



**GUSTAVO VASCONCELO BARROS**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO JUNTO AO  
MÉDICO VETERINÁRIO ARMANDO MARTINS COTA  
NA CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA CRIOHORSE**

**LAVRAS – MG**

**2019**

**GUSTAVO VASCONCELO BARROS**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO JUNTO AO MÉDICO VETERINÁRIO  
ARMANDO MARTINS COTA NA CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA  
CRIOHORSE**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Medicina Veterinária para a obtenção do título de Bacharel.

Professor Phd José Camisão de Souza

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2019**

**GUSTAVO VASCONCELO BARROS**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO JUNTO AO MÉDICO VETERINÁRIO  
ARMANDO MARTINS COTA NA CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA  
CRIOHORSE**

Relatório de estagio supervisionado  
apresentado à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do curso  
de Medicina Veterinária para a obtenção do  
título de Bacharel.

APROVADO EM 02 de Dezembro de 2019

Médica Veterinária Tassia Louregiani Carvalho Pinto, Doutora em Ciências  
Veterinárias - UFLA.

Médico Veterinário Marcelo Siqueira El Azzi, Doutorando em Reprodução Animal –  
UFLA.

Professor José Camisão de Souza, PhD

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2019**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adna e Ulisses, que sonharam este sonho comigo, dedico.

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder saúde e bênçãos por estar hoje contemplando meus sonhos.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços por mim e que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e comemoraram nos momentos de glórias, sem eles não seria nada. Obrigado pelos conselhos, pelo colo carinhoso nos momentos difíceis, pelos sermões em momentos de deslize. Obrigado por tudo.

Ao meu irmão Leonardo que me apoiou e foi exemplo, meus avos Benedito, Santos e Maria da Conceição (in memoriam), e minha avó Ana, que são exemplos de sabedoria. Aos meus tios, tias, primos e primas, que sempre estão ao meu lado. A minha namorada que seguiu firme e forte ao meu lado por todos esses anos, sempre me apoiando e dando forças para vencer essa etapa.

Ao meu orientador, Professor Jose Camisão, que me encantou pela seriedade e dedicação ao que faz, por quem tenho muito respeito e orgulho dos anos que trabalhamos juntos. Fonte de inspiração pessoal e profissional.

Ao Gere, pelos anos que pude acompanhar o grupo e que me proporcionou inúmeras experiências profissionais e pessoais, agregando e muito minha trajetória acadêmica. Aos amigos de Lavras, Vet. Amigos e Necidi (especialmente ao Felipe Dias) que sempre foram companheiros nos momentos de farra e de provas.

Ao meu supervisor de estágio Armando, obrigado pela experiência e ensinamentos.

## **RESUMO**

Este trabalho relata detalhadamente as atividades realizadas durante a Disciplina PRG - 107 (Estágio Supervisionado) do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. A parte prática foi executada junto ao Médico Veterinário Armando na Central de Reprodução equina CRIOHORSE, e a parte teórica é destinada à elaboração do presente trabalho. Esta experiência foi extremamente enriquecedora no que se refere às biotecnologias da reprodução equina, sendo incontestável a consolidação dos conceitos teóricos das biotecnologias da reprodução equina. Além das habilidades técnicas aperfeiçoadas, também foi intenso o acompanhamento em diversas situações a campo onde cada local trabalhado tem um aspecto diferente, com pessoas diferentes e animais diferentes, podendo assim aperfeiçoar também o senso crítico profissional.

**Palavras-chave:** Biotecnologia; Equino; Garanhão; Inseminação; Reprodução.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Galpão com baias em alvenaria para acomodação de garanhões e animais de competição.....	14
Figura 2: Vista panorâmica de piquetes de Mombaça.....	14
Figura 3: Vista do piquete maternidade.....	15
Figura 4: Autoclave utilizada para esterilização de sonda uterina.....	16
Figura 5: Graus de edema apresentados em éguas não gestantes, classificados de 0 a 4.....	18
Figura 6: Imagem ultrassonográfica apresentando líquido intrauterino grau 2.....	19
Figura 7: Imagem de folículo pré-ovulatório.....	20
Figura 8: Égua doadora contida e higienizada adequadamente.....	21
Figura 9: demonstração de inseminação artificial com uso de sêmen congelado.....	21
Figura 10: Desenho esquemático mostrando os dias de ovulação da receptora em relação à doadora de embrião equino.....	22
Figura 11: Desenho esquemático dos protocolos para receptoras em anestro.....	23
Figura 12: Gráfico demonstrando valores médios de motilidade, motilidade progressiva, velocidade da trajetória, velocidade curvilínea, e sobrevida dos espermatozoides após 24 horas de resfriamento em pênis que foi lavado ou não.....	24
Figura 13: Demonstração de lavagem de pênis equino.....	25
Figura 14: Égua manequim devidamente contida.....	26
Figura 15: Coleta de sêmen via vagina artificial.....	27
Figura 16: Coleta de sêmen em estação.....	28
Figura 17: Modelo de relatório devidamente preenchido para envio de sêmen resfriado.....	29
Figura 18: Lavagem uterina de égua doadora com Soro Ringer Lactato.....	31
Figura 19: Filtro coletor de embrião, com um embrião de aproximadamente 9 dias.....	31
Figura 20: Mesa aquecedora com materiais aquecido para momento da TE (paletas de 0,5ml; placa de Petri; placa com 5 poços; meio de lavagem de embrião BotuEmbri)......	34
Figura 21: Momento em que o embrião é aspirado.....	34

Figura 22: Desenho esquemático da janela de transferência da receptora em relação ao dia da ovulação da doadora.....	34
Figura23: Imagem ultrassonográfica com vesícula embrionária de aproximadamente 14 dias.....	35
Figura 24: Calendário sanitário anual equino.....	36
Figura 25: Vacinas utilizadas contra doenças que causam aborto.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.....	32
Tabela 2 – Eficiência dos lavados uterinos nos meses trabalhados .....	37
Tabela 3 – Eficiência das inseminações artificiais com diferentes tipos de armazenamentos de sêmen.....	38



## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°	Grau
°C	Graus Celsius
µg	micrograma
10 <sup>6</sup>	Dez elevado a sexta potência = 1.000.000
CH	Corpo hemorrágico
CL	Corpo lúteo
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IETS	International Society of Embryo Transfer
IGF-1	Insulin-like growth factor - 1
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
LA	Longa ação
LH	Hormônio luteinizante
MG	Minas Gerais
Micras	Plural de micrômetro

mL.....Mililitro  
mm.....Milímetro  
ng.....Nanograma  
P4.....Progesterona  
PGF2 $\alpha$ .....Prostaglandina F2 Alfa  
PV.....Peso Vivo  
R\$.....Reais  
RS.....Rio Grande do Sul  
SP.....São Paulo  
TE.....Transferência de embrião  
UI.....Unidades internacionais

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 Objetivo geral .....	12
1.1.2 Objetivos Específicos .....	12
<b>2. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO</b> .....	<b>13</b>
<b>3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Manejo das doadoras</b> .....	<b>17</b>
3.2 Manejo das receptoras .....	22
3.3 Coleta e manipulação de sêmen .....	23
3.4 Coleta de embriões .....	29
3.5 Resultados obtidos durante período de estágio .....	37
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>39</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>40</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

O estágio supervisionado corresponde à disciplina PRG - 107 da grade curricular do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, cuja carga horária são 28 créditos divididos em 408 horas práticas e 68 horas teóricas, estas últimas com o objetivo de elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) sob a orientação de um docente.

