes. Em seguida era feita lavagem da região perineal com água corrente e sabão e posteriormente secagem com papel toalha para diminuir possíveis contaminações (Figura 33). Feito isto, o sêmen depositado no corpo uterino (Figura 34).



Figura 33. Égua a ser inseminada devidamente contida e higienizada
Fonte: Do autor (2019)

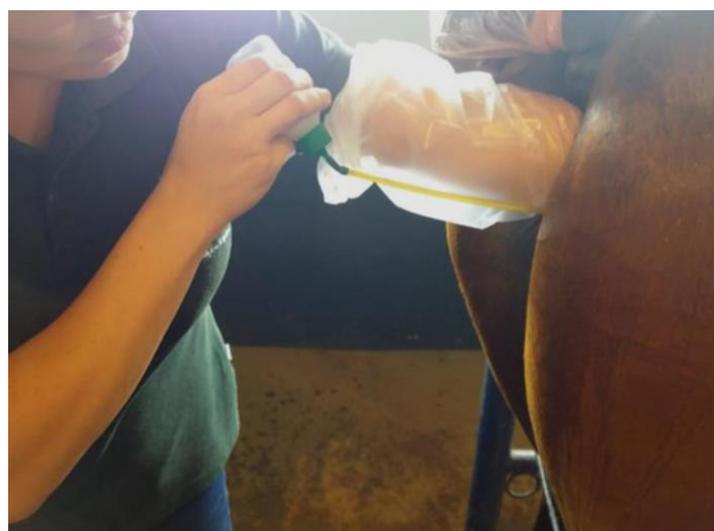


Figura 34. Inseminação Artificial
Fonte: Alves (2018)

No dia posterior à IA, as éguas eram novamente examinadas para detecção da ovulação e avaliação uterina. Caso houvesse presença de líquido uterino, era realizada lavagem uterina com solução de Ringer Lactato e, em alguns casos, com água oxigenada. O intuito de se utilizar a água oxigenada em alguns casos é promover a oxigenação dentro do útero, quebrando a anaerobiose do sistema e criando, assim, um ambiente desfavorável ao desenvolvimento de microorganismos patogênicos. Em seguida era feita a aplicação de ocitocina, que estimula contração uterina e ajuda na eliminação do líquido. É importante ressaltar que a ocitocina só deve ser utilizada até três dias após a ovulação, sendo que após este período o embrião pode chegar até o útero, não sendo mais desejável a contração uterina. Após oito dias da detecção da ovulação e presença de corpo lúteo (CL), era realizada a coleta de embrião.

3.3.2 Manejo das receptoras

As éguas receptoras eram examinadas através de palpação retal e ultrassonografia transretal três vezes na semana (segunda, quarta e sexta), em que seu estágio reprodutivo era anotado em uma tabela de controle assim como as éguas doadoras. Quando eram constatados folículos de 35 x 35 mm de diâmetro ou superior e edema endometrial classificado em 2-3, a indução da ovulação poderia ser realizada conforme a necessidade de sincronização com a doadora, para que de 36 a 48 horas após ocorresse a ovulação e formação do corpo lúteo (CL).

A seleção da receptora era baseada em seu histórico reprodutivo e em características avaliadas durante o exame ultrassonográfico, como ecogenicidade do corpo lúteo, homogeneidade da parede uterina (ausência total de edema ou dobras endometriais), ausência de ar no lúmen relacionada com a capacidade da cérvix de manter o isolamento uterino com o meio externo (caracterizada no ultrassom por pontos ecogênicos no interior do útero) e a simetria entre os cornos uterinos. Através da palpação retal, o tônus da cérvix e do útero também eram avaliados para garantir a escolha da receptora mais apta a receber o embrião. A ausência de dobras endometriais está relacionada com a concentração de progesterona, tendo em vista que estas nunca estão presentes quando a concentração sanguínea de progesterona está igual ou mais elevada que 1ng/mL.

Para facilitar este manejo, as receptoras ovuladas eram organizadas em uma tabela de controle à parte, contendo a data da ovulação (D0) e os dias subsequentes (D1,

D2, D3... D8) em que as receptoras estavam aptas a receber embrião no intervalo de D4 a D8, sendo o dia preconizado D5.

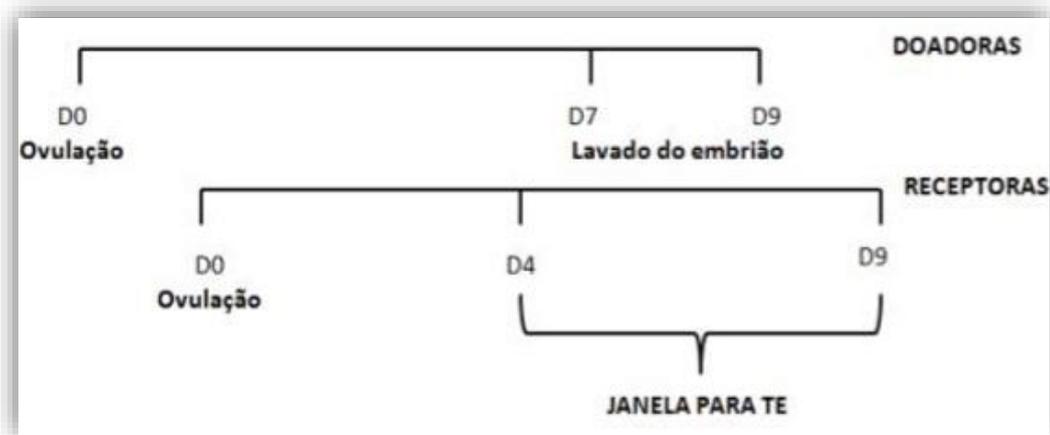


Figura 35. Desenho esquemático da sincronização entre doadoras e receptoras
Fonte: Alves (2018)

3.3.3 Coleta e transferência de embrião

Para facilitar a organização das datas de coleta, evitando assim possíveis esquecimentos e auxiliando na organização das atividades diárias, as datas mais próximas de coletas eram anotadas em dois quadros de controle (Figura 36), que ficavam em locais de fácil visualização, nas unidades de doadoras e de receptoras. Os quadros tinham grande utilidade e permitiam melhor visualização, tanto da data de coleta quanto da necessidade de receptoras aptas nos dias corretos.