O estágio supervisionado do Curso de Medicina Veterinária da UFLA configura-se como atividade de treinamento e qualificação profissional, que visa complementar o ensino teórico-prático, proporcionando formação eclética e/ou conduzindo o estagiário para um direcionamento profissional em áreas da Medicina Veterinária ou afins.

A Central de Reprodução Equina CRIOHORSE, foi o local escolhido para realização do estágio supervisionado por ser referência na reprodução equina da região do leste de Minas Gerais. A orientação da atividade foi feita pelo professor Jose Camisão de Souza, e a supervisão ficou a cargo do Médico Veterinário Especialista Armando Cota. O estágio foi realizado no período de 01 de Setembro de 2019 a 15 de Novembro de 2019, totalizando 440 horas.

A finalidade do presente trabalho é descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado, realizado na CRIOHORSE, localizada no município de São Jose do Goiabal. O relato inclui a descrição física e operacional do estabelecimento.

### **1.1 Objetivo geral**

Aperfeiçoar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante o curso de Medicina Veterinária, sobretudo biotecnologias da reprodução equina, bem como vivenciar novas experiências relacionadas à área.

#### **1.1.2 Objetivos Específicos**

Detalhar a rotina de funcionamento de uma central de reprodução equina, assim como as biotecnologias utilizadas nos animais ali alojados e aperfeiçoamento prático das técnicas utilizadas.

## 2. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado foi realizado sob supervisão do Médico Veterinário Armando Martins Teixeira Cota, especialista em reprodução equina, no período de 01 de setembro a 15 de novembro de 2019. As atividades exercidas durante o estágio foram: manejo reprodutivo de éguas doadoras e de receptoras por meio de palpação e/ou ultrassonografia transretal, sincronização entre estas éguas, coletas e manipulação de sêmen e posteriores inseminações artificiais com sêmen fresco, resfriado ou congelado. Também foram executadas coletas e transferências de embriões. Essas atividades foram realizadas na Central de transferência de embriões equino Criohorse, anexa ao haras Mare Mansa, no município de São Jose do Goiabal – MG.

A Criohorse é de responsabilidade técnica do Médico Veterinário Armando Martins Teixeira Cota, especialista em reprodução equina pelo Ibevet – Instituto Brasileiro de Veterinária, e fica localizada na zona rural do município de São Jose do Goiabal, Minas Gerais. A central conta com duas propriedades, uma exclusiva para animais em competição, garanhões, doadoras e animais para comercialização, e uma segunda propriedade para as éguas gestantes, éguas lactantes, potros desmamados até o início de doma, receptoras e matrizes não gestantes. As duas propriedades somadas contam com uma área total de aproximadamente cem hectares. Na sede do haras, onde se encontra a central, a área é composta por um galpão com 20 baias fechadas (figura 1), onde são alojados animais em competição e garanhões, piquetes de Mombaça (*Megathyrus maximus*) onde os animais passam parte do dia soltos e é onde as doadoras que não estão em competição são alojadas (figura 2), uma pista de treinamento para animais atletas e uma piscina para auxílio na preparação dos animais, além de uma área de capineira destinada para fornecimento picada no cocho para os animais de baia.

Na segunda propriedade, a estrutura física é composta por um curral de manejo, um tronco de contenção individual, e uma grande área de pastagens divididas em piquetes de Mombaça, onde um piquete é destinado para maternidade, pois ele conta com uma boa área de baixada, com sombreamento e é em frente à casa do colaborador responsável pela propriedade (figura 3), facilitando a visão e os devidos cuidados o mais rápido possível.

Figura 1: Galpão com baias em alvenaria para acomodação de garanhões e animais de competição



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Figura 2: Vista panorâmica de piquetes de Mombaça



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Figura 3: Vista do piquete maternidade



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

A central Criohorse possui um laboratório para armazenamento de fármacos e materiais para o manuseio de sêmen e embriões. O laboratório é composto por uma autoclave (Idealclave) para esterilização das sondas de silicone para lavagem uterina (figura 4), uma estufa de esterilização universal, um microscópio binocular de bancada, uma mesa aquecedora, um aparelho de banho maria, uma lupa para rastrear, avaliar e classificar embriões, uma geladeira para armazenamento de fármacos, vacinas e gelo reciclável. Além disso, no laboratório também se armazenava os demais materiais para coleta e transferência de embrião como, pipetas para IA e TE, paletas de 0,5ml para manipulação de embrião, placas de Petri, filtros para coleta de embrião, diluentes de sêmen, agulhas e seringas e uma vagina artificial modelo Botucatu.

Figura 4: Autoclave utilizada para esterilização de sonda uterina



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Atualmente, a central conta com um plantel de Cento e trinta e um (131) animais, dentre os quais 20 éguas doadoras de embrião, 40 matrizes e 6 garanhões da raça Mangalarga Marchador, além de 65 receptoras sem raça definida.

A alimentação e o manejo dos animais na estação chuvosa (primavera e verão) são feitos da seguinte maneira: os garanhões ficam parte do dia no piquete e outra parte nas baias e recebem ração concentrada na porção de 1,5% do peso vivo (PV) de fabricação própria, dividida em três refeições diárias, além de óleo de soja (0,7mL/kg PV) e suplemento vitamínico, mineral e aminoácido para equinos (Botumix Garanhão®, Botupharma). O volumoso, a água e o sal mineral são fornecidos *ad libitum*. As éguas doadoras ficam separadas em um lote que recebe ração concentrada duas vezes ao dia, em lanchonetes que ficam nos próprios piquetes. As matrizes, as receptoras e os potros são divididos por lotes em piquetes com água e sal mineral à vontade. Na estação seca (outono e inverno), quando as pastagens estão escassas, o manejo é mantido da mesma forma, entretanto a alimentação volumosa é feita com silagem de milho produzida e armazenada na propriedade.



### 3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

#### 3.1 Manejo das doadoras

As doadoras eram palpadas em tronco de contenção individual próprio para equinos em dias alternados, segunda, quarta e sexta-feira e sua dinâmica de crescimento folicular acompanhada via ultrassonografia transretal, com auxílio de um ultrassom portátil modelo Aloka SD500. Quando detectada, via ultrassonografia, a presença de um folículo dominante, são realizadas duas medições perpendiculares no mesmo e quando a média delas for igual ou maior a 35 mm de diâmetro, simultaneamente com edema uterino classificado em 2 ou 3 em uma escala de 1 a 5 (figura 5), as doadoras são induzidas a ovular.

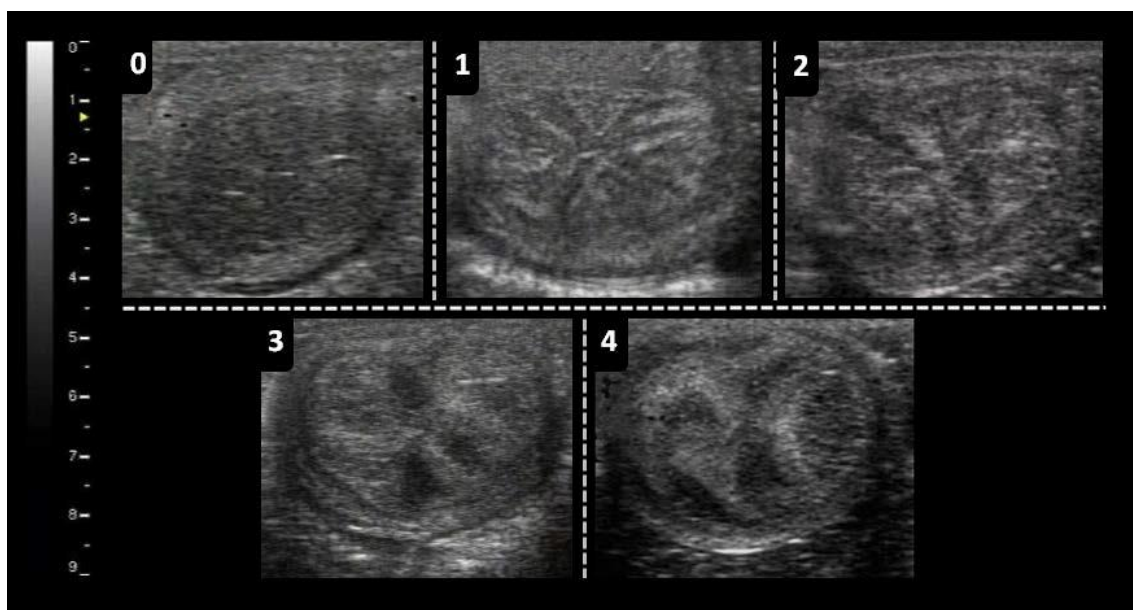
Os principais agentes indutores de ovulação utilizados são: hCG (Chorulon® 5000 UI. Intervert) na dose de 1000 unidades internacionais (UI), intravenoso (IV) ou Acetato de Deslorelina (Strelin® - Histrelina Acetato 250 µg), na dose de 750 a 1000 µg intramuscular (IM) por animal. Tanto a deslorelina quanto o hCG podem ser utilizados simultaneamente. A escolha de qual indutor a ser usado depende do desenvolvimento folicular e edema uterino apresentado pela égua, ou seja, se a égua apresenta folículo dominante, mas sem características de pré-ovulatório (descrito em seguida) e edema uterino classificado em 3, é recomendada o uso somente de Deslorelina, e o período até a ovulação dura  $36 \pm 12$  horas.

A amplitude do intervalo entre administração e ovulação pode estar relacionada à variação individual na responsividade do folículo ao Hormônio Luteinizante (LH) e presença de folículos com diâmetros compatíveis com a indução da ovulação (Samper, 1997). Já se o folículo apresentar tamanho médio igual a 33mm e edema uterino superior a 3 pode ser utilizada a associação entre o hCG e a Deslorelina e o período até ovulação dura  $36 \pm 12$  horas. No dia seguinte à indução da ovulação, as éguas são avaliadas para identificar a presença de folículo pré-ovulatório e redução do edema uterino, e em caso positivo são inseminadas. Mesmo depois de inseminadas, as éguas são novamente avaliadas após um dia para confirmar a ovulação. Esse manejo é realizado quando é utilizado sêmen fresco ou refrigerado. Já quando a inseminação é realizada com sêmen congelado, o acompanhamento do crescimento folicular aumenta após 36 horas de indução da ovulação, e se torna a cada 4 horas até a confirmação da ovulação.

A diferença no manejo se dá pelo fato de hoje se preconizar realizar a IA utilizando sêmen congelado após ovulação, depositando o sêmen na ponta do corno ipsilateral ao ovário que continha o folículo ovulatório, pela sua baixa sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea, aumentando assim a taxa de sucesso do procedimento.

Outros fármacos também são utilizados no favorecimento da reprodução, podemos destacar a prostaglandina (Lutalyse® - Zoetis), que promove a lise do corpo lúteo e faz com que a doadora volte a apresentar estro com menor espaço de tempo, acelerando o processo e aumentando a quantidade de embriões a serem coletados por doadora. A ocitocina (Placentex® - Agener), que promove contrações uterinas e consequente expulsão de líquidos indesejáveis (figura 6) que ali estejam, devido a falhas do sistema imune da égua e que pode ser prejudicial à fertilidade e a saúde uterina do animal.

Figura 5: Graus de edema apresentados em éguas não gestantes, classificados de 0 a 4.



Fonte: Adaptado de Canesin (2013).

Figura 6: Imagem ultrassonográfica apresentando líquido intrauterino grau 2.

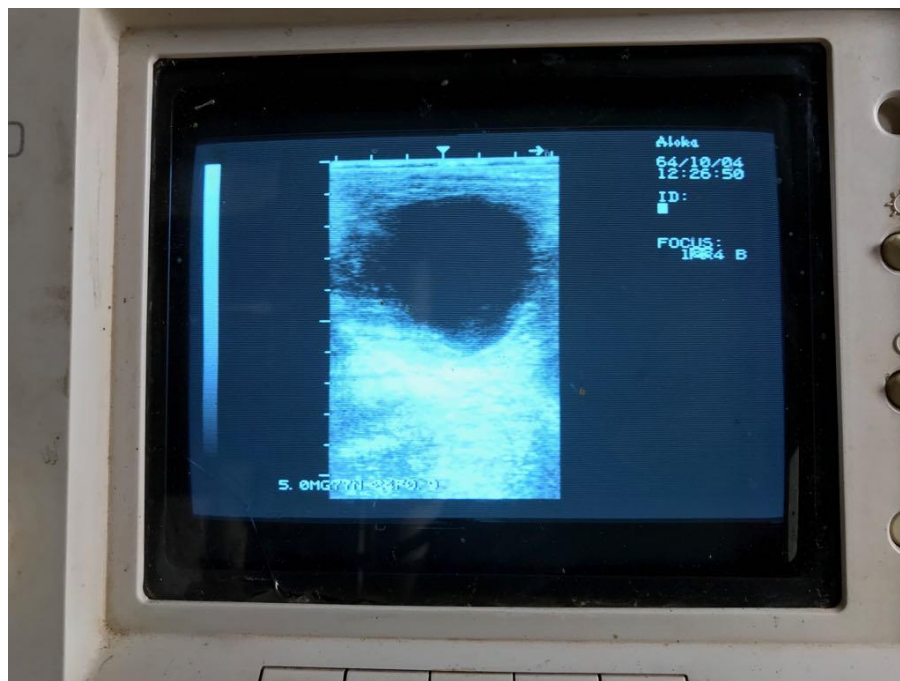


Fonte: Arquivo pessoal, 2019.