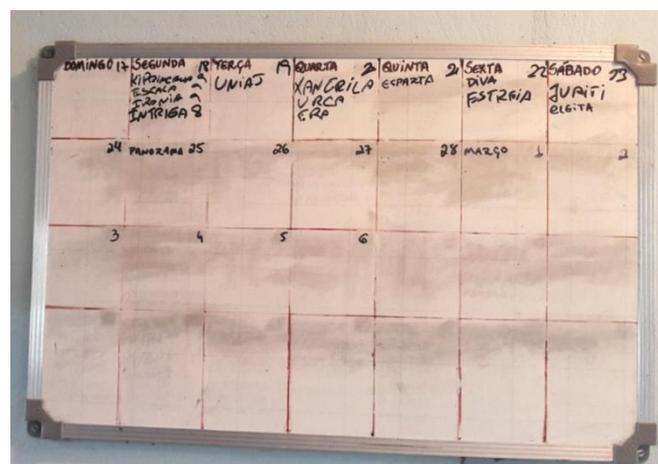


Figura 36. Quadro de controle de datas de coletas de embrião
Fonte: Do autor (2019)

A coleta do embrião era realizada por procedimento não-cirúrgico transvaginal, por meio de lavagem uterina com 0,5-2 L de Ringer Lactato. Em éguas de útero de tamanho maior, 1L de Ringer era infundido a cada lavagem. Em casos onde o útero apresentava tamanho menor, como em éguas mais jovens, apenas 0,5 L de Ringer Lactato era infundido por vez. O procedimento era realizado utilizando sonda de silicone, filtro de malha de 75 micras, seringa de 20 mL para inflar o balonete e gel lubrificante para facilitar a introdução da sonda.

Após a contenção da égua doadora e feita a higienização da região perineal, a sonda era introduzida via vaginal e posicionada no corpo do útero. O balonete era inflado com 30 a 45 mL de ar e levemente tracionado contra o óstio cranial do cérvix, para evitar refluxo de líquido durante a lavagem uterina e, conseqüentemente, a perda do embrião. O Ringer Lactato era infundido em quantidade suficiente para preencher o corpo e os cornos uterinos (Figura 37). Após o completo preenchimento do útero, a mão do técnico era introduzida no reto do animal, para que fosse realizada massagem uterina de forma eficiente, que auxilia no total esvaziamento do útero. O líquido era então drenado, passando por filtro que retém o embrião (Figura 38). O filtro permanecia com no mínimo 20 mL de solução, para evitar a desidratação do embrião. Este procedimento era repetido em média duas vezes. A cada lavagem, era feito um rastreamento prévio do embrião a olho nu que, uma vez detectado, interrompia-se o procedimento. Posteriormente retirava-se o ar do balonete para a saída da sonda do útero e o líquido contido nela era transferido para o filtro.



Figura 37. Infusão de Ringer Lactato no útero
Fonte: Do autor (2019)



Figura 38. Transferência do líquido do útero para o filtro de coleta
Fonte: Do autor (2019)

Ao final da coleta, independentemente da observação ou não de embrião a olho nu, era administrado 1 mL de um análogo de Prostaglandina $F_{2\alpha}^3$ (PGF) na doadora, por via intramuscular, para induzir a luteólise e o retorno ao cio dentro de três a cinco dias. Em seguida, o filtro era levado para o laboratório e seu conteúdo transferido para uma placa de Petri estéril, descartável e previamente riscada, com linhas paralelas no fundo, para guiar a procura do embrião que ainda não houvesse sido observado a olho nu, por meio de estereomicroscópio (Figura 39).



Figura 39. Procura do embrião utilizando estereomicroscópio
Fonte: Do autor (2019)

Depois de localizado o embrião (Figura 40), era feita a sua manipulação pela médica veterinária responsável. O embrião era então classificado de acordo com seu estágio de desenvolvimento e qualidade. A classificação por estágio de desenvolvimento considera o aspecto morfológico do embrião que encontrar-se em fase de mórula, blastocisto inicial ou blastocisto expandido. Na classificação quanto à qualidade era observado o formato (esférico), coloração (homogênea), extrusão celular, integridade da zona pelúcida e também presença de sujidades aderidas à parede. Após a classificação, outra placa de Petri era preparada com 10 gotas de meio de cultivo (Holding Plus®, Vitrocell, Embriolife), previamente aquecido de 32 a 37°C, para a lavagem do embrião (Figura 41). E então, com uma palheta acoplada na seringa de 1 cc, o embrião era resgatado da placa de Petri que continha o lavado e colocado em uma das gotas de meio. O embrião era lavado à medida que passava pelas gotas, sendo que o processo era realizado através de movimentos de aspiração e expiração do embrião com auxílio de palheta, diminuindo a cada gota a carga microbiana do meio.

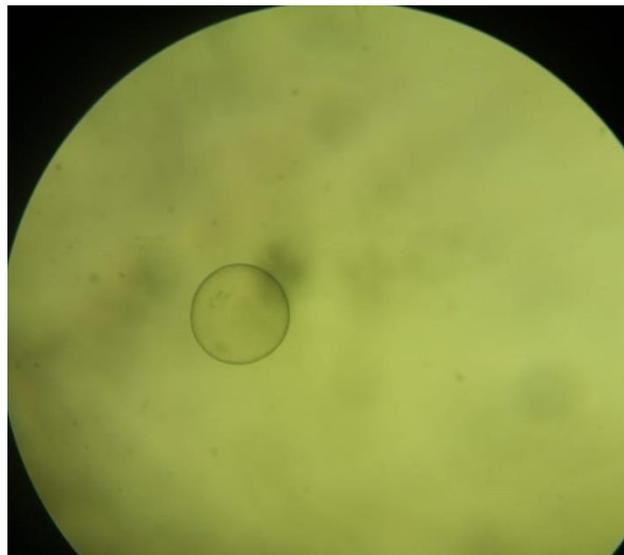


Figura 40. Embrião coletado em fase de Blastocisto Expandido
Fonte: Do autor (2019)

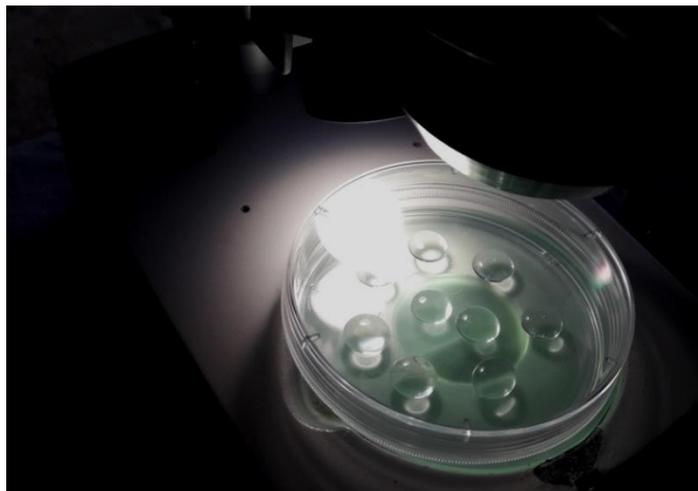


Figura 41. Placa de Petri contendo as gotas de meio de cultivo
Fonte: Do autor (2019)

Após a realização dos procedimentos de lavagem, o embrião era transferido para um tubo criogênico contendo meio de cultivo para ser transportado até o setor onde ficavam as éguas receptoras.