A condição de folículo pré-ovulatório (figura 7) é confirmada pela presença da fossa de ovulação observada por meio do exame de ultrassom, pela irregularidade da parede do mesmo, consistência flácida à palpação retal ('flutuante') e sinais de dor demonstrados pela égua quando o mesmo é manipulado (olhar para o flanco, contração abdominal, inquietação, levantamento de algum dos membros). Quando o folículo pré-ovulatório é detectado, a égua é contida adequadamente em um tronco, sua cauda é

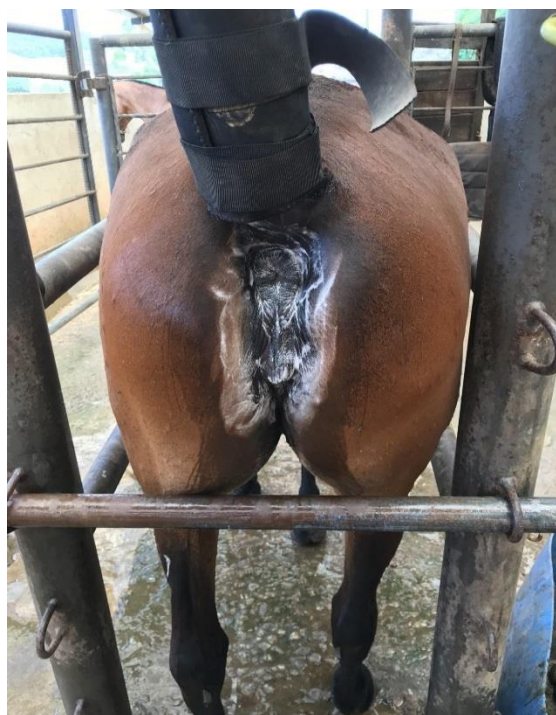
amarrada e enfaixada, a vulva e períneo são higienizados com água e sabão neutro (figura 8) e posteriormente secada com toalha de papel.

Figura 7: Imagem de folículo pré-ovulatório.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Figura 8: Égua doadora contida e higienizada adequadamente



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

A rotina de inseminações na Criohorse é predominantemente realizada com sêmen resfriado, vindo de outros haras ou centrais de garanhões, mas também são realizadas IA com sêmen fresco de garanhões presentes na central e também com sêmen congelado (figura 9), esse último em menor proporção. Quando se utiliza sêmen fresco ou resfriado, o mesmo é depositado no corpo do útero em um volume de 15 a 20mL, com auxílio de pipeta rígida para inseminação artificial em éguas (Provar, São Paulo, SP). É recomendado que a IA seja realizada nas 24 horas antecedentes à ovulação. Quando o sêmen utilizado é congelado, são utilizadas quatro paletas de 0,5mL que são descongeladas de 36 a 37°C por, no mínimo, 20 segundos. O sêmen é avaliado no microscópio e deve apresentar um mínimo de 40% de motilidade e vigor entre 2 ou 3 em uma escala de 1 a 5. Segundo Samper (1999), não existe uma dose padrão para o sêmen congelado, a fertilidade diminui quando o número total de espermatozoides com motilidade progressiva é inferior a  $250 \times 10^6$  por dose sendo, portanto, recomendados valores superiores a esta concentração espermática. A IA com sêmen congelado é realizada com pipeta flexível e as paletas são introduzidas com auxílio de um mandril também flexível próprio para o a pipeta equina. É introduzida paleta por paleta quando a pipeta já estiver no ponto desejado pelo Médico Veterinário que esteja realizando o procedimento.

Figura 9: Demonstração de inseminação artificial com uso de sêmen congelado.

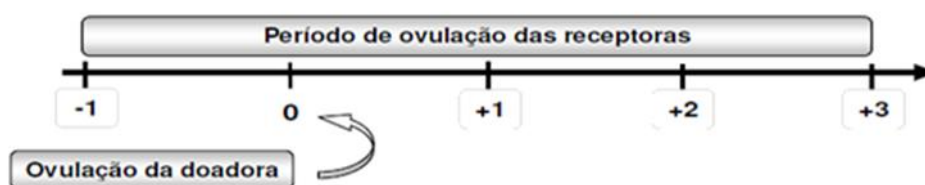


### 3.2 Manejo das receptoras

O acompanhamento do desenvolvimento folicular das éguas receptoras também é feito via ultrassonografia transretal e também era realizado em dias alternados da semana, terça e quinta-feira e aos sábados. Assim como nas doadoras, quando uma receptora apresenta estro, ela é acompanhada quanto ao diâmetro do folículo dominante e edema uterino. Na ocorrência de folículos maiores que 35x35mm, é feita a indução da ovulação com protocolos descritos anteriormente. Normalmente, a ovulação ocorre de 24 a 48 horas após a indução da ovulação, com média de  $36 \pm 12$  horas. O manejo realizado com as receptoras era a indução de ovulação de um a dois dias após a ovulação da doadora (figura 10).

A escolha da receptora para receber o embrião é baseada principalmente na morfoecogenicidade do corpo lúteo (CL), no tônus uterino e característica do cérvix. A égua deve apresentar CL com boa morfoecogenicidade, como sugerido por Martinez Nunez (2014), o útero firme, caracterizando tônus 3, sentido pela palpação transretal e cérvix bem fechada. Outro fator imprescindível para a escolha de uma boa receptora, é sua condição de escore corporal, que na escala de 1 a 5, deve estar em 3, como proposto por Alonso, M.A (2005).

Figura 10: Desenho esquemático mostrando os dias de ovulação da receptora em relação a doadora de embrião equino

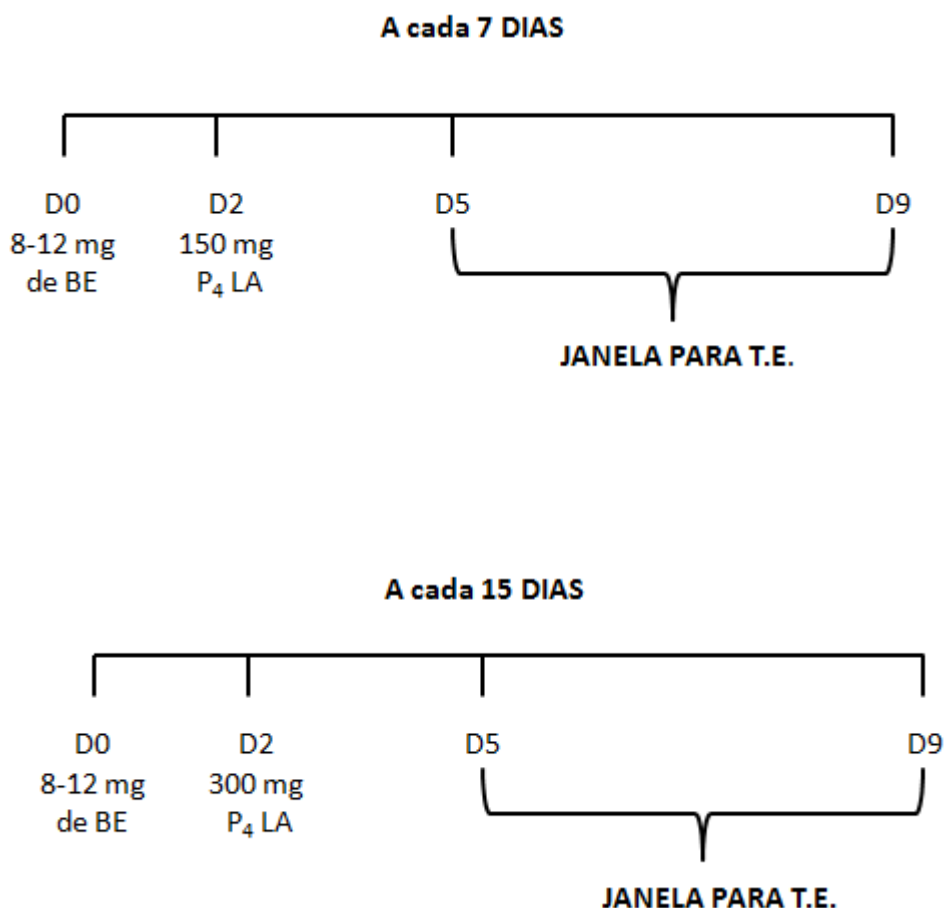


Fonte: Taveiros et al., (2008)

Quando não há receptoras cíclicas sincronizadas, receptoras em anestro podem ser utilizadas desde que protocoladas com progesterona de longa ação (P4 LA – Solução Manufaturada, FG Veterinária®, Sorocaba, SP). Os protocolos utilizados consistem em aplicações do hormônio a cada sete ou quinze dias, dependendo da concentração da progesterona utilizada (figura 11). As receptoras protocoladas devem receber de 8 a 12mg de Benzoato de Estradiol no dia da ovulação da doadora, 150mg de progesterona de longa ação dois dias depois quando o protocolo escolhido for o de aplicação de P4 a cada 7 dias e caso a receptora confirme o embrião, pode ser utilizado aplicação de 300mg do hormônio a cada 15 dias. Em ambos os

casos, a janela para transferência de embrião para a receptora é de 5 a 9 dias após o início do protocolo (BRADECAMP, 2007). Uma grande desvantagem da utilização de P4, é o bloqueio fisiológico que tal hormônio provoca no ciclo estral da égua, deixando-a inapta à reprodução por aproximadamente 60 dias após a aplicação.

Figura 11: Desenho esquemático dos protocolos para receptoras em anestro



Fonte: Cortesia Médico Veterinário Armando Cota

### 3.3 Coleta e manipulação de sêmen

Atualmente, antes da coleta de sêmen em si, é imprescindível realizar uma boa higienização do pênis do garanhão com água morna, em aproximadamente 35°C, por toda extremidade do pênis, desde a base do pênis até o prepúcio (figura 13). Após a lavagem e higienização completa do pênis, é realizado a secagem com papel toalha, prestando sempre

atenção para não deixar vestígios de papel no pênis. Esse simples procedimento, evita que bactérias presentes na flora normal do pênis contamine o sêmen, diminuindo assim sua qualidade (figura 12), durabilidade e não predispõe a endometrites bacterianas nas éguas (C. Ramires 2 Neto et al. / Journal of Equine Veterinary Science xx (2015).

Figura 12: Gráfico demonstrando valores médios de motilidade, motilidade progressiva, velocidade da trajetória, velocidade curvilínea, e sobrevida dos espermatozoides após 24 horas de resfriamento em pênis que foi lavado ou não.

Mean values and standard deviations of total motility (TM), progressive motility (PM), velocity of trajectory (VAP), curvilinear velocity (VCL), rapid sperm (RAP) before (M0) and after (M24) cooling the semen of animals with (W) and without (NW) to wash penis before collection.

Groups	TM (%)	PM (%)	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	RAP (%)
W (M0)	85.2 $\pm$ 6.9	39.8 $\pm$ 5.3	123.3 $\pm$ 18.9	216.2 $\pm$ 21.6	74.8 $\pm$ 9.7
NW (M0)	75.0 $\pm$ 14.5	42.0 $\pm$ 15.1	116.4 $\pm$ 18.6	201.2 $\pm$ 22.5	65.6 $\pm$ 17.6
W (M24)	62.8 $\pm$ 15.2	29.4 $\pm$ 15.7	102.8 $\pm$ 21.3	194.7 $\pm$ 28.7	51.2 $\pm$ 22.2
NW (M24)	52.6 $\pm$ 28.3	20.4 $\pm$ 12.4	104.4 $\pm$ 22.6	193.8 $\pm$ 37.3	44.6 $\pm$ 28.4

Different letters indicate statistical difference between the groups at the same column ( $P < .05$ ). Same letters or absence of letters indicate no statistical difference.

Fonte: adaptado Neto et al (2015)



Figura 13: Demonstração de lavagem de pênis equino



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Para uma coleta segura e eficiente foram utilizadas éguas no estro, devidamente contidas (figura 14) para minimizar os riscos de lesões para os garanhões e para os profissionais, em local espaçoso e com solo coberto por areia ou grama. Para a coleta utiliza-se vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, SP). A vagina é revestida internamente por uma mucosa de látex e uma segunda mucosa plástica é colocada na qual são acoplados o filtro e o copo coletor de sêmen equino que impeça a penetração de raios solares e que de preferência, não deixe que a temperatura do sêmen caia naquele breve instante, provocando choque térmico. O tubo

rígido da vagina é preenchido com água aquecida de 42 a 47°C e com ar, para que fique com temperatura e pressão adequadas. Não é necessária utilização de gel lubrificante no interior da vagina artificial, pois o garanhão no momento da cópula libera líquido que naturalmente lubrifica a mucosa, sendo assim confortável para o animal.

Figura 14: Égua manequim devidamente contida



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

O garanhão é então levado até o local onde está a égua e após o cortejo (relinchar, cheirar e morder levemente a égua, reflexo de *Flehmen* e ereção completa ou não), é permitida a monta na égua. O pênis do garanhão é desviado para dentro da vagina artificial e o profissional que está realizando a coleta deve manter a vagina em uma posição que mimetize a posição em que o pênis estaria no vestíbulo vaginal da égua no momento da cópula (figura 15). Observados os sinais característicos da ejaculação (sapateamento, movimentos da cauda, relaxamento), associado à pulsação uretral sentida pelo veterinário na base do pênis do garanhão, a torneira da vagina artificial é aberta para saída da água e ar. Logo após a coleta, o sêmen é levado para o laboratório para avaliação e diluição. A primeira avaliação é feita a olho nu e são observados volume, cor, odor e densidade. Posteriormente o sêmen é diluído na proporção de 2:1, onde são

duas partes de diluente para uma parte de sêmen, para evitar aglutinação dos espermatozoides e para avaliação microscópica, na qual são observados motilidade e vigor; caso necessário, determina-se a concentração com auxílio de uma câmara de Neubauer. Os diluentes utilizados foram Botusemen e Botuturbo (Botupharma®), em temperatura de 37°C.

Figura 15: Coleta de sêmen via vagina artificial



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Outra forma de coleta de sêmen acompanhada durante o estágio foi à coleta em estação (figura 16), onde o garanhão não precisa realizar o salto em uma égua manequim. Esse tipo de coleta se realiza em garanhões que tem alguma patologia no sistema locomotor e não consegue realizar o salto ou então se manter sobre a égua por um período de tempo. Também pode se optar por tal método em garanhões que tem algum distúrbio de comportamento ou que são altamente

agressivos no momento da coleta, colocando em risco a si próprio, a égua manequim e às pessoas que o estão manipulando. Com isso, evitamos possíveis acidentes e mesmo assim, o garanhão não deixa de ser utilizado. Para o estímulo do animal, era apresentado uma égua a certa distância que com isso, o garanhão já expunha o pênis e era realizada a higienização e coleta em um tronco de contenção. Para tal procedimento, é necessário um condicionamento prévio do garanhão, com coletas sucessivas até a percepção do mesmo para a situação. Já no caso apresentado, o animal por ter libido muito alto, seu condicionamento ocorreu de forma rápida e fácil, evitando assim transtornos futuros.