Quando a transferência não podia ser realizada imediatamente após a coleta, o embrião era armazenado em tubo criogênico com meio de cultivo (Holding Plus®, Vitrocell Embriolife), em local protegido de luz, umidade e calor. O embrião equino permanece viável em meio de cultivo por até 20 horas, refrigerado a 18° C.

No momento da transferência, o embrião era aspirado juntamente com o meio por uma pipeta de inseminação, respeitando a seguinte ordem: uma coluna de meio, uma coluna de ar, uma segunda coluna de meio e outra de ar, a terceira coluna de meio contendo o embrião, outra coluna de ar e outra com meio (Figura 42).



Figura 42. Embrião preparado para a transferência em pipeta de inseminação
Fonte: Do autor (2019)

A égua receptora escolhida era contida na lanchonete, onde primeiramente a higienização da região perineal era realizada. A pipeta com o embrião era envolvida por uma camisa sanitária (IMV® France) para proteger de contaminações vaginais e era introduzida na cérvix. Após a introdução da pipeta no terço inicial da cérvix, a camisa sanitária era rompida. Ao sentir resistência do corpo uterino, tracionava-se a pipeta 2 cm para trás e o êmbolo da seringa era empurrado para depositar o embrião no corpo do útero.



Figura 43. Transferência do embrião para a receptora
Fonte: Alves (2018)

Cinco dias após a TE, era realizado o diagnóstico de gestação nas receptoras por exame ultrassonográfico (Figura 44).



Figura 44. Diagnóstico de gestação positivo realizado 5 dias após a TE
Fonte: Do autor (2019)

Após a confirmação de prenhez, a receptora permanecia na propriedade até o diagnóstico final, realizado aos 60 dias de gestação. A partir desse ponto, as receptoras eram encaminhadas aos proprietários dos embriões. As doadoras retornavam aos proprietários quando todos os embriões desejados eram confirmados ou ao final da estação de monta.

3.3.4 Higienização dos materiais utilizados

As sondas utilizadas para lavagem, tratamento uterino e coleta de embriões eram esterilizadas em autoclave vertical analógica. Elas eram lavadas com água corrente, embaladas em sacos plásticos e colocadas em autoclave. Após a esterilização, as sondas eram transferidas para estufa a 60°C durante três dias e posteriormente armazenadas. As placas de Petri utilizadas para rastreamento dos embriões e os filtros para coleta eram lavados em água corrente, mantidos na estufa a 60°C por três dias e depois embalados para serem usados posteriormente. Para a manipulação embrionária após o rastreamento, eram utilizadas placas novas e estéreis.

Todos os demais materiais utilizados para os procedimentos da TE eram descartados.

3.3.5 Manejo de garanhões

Normalmente, as doses de sêmen utilizadas nas éguas doadoras vinham de garanhões de outras propriedades, sendo poucas as vezes em que garanhões da Central foram utilizados durante o período de estágio. Desta forma, a coleta de sêmen não era realizada de forma rotineira.

Quando necessária a realização da coleta de sêmen, uma égua diagnosticada em cio através de exame ultrassonográfico era selecionada, sendo avaliada a receptividade da mesma ao garanhão e dando preferência às éguas de temperamento mais calmo. A coleta era realizada por meio de vagina artificial do modelo Botucatu. A vagina artificial era revestida internamente por uma mucosa plástica, para impedir a contaminação do sêmen, e então preenchida com aproximadamente 1,5 L de água a uma temperatura de 60° C. Neste protocolo, era possível manter a temperatura da vagina artificial no

momento da coleta entre 39 e 40° C. Em uma das extremidades era acoplado um copo coletor de sêmen, também do modelo Botucatu, equipado com filtro de nylon para conter a última fração do ejaculado, a fração gelatinosa (Figura 45).



Figura 45. Gel retido pelo filtro e fração rica em espermatozoides no tubo coletor
Fonte: Do autor (2019)

A última fração do ejaculado advém das vesículas seminais e é pobre em espermatozoides, apresenta aspecto gelatinoso que tem como função evitar o refluxo do sêmen durante a monta natural. Na inseminação artificial esta fração não é interessante, porque além de ser pobre em espermatozoides, pode propiciar uma infecção uterina devido à infusão de grande volume de ejaculado dentro do útero. Após a contenção adequada da égua, que tinha a cauda amarrada para evitar adversidades durante a coleta, e a preparação da vagina artificial, o garanhão era trazido ao local. Todo o procedimento era realizado com auxílio do funcionário responsável, sob orientação da médica veterinária, para evitar acidentes. Quando o garanhão realizava a monta, o pênis era desviado para a vagina artificial, onde o ejaculado ficava armazenado no tubo coletor (Figura 46). Ao final da coleta, o sêmen era levado ao laboratório para avaliação em microscópio e posterior diluição e armazenamento em tubo próprio para transporte e inseminação. Quando necessário, uma gota de sêmen era corada por esfregaço utilizando preparação comercial de eosina e nigrosina (Botuvial da Botupharma), para posterior contagem de vivos e mortos (Figura 47).



Figura 46. Coleta de sêmen
Fonte: Do autor (2019)



Figura 47. Quantificação de vivos e mortos
Fonte: Do autor (2019)

3.3.6 Índices reprodutivos

O diagnóstico de gestação nas receptoras era realizado por exame ultrassonográfico 5 dias após a TE. Durante toda a estação de monta, um total de 151 embriões foram recuperados e transferidos. Deste total, 119 receptoras foram confirmadas prenhas e 32 não ficaram gestantes. Sendo assim, a taxa de sucesso da Transferência de Embriões da estação de monta foi de 79% de prenhez, um excelente resultado.

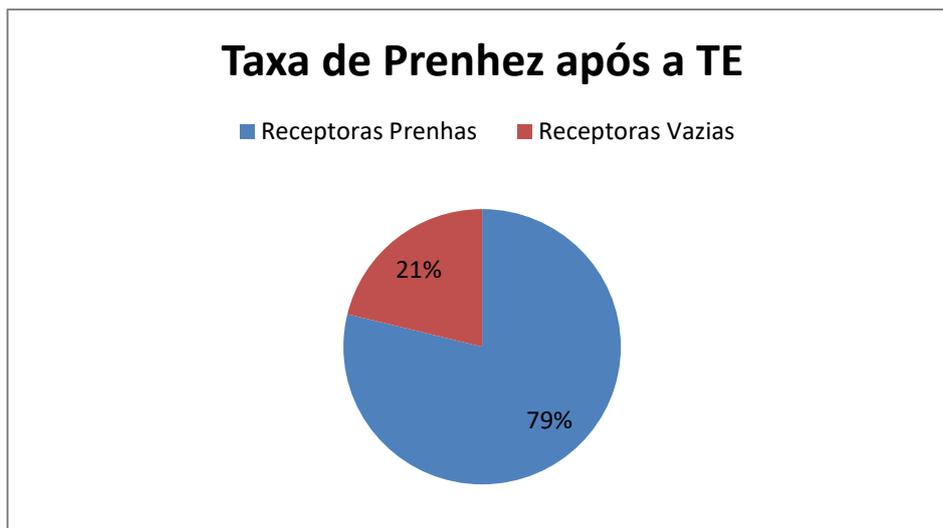


Figura 48. Gráfico da taxa de prenhez da estação de monta

Fonte: Do autor (2019)

4. RELATO DE CASO VIVENCIADO DURANTE O ESTÁGIO

4.1 Reflexos da correção odontológica em égua receptora na melhoria da absorção de nutrientes, impactando positivamente na qualidade dos cascos

A principal causa das alterações dentárias nos equinos é a modificação da dieta natural. Os equinos, por natureza, se alimentam de gramíneas e fibras longas + sílica, que promovem o desgaste homogêneo dos dentes. Com a introdução de forragens conservadas e alimentos concentrados na dieta dos equinos, muitas vezes em quantidades superiores ao ideal, todo o processo alimentar é modificado. Quando em quantidades inadequadas, esses alimentos diminuem o tempo de mastigação (naturalmente um equino pasta 17 h por dia), alteram o padrão de alimentação, alteram a posição anatômica de apreensão dos alimentos e desequilibram o desgaste dentário. Desta forma, pode ocorrer a formação de pontas excessivas de esmalte dentário, muitas vezes de aspectos cortantes, que incomodam durante a mastigação e podem causar graves ulcerações na bochecha e língua dos animais. O desconforto e a dor fazem com que o animal diminua o tempo de mastigação, prejudicando a digestão mecânica que deveria ocorrer através trituração dos alimentos na boca e diminuindo também a produção de saliva. A ineficiência da mastigação prejudica as posteriores digestão e absorção dos nutrientes, graças à dificuldade de acesso das enzimas digestivas ao material pouco degradado. Com digestão e absorção de nutrientes comprometidas, os

reflexos não demoram a aparecer no animal, como perda acentuada de peso, queda na imunidade e pelos e cascos nitidamente fragilizados. Foi possível acompanhar de perto um desses casos durante o período de estágio, onde uma égua receptora foi diagnosticada com desgaste dentário desequilibrado, que a impedia de se alimentar de forma adequada e refletia negativamente em seus cascos. Para resolver o problema, foi realizado o tratamento odontológico pela médica veterinária Giovanna Santesso Takakura, no dia 5 de outubro de 2018, para desgaste corretivo dos dentes e remoção de uma ponta de esmalte dentário que havia se formado e que estava causando grave ulceração na mucosa bucal da égua (Figuras 48 e 49).

Os cascos dos equinos crescem em média 1 cm a cada 30/40 dias e, quando criados soltos, se desgastam na mesma proporção em que crescem. No dia 30 de janeiro de 2019, 3 meses após o tratamento odontológico, foi possível observar melhora significativa na qualidade dos cascos da receptora, como resultado da adequação na mastigação e do consequente aumento na digestibilidade dos alimentos (Figuras 50, 51 e 52). Aproximadamente 3 cm de cascos novos, mais fortes e mais saudáveis, haviam crescido até a data, evidenciando nos quatro cascos uma linha exata entre as duas fases (antes e após o tratamento). Este resultado demonstrou que houve grande melhora na absorção dos nutrientes após o desgaste corretivo dos dentes.



Figura 49. Ponta formada pelo desgaste inadequado dos dentes

Fonte: Takakura, acervo pessoal (2018)



Figura 50. Dentes da receptora após o tratamento odontológico
Fonte: Takakura, acervo pessoal (2018)

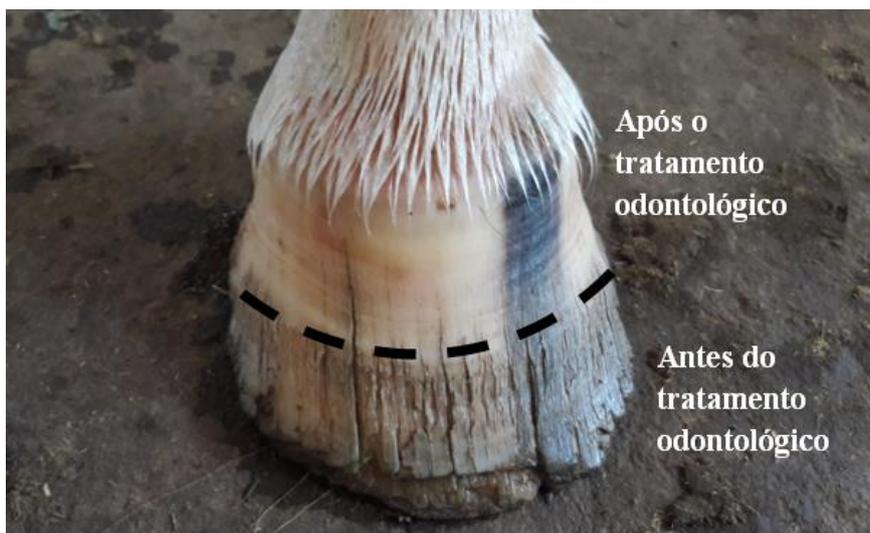


Figura 51. Casco anterior esquerdo no dia 30 de janeiro de 2019, 3 meses após tratamento
Fonte: Do autor (2019)



Figura 52. Cascos anteriores
Fonte: Do autor (2019)



Figura 53. Cascos posteriores
Fonte: Do autor (2019)