Figura 16: Coleta de sêmen em estação



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

O sêmen destinado para o resfriamento e transporte é colocado em recipiente plástico graduado (Botu-IA®, Botupharma, Botucatu-SP), ou em saco plástico resistente próprio para esta finalidade. Este frasco deve estar devidamente identificado com nome do garanhão, volume, motilidade e vigor do sêmen, além do nome do responsável pela coleta e colocado em caixa própria de transporte de sêmen, juntamente com gelo eutético, na temperatura de 5 ou 15°C, de acordo com a decisão do Médico Veterinário responsável pelo envio do sêmen.

Figura 17: Modelo de relatório devidamente preenchido para envio de sêmen resfriado

**FAVARETTO CRIOVET**  
REPRODUÇÃO EQUINA

**RELATÓRIO DE ENVIO DE SÊMEN**

Nome do Garanhão: Faler da Lavani Reta

Data de envio: 16 / 10 / 2019

Hora da coleta: 08:00

Motilidade Total: 80 %.

Motilidade progressiva: - %.

Vigor 3 (0 - 5).

Concentração: 50 x 10<sup>6</sup> milhões de spz/ml

Volume: 17 mL.

Dose inseminante: 850 milhões de spz totais

Cliente: Luciano Tealino

OBS: Fonear dor retano de como chegou sêmen - OBG

Henrique Favaretto

Henrique Favaretto  
Médico Veterinário  
CRMV-MG: 15154  
Cel: (31) 9 9472 - 8475

Larissa Favaretto

Larissa Favaretto  
Médica Veterinária  
CRMV-MG: 17357  
Cel: (31) 9 9619 - 6537

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

### 3.4 Coleta de embriões

A técnica utilizada foi a transcervical não cirúrgica e todos os materiais que entram em contato com a genitália interna da égua e com o embrião eram esterilizados em autoclave e mantidos em estufa de 80 a 84°C. Os materiais necessários para a coleta de embrião são: sonda de silicone para coleta de embriões (Minitube®, Porto Alegre, RS), três frascos de 1L de solução Ringer-Lactato (Sanobiol®, Pouso Alegre, MG), uma seringa de 20mL para inflar o balonete da sonda, e um filtro de malha de 75micras. Após utilizados, os materiais são lavados com água corrente e depois imersos em solução de água e detergente enzimático Riozyme Eco (Rioquímica) por no máximo cinco minutos a temperatura de 42°C, que tem alto poder germicida e não deixa

resíduos nos materiais após a secagem. A sonda é então embalada em papel próprio para esterilização (HospFlex, Sorocaba, SP) e autoclavada a 121°C por 15 minutos e depois levada para estufa para secagem; as placas de Petri e o filtro de coleta de embriões também são lavados na mesma solução da sonda e depois levados para estufa de esterilização e secagem.

Para a coleta de embrião inicialmente coloca-se a égua doadora em um tronco de contenção, amarrando e enfaixando sua cauda (figura 18). A vulva e períneo são lavados com sabão neutro e água e secados com papel toalha. Com a égua devidamente contida e higienizada, é introduzida via vaginal a sonda (figura 19), que passa pelo cérvix até o corpo do útero. Neste momento o balonete é inflado com 30 a 45mL de ar e a sonda é caudalmente tracionada contra o óstio cranial do cérvix, para evitar refluxo do líquido. A solução Ringer-Lactato é infundida via sonda, até preencher o corpo e os cornos uterinos. Com o útero completamente preenchido, o líquido é drenado passando pelo filtro (figura). Após o término da última lavagem, o balonete é esvaziado e a sonda retirada. O filtro deve conter, no mínimo, 20mL da solução para evitar desidratação do embrião. O conteúdo do filtro é lavado com ringer- lactato para que fique mais límpido e em seguida, é depositado em placas de Petri para o rastreamento das estruturas em lupa de aumento (Oleman). Posteriormente à coleta, as doadoras recebem 1mL de Dinoprost Trometamina (Lutalyse®, Zoetis), equivalente a 5mg de dinoprost, via intramuscular, para que ocorra indução da luteólise e elas retornem mais rapidamente ao estro.

Figura 18: Lavagem uterina de égua doadora com Soro Ringer Lactato



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Figura 19: Filtro coletor de embrião, com um embrião de aproximadamente 9 dias



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

O embrião é avaliado quanto ao seu estágio de desenvolvimento e qualidade. Esta avaliação é relativamente simples. Quanto ao estágio de desenvolvimento, a classificação é feita basicamente observando o aspecto morfológico do embrião, que pode ser coletado em fase de mórula, blastocisto inicial ou blastocisto expandido. Na classificação quanto à qualidade, é observado o formato, tamanho, cor e textura e é dada uma ‘nota’ perante o observado, de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 – Critérios de classificação do grau de qualidade de embriões equinos

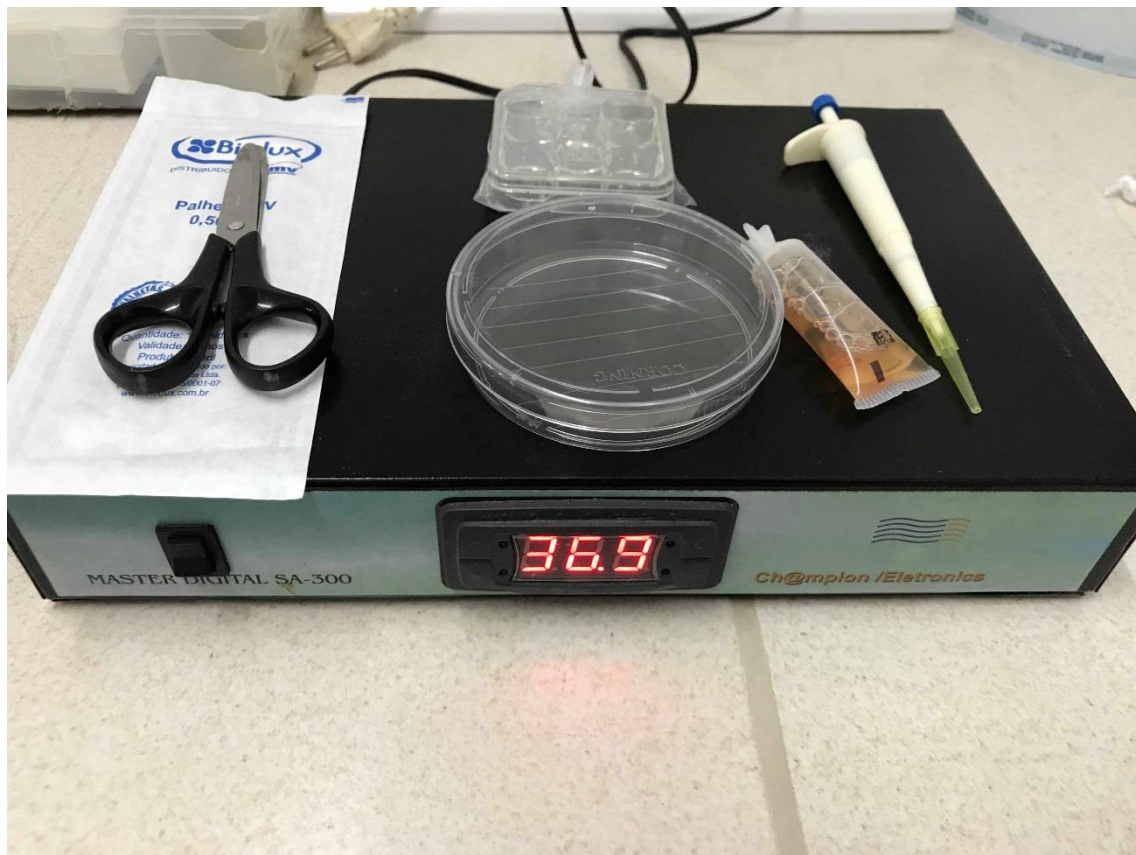
<b>Qualidade</b>	
<b>Grau 1</b>	<b>Excelente</b> – ideal, esférico, com tamanho, cor e textura uniformes
<b>Grau 2</b>	<b>Bom</b> – Pequenas imperfeições, forma irregular ou separação de trofoblasto
<b>Grau 3</b>	<b>Razoável</b> – Poucos problemas de blastocele, células degeneradas ou blastocele colapsada
<b>Grau 4</b>	<b>Ruim</b> – Blastocele colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária
<b>Grau 5</b>	<b>Degenerado</b> – Oócito não fertilizado ou embrião totalmente inviável