Esta observação demonstrou a grande contribuição da manutenção da saúde bucal na nutrição, sanidade, longevidade, fertilidade e bem-estar dos equinos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio supervisionado na Central de Transferência de Embrião – Quirón Reprodução Equina foi uma experiência extremamente engrandecedora para a minha formação profissional e pessoal. Participar da rotina da central sob o acompanhamento da Médica Veterinária Giovanna Takakura por um tempo trouxe grandes aprendizados sobre a área da Equideocultura e Reprodução Equina, em que eu contava com pouca experiência. Foi possível comprovar com o estágio a viabilidade do sistema de Transferência de Embriões Equinos e a maneira correta de se realizar a metodologia, garantindo excelentes resultados e alta taxa de recuperação embrionária obtidos. Pude constatar que a saúde uterina é extremamente importante para se obter sucesso na TE e observar diferentes formas de tratar e prevenir afecções uterinas. Ainda, foi possível observar todo o manejo da propriedade e acompanhar o dia a dia com os animais. Por fim, o estágio supervisionado, juntamente com a elaboração deste trabalho, foi parte indispensável em minha formação acadêmica e uma forma de concluir com orgulho o curso de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. R. Bras. Zootec., v.39, p.119-129, 2010

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T. do.; OLIVEIRA, J.V. **Transferência de embriões na espécie equina**. Botucatu- SP, Apostila. 2008.

ALVES, N. **ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA CENTRAL QUIRÓN REPRODUÇÃO EQUINA - CAMBUQUIRA –MG**. 2018. TCC (Bacharel em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Lavras. 2018.

ANDRADE, L.S. **O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. Fisiologia e manejo da reprodução equina**, 2º ed., Recife, p.57-63,1986.

ARRUDA, R.P., VISINTIN, J.A., FLEURY, J.J., GARCIA, A.R., MADUREIRA, E.H., CELEGHINI E.C.C. & NEVES NETO J.R. **Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos?** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:233-239, 2001.

BASS, L. D.; DENNISTON, D.J.; MACLELLAN, L.J.; McCue PMP, Seidel Jr GE, Squires EL. **Methanol as a cryoprotectant for equine embryos**. Theriogenology, v.62, p.1153-1159, 2004.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSK O, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction**. 2 ed., USA, 249p.2003.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. **Manual of equine reproduction**. 3 rd ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011.

C.F.MOYA-ARAÚJO; G..H..M. ARAÚJO; C. MEIRA. Avanços na criopreservação de embriões equinos. **Rev. Bras. Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.34, n.1, p.58-66, jan./mar. 2010.

CAMARGO, C.E.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; DUARTE, M.P.; DUARTE, M.C.G.; BERTOL, M.A.F.; GAIEVSKI, F.R.; BASTOS, G.M. **Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião**. Vet. e Zootecnia mar.; 20(4): 74-83.2013.

CAMILO, F.; VANNOZZI, I.; LUZIO, B.D.; ROMANGNOLI, S.; ARIA, G. & Allen W.R. 2003. **Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients**. *Reprod. Dom. Anim.* 38:380-385.

CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M. **Transferência de Embriões**. Campo Virtual, Recife, PE, Brasil, v.5, p.2-2, 2002.

CARNEIRO, G. F.; **Técnicas de Reprodução Assistida aplicadas a Equinos**. Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Av. Bom Pastor s/n Boa Vista - CEP: 55.296-901 – Garanhuns/PE – Brasil. *Ciência Animal*, 22(1); 308-324, 2012 – Edição Especial

CARNEVALE, E.M.;ELDRIGNE-PANUSKA, W.D.;CARACCILO DI BRIENZA, V.;SEIDEL, Jr. G.E.;SQUIRES, E.L. **Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos**. In: International Symposium on Equine Embryo Transfer, 6, 2004, Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro: ISEET, 2004b. p.45-46

CARNEVALE, E. M. **Vitrification of equine embryos**. *Vet Clin Equine*, v.22, p.831-841, 2006

CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.; HINRICH, K. **Developmental in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa**. *Reproduction*, v. 123, p. 455-65, 2002b.

CINTRA, A. G. DE C. **O CAVALO: Características, Manejo e Alimentação**. 1ª Edição, ed. Roca, 2010, 364p.

CINTRA, A.G.C – A Antiga Relação do Homem com o Cavalo - **Revista Animal Business**, Sociedade Nacional de Agricultura, 2013.

CUERVO-ARANGO, J.;AGUILAR, J. &NEWCOMBE, J.R. 2009. **Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound**. *Theriogenology* 71:1267-1275.

DAELS, P. **Embryo transfer tips and tricks**. Proceedings 5th European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen, Amsterdam, p.213-215.2007.

DAVIES MOREL, M.C.G. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. 2º ed. Wallingford: Cabi International, 2003. 357p.

DE LA CORTE, F.D.; ALDA, J.L.; CASTRO, I.N.; BRASS. K.E.; SILVA. C. A.M. **Diagnóstico precoce da gestação na égua através da ultra-sonografia**. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo*, v.31. n.3/4, p. 282-7. 1994

DOUGLAS, R.H. **Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine**. *Theriogenology* 11:33-36.1979.

DOUGLAS, R.H. Some aspects of equine embryo transfer. **J. Reprod. Fertil.** 32:405-408.1982.

DOUGLAS, R. H.; NUTI, L.; GINTHER, O. J. **Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory mares with equine pituitary fractions.** *Theriogenology*, v.2, p.133-142, 1974.

DITTRICH, J.R.; MELO, H.A.; AFONSO, A.M.C.; DITTRICH, R. L. Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. *R. Bras. Zootec.*, v.39, p.130-137, 2010.

ELDRIGNE-PANUSKA, W.D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL Jr. G.E.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1308-1319, 2005

EVANGELISTA, R.M. **A transferência de embriões em equinos e a importância da égua receptora.** Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 53p. 2012

FAHY, G.M.; MAC FARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T.; Vitrification as a approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v.21, p.407-426, 1984.

FAO. Trade: Live Animals, Horses. Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

FERREIRA, J.C.; MEIRA, de C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. *Ciência Rural*. Santa Maria. 2011.

FLEURY, J.J.;ALVARENGA, M.A.; COSTANETO, J.B.F. &PAPA, F.O. 1987. **Transferência de embriões em eqüinos.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39:485-487.

FLEURY, J.J.;PINTO, A.J.;MARQUES, A.;LIMA, C.G. &ARRUDA, R.P. 2001. **Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga.** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:29-33.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.; SOUSA, F.A.C.;ANDRA, A.F.C. &ARRUDA, R.P. **Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos.***Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31:27-31.2007.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.**2^a ed. Editora Cross Plains WI:Equiservices, 1992.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects.**2^a ed. Editora Cross Plains WI:Equiservices, 1992.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction*,v.1, p. 31-44, 2004

HARTMAN, D. L. Embryo Transfer. In: McKINNON, A. O. *et al.***Equine Reproduction.**2nd ed. Oxford: Wiley – Blackwell, 2011. v. 2, cap. 303, p. 2871-2879.

HINRICHS, K. &CHOI, Y.H. **Assisted reproductive techniques in the horse.** *Clin. Tech. Equine Pract.* 4:210-218.2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Pecuária Municipal, 2017. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>>. Acesso em 5 mar. 2019.

IMEL, K.J. **Recovery, culture and transfer of equine embryos.** MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA.1981.

IULIANO, M.F.;SQUIRES, E.L. &COOK, V.M. **Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate.** *J. An. Sci.* 60:258-263.1985.

KASAI, M. **Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos.** *Anim Reprod Sci*, v.42, p.67- 75, 1996.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do Complexo do Agronegócio Caval.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 250p.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Transferências de embrião em equinos: Revisão. *Acta Veterinária Brasilica*, v. 3, n. 4, 0. 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, UK. p.101-102. 2008.

LUZ, M.R.; WATANABE, Y.F.; FERRO, J.A. et al. **Sexing in vitro fertilized bovine embryos by multiplex PCR.** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, p.453-456, 2000.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Equídeos, 2016. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em 5 mar. 2019.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Equídeos, 2018. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/boas-praticas-e-bem-estar-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/manual_boas_praticas_digital.pdf>. Acesso em 5 mar. 2019.

McCUE, P.M.; SCOGGIN. F.C.; LINDHOLMIN, A.R.G. Estrus In: McKINNON, A.O.;SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction.** 2^a Ed.Blackwell Publishing, cap.179, p.1716-1727. 2011.

MCKINNON, A.O. &SQUIRES, E.L. **Embryo transfer and related technologies,** p.319-334. In: Current Therapy Equine Reproduction. Saunders, Missouri.2007.

MEIRA, C.;ALVARENGAM, M. A. **Potros nascidos de embriões congelados no Brasil.** *Ars Vet*, v.9, p.181-182, 1993

MEYER, H. **Alimentação de cavalos.** São Paulo (SP): Varela, 1995. 303p.

MOUSSA, M.; BERSING, I.; DOLIGEZ, P.; GUIGNOT, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; MERMILLOD, P.; BRUYAS, J.F. **In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification.** *Theriogenology*, v.64, p.1619-1632, 2005.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J. F.; DAELS, P. F. **In vitro in vivo comparison of ham's F10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos.** *Theriogenology*, v. 59, p. 1615-1625, 2003a, 2003b.

MOUSSA, M.; TREMOLEDA, J. L.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J. F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; DAELS, P. F. **Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C.** *Theriogenology*, v. 61, n. 5, p. 921-932, 2003a.

MUNAR, C. J. Criopreservação, tópicos atuais. **Rev Centro Ciênc Rurais UFSM**, v.18, p.17-19, 1988.

NAGY, P., GUILLAUME, D., DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 245-262, 2000.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical egg transfer in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 313-320, 1974.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, n. 2, p. 187-195, 1972.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. **Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification.** *Nature*, v.313, p.573-575, 1985.

ROWLING, J. K. *Harry Potter e a Câmara Secreta*. 1º Edição. Rio de Janeiro: Rocco, 2015.

SAMPER, J. C. **Equine Breeding management and artificial insemination**. 2º ed. Saunders Elsevier, 2009. 310 p.

SEIDEL Jr, G.E.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; LONG, P.L. **Cryopreservation of equine embryos in 1,2-propanediol.** *Equine Vet J Suppl*, n.8, p.87-88, 1989.

SESSIONS, D. R.; REEDY, S. E.; VICK, M. M.; MURPHY, B. A.; FITZGERALD, B. P. Development of a model for inducing transient insulin resistance in the mare: Preliminary implications regarding the estrous cycle. **Journal of Animal Science**, 2004.Aug;82(8):2321-8.

SIMPSON, D.J.; GREENWOOD, R.E.S.; RICKETTS, S.W.; ROSSDALE, P.D.; SANDERSON, M.; ALLEN, W.R. **Use of ultrasound echography for early diagnosis of a single and twin pregnancy in the mare.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v.32, p.4319. 1982.

SISTEMA IBGE DE RECUPERAÇÃO AUTOMÁTICA - SIDRA. Disponível em <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em 3 jun. 2019.

SQUIRES, E.L. & McCUE, P.M. **Superovulation in mares**. Anim. Reprod. Sci. 99:1-8.2007.

SQUIRES, E.L. & SEIDEL, G.E. **Collection and transfer of equine embryos**. Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin. Colorado State University, Fort Collins. p.397.1995.

SQUIRES, E.L. **Superovulation in Mares**. Vet. Clin. Equine 22:819-830.2006.

SQUIRES, E.L.;CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M. &BRUEMMER, J.E. **Embryo technologies in the horse**. Theriogenology 59:151- 170.2003.

SQUIRES, E.L.;COOK, V.M. &VOSS, J.L. **Collection and transfer of equine embryo**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Colorado State University, Fort Collins. 37p.1985.

SQUIRES, E.L.;IMEL, K.L.;IULIANO, M.F. &SHIDELER, R.K. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. **J. Reprod. Fertil.** 32:409-414. 1982a.

SQUIRES, E.L.; IULIANO, M.F. &SHIDELER, R.K. **Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer**. Theriogenology 17:35-41.1982b.

SQUIRES, E.L., McCUE, P.M. &VANDERWALL, D.K. **The current status of equine embryo transfer**. **Theriogenology** 51:91-104.1999.

SQUIRES, E.L.**Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction**. Acta Sci Vet, v.33, p.69-81, 2005

SQUIRES, E.L. **Maturation and fertilization of equine oocytes**. Veterinary Clinics of North America Equine Practice, vol. 12, p. 31-45, 1996.

SQUIRES, E.L.; WILSON, J.M.; KATO, H.; BLASZCZYK, A. **A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro**. Theriogenology, vol. 45, p. 306,1996.