Fonte: Adaptado de McKinnon & Squires, 1998.

Após a avaliação, os embriões viáveis são manipulados com o auxílio de uma palheta de 0,25 ou 0,5mL e uma seringa de insulina (1mL). O embrião é transferido para uma placa de 5 poços e lavado em meio de cultivo (Holding Plus 0,4% BSA, Vitrocell, Embriolife) previamente aquecido de 32 a 37°C (figura 20). Em cada gota, o embrião é lavado de duas a três vezes por meio de movimentos de aspiração e expiração pela palheta para remover possíveis impurezas.



Figura 20: Mesa aquecedora com materiais aquecido para momento da TE (paletas de 0,5ml; placa de Petri; placa com 5 poços; meio de lavagem de embrião BotuEmbryo)



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

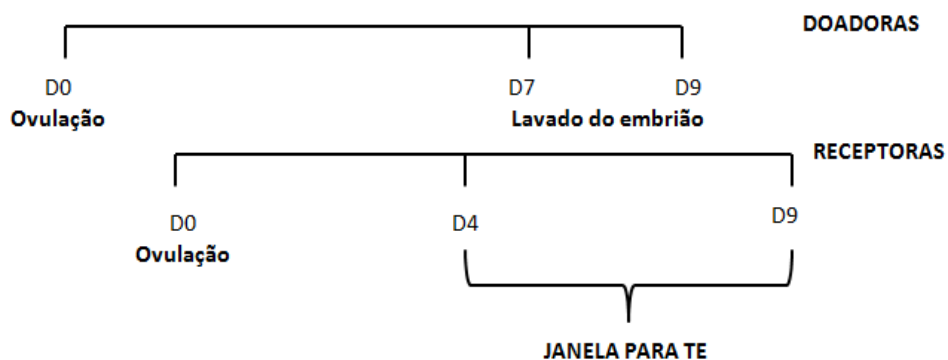
Quando a transferência é imediata, a receptora selecionada é colocada no tronco de contenção sendo devidamente higienizada. Sua cauda é amarrada e enfaixada e em seguida sua vulva e períneo são lavados com água e sabão neutro e secados com toalha de papel. O embrião é aspirado do meio para uma pipeta rígida de inseminação artificial em éguas (figura 21), obedecendo a seguinte ordem: uma coluna de meio, uma coluna de ar, uma segunda coluna de meio contendo o embrião, outra coluna de ar e uma última coluna de meio. A pipeta é protegida por uma camisa sanitária para evitar possíveis contaminações da vagina e quando atinge o terço médio do cérvix, a camisa sanitária é rompida e o conteúdo da pipeta é depositado no corpo do útero.

Figura 21: Momento em que o embrião é aspirado



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Figura 22: Desenho esquemático da janela de transferência da receptora da doadora em relação ao dia da ovulação da doadora

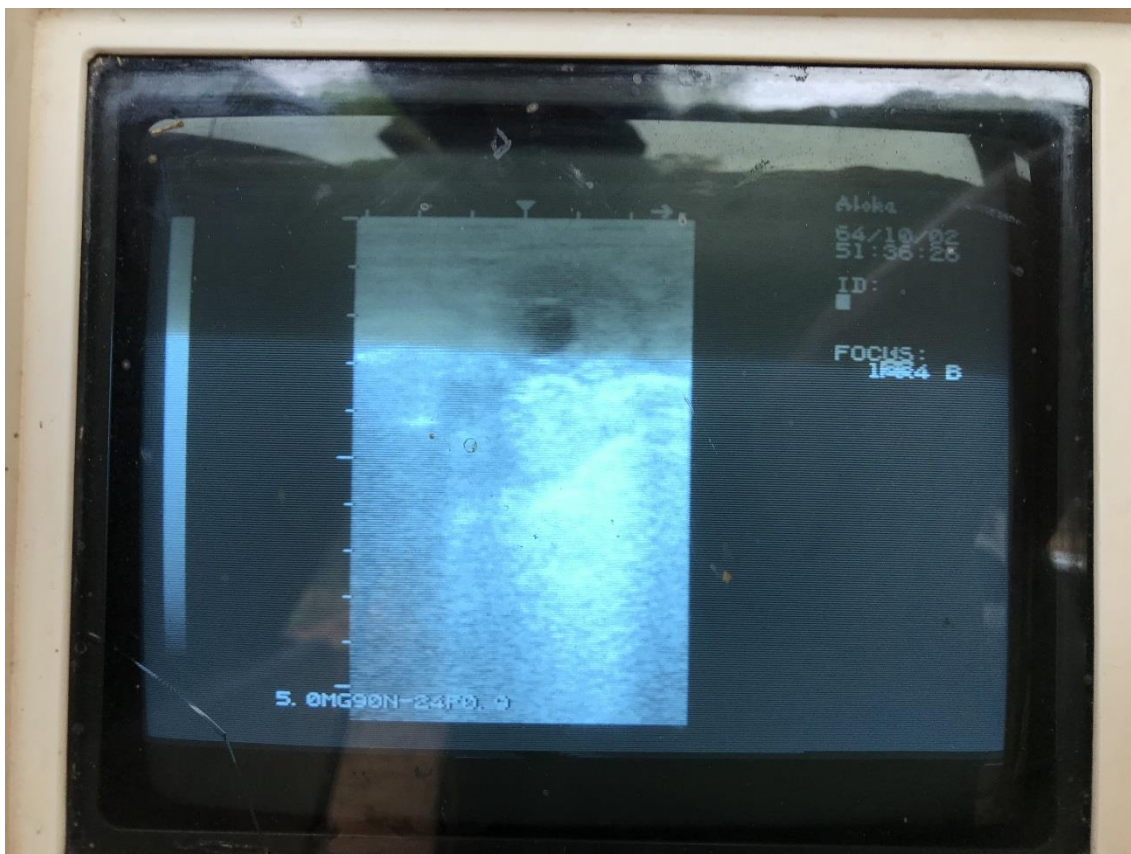


Fonte: Adaptado de Maciel (2014)

Caso a receptora não esteja no local e conseqüentemente não seja possível a transferência imediata, o embrião pode ser colocado em um tubo criogênico e ser transportado para outro local, desde que seja protegido de luz, umidade e variações de temperatura. Segundo Alvarenga (2010), o embrião equino permanece viável em meio de cultivo por até 72 horas, sendo necessária a troca do meio a cada 24 horas.