SRINIVASAN, V.; SPENCE, W.D.; PANDI-PERUMAL, S. R.; ZAKHARIA, R.;BHATNAGAR, K. P.; & BRZEZINSKI, A. **Melatonin and human reproduction: Shedding light on the darkness hormone**. Gynecological Endocrinology. 2009 25

STROUD, B; BÓ, GA. **The year 2009 world wide statistics of embryo transfer in domestic animals summary of the International EmbryoTransfer (IETS) Data Retrieval Committee Report**. Acta ScientiaeVeterinariae, v.39, Suppl 1, p. 139-146, 2011.

TAKEDA, T.;ELSDEN, R.P.;SQUIRES, E.L. **In vitro and in vivo development of frozen-thawed equine embryos.** In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 10, 1984, Urbana-Champaign. Proceedings... UrbanaChampaign: ICAR, 1984. v.2, p.246-247.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.;BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.;GREVE, T.;CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: **A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.** Mol Reprod Dev, v.51, p.53-58, 1998

VANDERWALL, D.K. &WOODS, G.L. **Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses,** p 211-219. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Saunders, Missouri.2007.

VANDERWALL, D.K. 2000. **Current Equine Embryo Transfer Techniques.** In: Ball B.A. (Ed.) Recent Advances in Equine Theriogenology. International Veterinary Information Service. Disponível na Internet <http://www.ivis.org>.

VOGELSANG, S.G.;SORENSEN, A.M.;POTTER, G.D.;BURNS, S.J. &KRAEMER, M. D.C. 1979. **Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos.** J. Reprod. Fertil. 27:383-386.

YAMAMOTO, Y.;OGURI, N.;TSUTSUMI, Y.;HACHINOHE, Y. **Experiments in the freezing and storage of equine embryos.** J Reprod Fertil Suppl, n.32, p.399-405, 1982.

7. ANEXOS

ANEXO 1. Relatório da análise da silagem de milho da central

Data 02/04/2019 Sampled: 01/04/2019
Técnico GIOVANNA SANTESSO TAKAKURA
GIOVANNA S. TAKAKURA / 1 SM SILAGEM DE MILHO

Umidade 70,06
Matéria 29,94



Proteína	%MS	60d	4 anos
Proteína Bruta	8,10	7,58	7,90
Aminoácidos Totais	6,48	6,95	7,29
PS (% PB)	67,43	60,59	58,40
NH3-N equivalente	0,81	0,36	0,92
NH3-N, %PB	10,00	4,79	11,83
PIDN	0,86	0,54	0,59
PIDN, %PB	1,21	0,95	1,13
PIDA, %PB	10,65	7,25	7,65
Proteína Disponível	7,24	7,04	7,31
Nitrato-N			
Nitrato-N			

Aminoácidos

Lisina, %PB	2,55	2,91	2,88
Metionina, %PB	1,61	1,84	1,81
Histidina, %PB	1,88	2,15	2,12

Minerais

Cinzas	4,50	4,38	4,28
Cálcio	0,20	0,19	0,20
Fósforo	0,16	0,18	0,21
Magnésio	0,15	0,14	0,17
Potássio	0,94	0,95	0,99
Sódio			
Enxofre	0,10	0,09	0,10
Cloro			
Alumínio			
Boro			
Cobre			
Ferro			
Manganês			
Molibdnênio			
Zinco			

Carboidratos	%MS	60d	4 anos
FDA	30,70	25,70	26,67
aFDN	48,05	42,24	43,82
aFDNmo	46,71	40,82	42,32
Lignina	6,19	4,65	4,40
Amido	24,87	31,34	29,65

Açúcares (CSE)			
Açúcares (CSA)			
Glicose			
Frutose			
Sacarose			
Lactose			
Manitol			
Total Sugar			
Fibra Bruta			

Produtos de

pH	3,98	3,98	4,05
Ácido Láctico	3,01	3,01	3,82
Ácido Acético	2,97	1,70	1,85
Ácido Butírico	0,00		0,05
Ácido propiônico			
Succínico			
Fórmico			
Etol			
1,2 Propanediol			
1 Propanol			
2,3 Butanediol			
2 Butanol			
2 Propanol			
Ácidos Totais			
Álcool Totais			
Perdas por ferm.	4,77	2,85	3,20

Gordura	%MS	60d	4 anos
Extrato Etéreo	2,95	2,83	3,17
Ácidos graxos totais	1,70	1,62	1,71
Acid Hydrolysis			

%AG

Mirístico (C14:0)	0,46	0,47	0,51
Palmitico (C16:0)	14,48	15,12	14,90
Esteárico (C18:0)	2,28	2,09	2,05
Oleico (C18:1 c9)	21,29	20,77	20,04
Linoléico (C18:2 c9,12)	45,95	46,12	44,64
Linolênico (C18:3 c9,12,15)	1,30	6,25	7,37
RUFAL	68,53	73,15	72,06

Digestão dos Nutrientes, % do nutriente

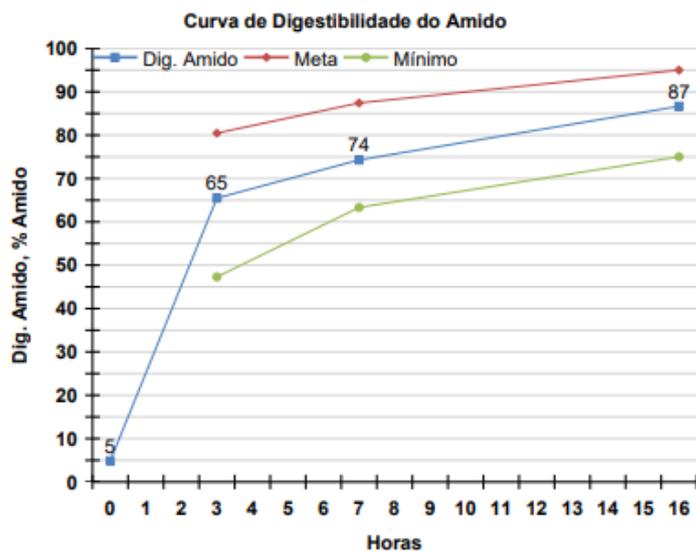
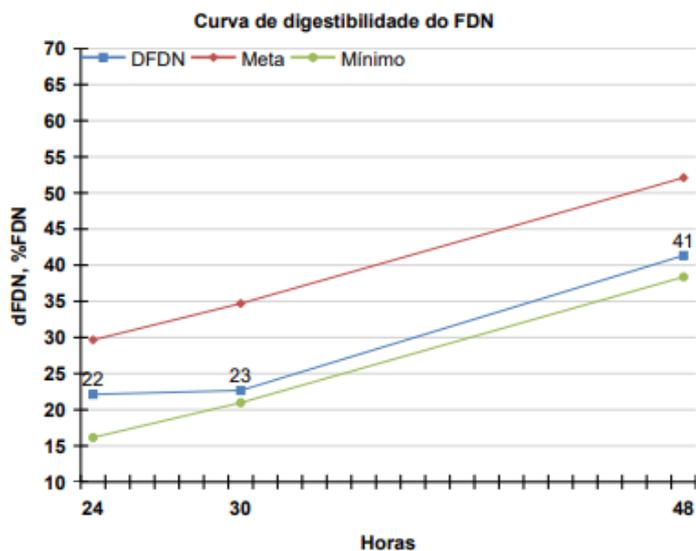
dFDNt 12h			
dFDNt 30h	44,06	53,51	50,33
dFDNt 48h	51,83	61,77	61,03
dFDNt 72h			
dFDNt 120h	52,56	64,24	62,09
dFDNt 240h	55,19	66,82	67,79
dFDNtmo 30h	48,02	56,81	53,64
dFDNtmo 120h	56,06	67,00	64,86
dFDNtmo 240h	58,55	69,46	70,38
dFDNp 24h	22,12	24,27	22,90
dFDNp 30h	22,66	29,59	27,83
dFDNp 48h	41,34	48,07	45,24
uFDN 30, %MS	26,88	19,71	21,89
uFDN 240, %MS	21,53	14,06	14,01
Dig. In situ do Amido 0h	4,87		
Dig. In situ do Amido 3h	65,47	61,86	63,88
Dig. In situ do Amido 7h	74,27	74,47	75,37
Dig. In Situ do Amido 16h	86,66	89,60	88,63
PNDR 16h in situ, %PB			
Dig. da PNDR, %PNDR			

Comprehensive Nutrition Analysis Report

Calcúlos	%MS	60d	4 anos
Kd do FDN, %/h	5,08	4,94	4,56
kd do Amido, %/h	18,74	19,52	20,67
RFV			
RFQ			
TTNDFD, % do FDN	35,14	41,29	39,20
Dig. Amido			
CNF	37,62	43,92	41,96
DCAD			
Sal			
RDP %CP			

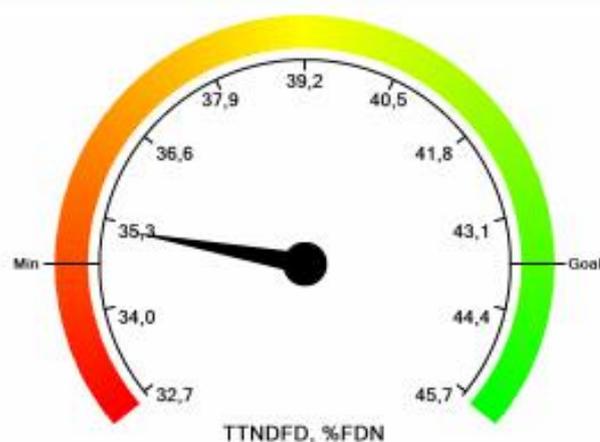
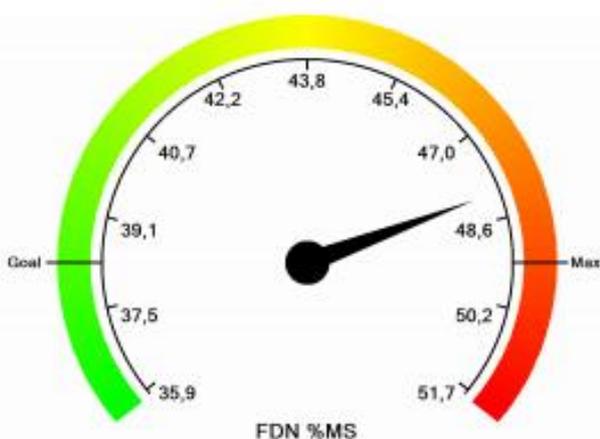
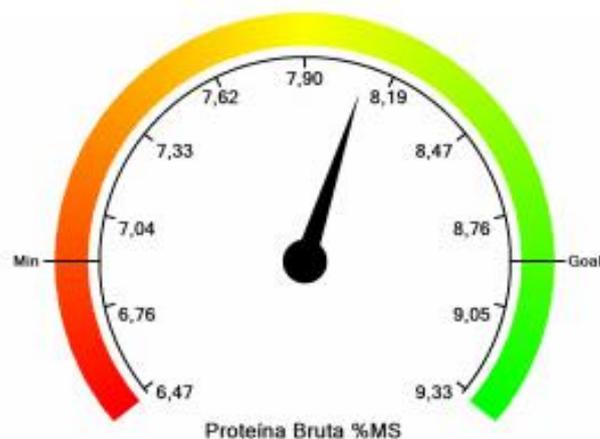
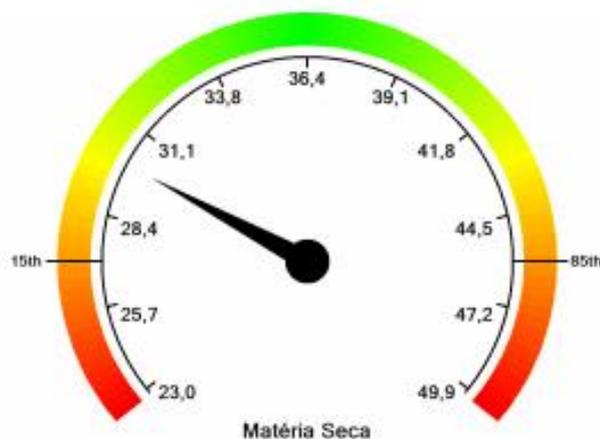
Calcúlos	NDT	EII	Elg	ELm
FDA (PA) NDT				
OARDC NDT				
NRC2001 NDT				
NDT, Milk2006	65,88	1,440	0,991	1,592
NRC2016 Beef				
Kg de leite/Ton MS	1470			

Anti-Nutrientes
Fungo
Leveduras
Vomitoxina
Aflatoxina
Zearalenona
Fumonisina
T-2
Ocratoxina-A
<i>Clostridium perfringens</i>
Enterobacteria



Relatório de Análise de Alimento Visual

Lab # 6243707 01/04/2019
Amostra SM SILAGEM DE MILHO
Fazenda GIOVANNA S. TAKAKURA
Técnico GIOVANNA SANTESSO TAKAKURA



O Objetivo corresponde ao percentil 85 e o Mínimo corresponde ao percentil 15.