No décimo segundo dia de vida do embrião, realiza-se a ultrassonografia para confirmação da gestação na receptora (figura 23), sendo novamente avaliado no 30 ° e 60 ° dias de gestação e assim a receptora é entregue ao proprietário.

Figura 23: Imagem ultrassonográfica com vesícula embrionária de aproximadamente 14 dias



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Um ponto fundamental para que um programa de transferência de embrião seja bem sucedido, é a implementação de um calendário sanitário (figura 24) em todos os animais presentes na propriedade, especificando cada grupo de animais destinados a qual função (reprodução, esporte, trabalho, exposições) e assim, montando um calendário próprio que assegure aquele grupo de certas doenças que possam acometê-los. Destacando para animais em reprodução, a imunização contra Lesptospirose e Aborto equino a vírus (Herpesvirus, figura 25), que são doenças que causam abortos nos equinos, gerando assim grandes prejuízos.

Figura 24: Calendário sanitário anual equino

DOENÇA	1A. DOSE (idade)	REFORÇO	FREQÜÊNCIA
Influenza	5 meses	após 30 dias	Anual
Encefalomielite	6 meses	após 07 dias	Anual
Leptospirose	6 meses	após 15 dias	Anual
Tétano	6 meses	após 30 dias	Anual
Raiva	6 meses	././././.	Anual
Aborto eqüino a vírus / Rinopneumonite (herpesvírus)	6 meses	após 30 dias	Éguas prenhes: 5º, 7º e 9º meses de gestação; Demais animais: Anualmente

Fonte: <http://equitacaoespecial.blogspot.com/2010/01/vacinacao-e-vermifugacao-de-equinos.html>

Figura 25: Vacinas utilizadas contra doenças que causam aborto



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

### 3.5 Resultados obtidos durante período de estágio

Durante o estágio, foram acompanhadas 60 inseminações artificiais, sendo 14 com sêmen fresco, 30 com sêmen resfriado e 16 com sêmen congelado, não sendo realizada monta natural. Do total das 60 inseminações, foram realizados 35 lavados uterinos de éguas doadoras, com 30 lavados positivos, resultando em 85,7% de recuperação embrionária (tabela 2). As demais inseminações foram realizadas em matrizes, com um índice de 92% de prenhez positiva, gerando um total de 23 prenhez (tabela 3). Dos 30 lavados positivos, foram confirmados 26 prenhez nas receptoras escolhidas, alcançando um índice de 86% de prenhez, dados estes que superam aos resultados obtidos por Fleury et al. (2001), que avaliaram os fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência trans-cervical em equinos da raça Mangalarga e obtiveram 61,1% de recuperação embrionária. Resultado estes possíveis através dos avanços em estudos e uso correto das biotecnologias da reprodução equina, assegurando assim melhores resultados dentro de um programa de transferência de embriões.

Tabela 2 - Número de lavagens de útero para coleta de embriões realizadas, quantidade de embriões recuperados nas lavagens, porcentagem de eficiência na recuperação de embriões, número receptoras com gestação confirmada e taxa de gestação.

	<b>Lavagens uterinas</b>	<b>Embriões recuperados</b>	<b>Eficiência (%)</b>	<b>Gestação confirmada</b>	<b>Taxa de gestação (%)</b>
<b>Setembro</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>87</b>	<b>6</b>	<b>85</b>
<b>Outubro</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>83</b>	<b>8</b>	<b>80</b>
<b>Novembro</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>86</b>	<b>12</b>	<b>92</b>
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>30</b>	<b>85,3</b>	<b>26</b>	<b>85,6</b>

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Tabela 3 - Número total de inseminações descrevendo qual tipo de conservação do semen, número de embriões recuperados e número de confirmação de prenhez

	<b>Número de inseminações</b>	<b>Número de embriões recuperados</b>	<b>Número de prenhez confirmadas</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<b>Semen fresco</b>	7	5	4	71
<b>Semen resfriado</b>	22	20	18	90
<b>Semen congelado</b>	6	5	4	83
<b>Total</b>	35	30	26	

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estágio supervisionado foi extremamente importante para minha formação e contribuiu muito para o meu crescimento profissional. O trabalho permitiu colocar em prática os ensinamentos do curso de Medicina Veterinária, vivenciar diferentes protocolos e biotecnologias da reprodução equina e comprovar a viabilidade da utilização de sêmen congelado nas taxas de recuperação embrionária. Além disso, foi possível experimentar a realidade do mercado de trabalho, principalmente no que diz respeito à produção e reprodução de equinos no Leste de Minas Gerais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, M. A. **Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões**. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 36, p. s207-s214, 2008. Suplemento 2.

ALVARENGA, M.A. **Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil**. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 38, p. s319-s333, 2010. Suplemento 1.

BRADECAMP E.A. 2007. **Estrous synchronization**, p.22-25. In: Samper J.C., Pycock J.F. & McKinnon A.O. (Eds) Current therapy in equine reproduction. Elsevier, St. Louis.

CANESIN, H.S. **Caracterização da hemodinâmica uterina de éguas durante o ciclo estral**. Botucatu: [s.n.], 2013 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. **Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga**. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

MACIEL, L.F.S. **Estágio supervisionado realizado no Centro Sul – Centro Especializado em Reprodução Equina do Sul de Minas**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

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

MARTINEZ NUNEZ, G.A. **Densidades histológicas e ecográfica do corpo lúteo de égua**, 2014. 44 f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, curso de Medicina Veterinária, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

C. Ramires Neto et al. **Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion Semen** / Journal of Equine Veterinary Science xx (2015).

Samper JC. Ultrasonographic appearance and the patterne of uterine edema to time ovulation in mares. Proccedings of the 43rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, p.41-43, 1997

SAMPER,J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**-Philadelphia, USA: W.B.Saunders, 2 nd ed, 2009. 336p.

TAVEIROS, A.W. et al. **Ultrasonographic monitoring of 103 recipient mares of different reproductive status during the first 30 days after embryo transfers**. Veterinary Record, v.153, p.558-560, 2003.



Control Methods and Evaluation of Bacterial Growth on Fresh and Cooled Stallion  
Semen C. Ramires Neto et al. / Journal of Equine Veterinary Science xx (2015) 1–6.