



GABRIELLA CIPRIANO ROQUE DIAS

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA
REALIZADO NO HARAS ZEL – OURO FINO/MG**

Lavras – MG

2021

GABRIELLA CIPRIANO ROQUE DIAS

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA
REALIZADO NO HARAS ZEL – OURO FINO/MG**

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

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Lavras – MG

2021

GABRIELLA CIPRIANO ROQUE DIAS

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA
REALIZADO NO HARAS ZEL – OURO FINO/MG**

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

- M.V. Msc. Giovanna Santesso Takakura
- M.V. Msc. Francisco Ayres de Oliveira Neto

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Lavras – MG

2021

Dedico este trabalho à minha mãe Renilda e ao meu pai Zezinho, pelo suporte e amor incondicional indispensáveis para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus e a São Francisco de Assis, pela proteção e por sempre me guiarem em todos os meus passos e decisões.

Durante esses anos pude contar com várias pessoas incríveis, que foram imprescindíveis para que eu conseguisse realizar meu sonho. Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Zezinho e Renilda, que com seu amor e carinho incondicionais, sempre estiveram presentes, me apoiando e orientando.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras, a qual proporcionou a realização desse sonho, em especial ao setor de Reprodução Animal, ao Hospital Veterinário de Grandes Animais (HVGA), ao Nerc (Núcleo de Estudos em Reprodução Canina) e também ao Reproduz (Grupo de Extensão e Assistência Técnica em Reprodução Animal).

Ao meu orientador e professor Murgas, pela confiança e compreensão e por todos os ensinamentos. Ao meu professor José Nélio, que me deu a oportunidade de ter o primeiro contato com a área de Reprodução Animal e poder conhecer e vivenciar o quão maravilhoso e gratificante é trabalhar nesse campo. Um muito obrigada aos membros da banca por aceitarem meu convite e fazerem parte desse momento.

Uma gratidão eterna a todos os profissionais com quem tive a oportunidade de estagiar, obrigada por cada ensinamento compartilhado, contribuindo para minha formação pessoal e profissional, em especial ao Reno Roldi (Haras Monte Branco), Gabriel Monteiro (UFMG), Giovanna Takakura, que se tornou uma querida amiga.

À toda equipe do Haras Zel, local em que tive a oportunidade de retornar e vivenciar experiências incríveis, pessoais e profissionais. Um agradecimento em especial aos meus supervisores de estágio Francisco Ayres, Pedro Costa e Ana Caroline Caetano, pessoas incríveis que não medem esforços para transmitir seus ensinamentos da melhor maneira possível.

Aos companheiros acadêmicos, que ao longo dessa caminhada se tornaram grandes amigos, em especial aos 'Galinhas': Arthur, Ariela, Fernanda, Leticia, Lucas, Nayara, Pedro, Thamires e Thalita, muito obrigada pelas risadas e por tornarem a caminhada mais leve. Um muito obrigada também a Ketelyn, Larissa, Lorena, Mariângela e Fran, com quem pude dividir emoções e experiências únicas durante a graduação.

Agradeço as minhas companheiras de casa Camila, Claudia e Jéssica que dividiriam comigo as alegrias e os perrengues que é morar em república, mas sempre com uma amizade e companheirismo incontestáveis.

Um muitíssimo obrigada a Ana Caroline, que virou amiga, confidente e conselheira, principalmente nessa reta final, obrigada por tudo e por tanto, sempre.

A todos os equídeos que acompanhei durante estes anos de graduação, por tornarem possível meu aprendizado, e principalmente darem ainda mais sentido à este sonho de ser Médica Veterinária.

RESUMO

O presente trabalho tem como finalidade relatar as atividades desenvolvidas no Haras Zel, no período de 17 de agosto de 2020 a 30 de outubro de 2020, como parte das exigências da disciplina PRG-107 - Estágio Supervisionado, para o título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). A escolha do local de estágio foi feita levando em consideração a área de interesse do curso. O estágio foi realizado sob a orientação do Médico Veterinário Prof. Dr. Luis David Solis Murgas, e supervisão do médico veterinário Pedro Augusto Santos Costa. A carga horaria foi cumprida no Haras Zel, totalizando 408 horas práticas, o restante da carga horária é destinada a elaboração deste trabalho. Durante o estágio foi possível acompanhar as atividades do haras, dentre elas, 52 colheitas de sêmen, 130 Inseminação Artificial (IA), 113 Transferência de Embrião (TE), 76 Diagnósticos de Gestação. Com essa experiência, foi possível adquirir vivência prática em assuntos que só havia tido contato teórico durante a graduação, e nesses meses, foi possível acompanhar a rotina prática do haras, abrangendo as áreas de Ginecologia e Andrologia, além de Fisiopatologia da Reprodução e Tratamento de Enfermidades Uterinas, tendo contato com biotecnologias aplicadas à reprodução de equídeos. Este trabalho contempla um relatório de estágio, uma revisão de literatura e um relato de caso comparando as taxas de fertilidade do uso de sêmen fresco e de sêmen congelado em éguas da raça Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: Reprodução equina, sêmen, inseminação artificial.

ABSTRACT

This work reports on activities performed at Haras Zel, from August 17 to October 30, 2020; as part of the discipline PRG-107 - Supervised Internship, for the title of Bachelor of Veterinary Medicine from the Federal University of Lavras (UFLA). The choice of the internship place was made considering the interest area of the degree. The internship occurred with the guidance of Professor Luis David Solis Murgas and under supervision of the veterinarian Pedro Augusto Santos Costa. The workload was fulfilled at Haras Zel, being 408 practice hours, the rest of the workload is destined to the elaboration of this work. During the internship period was able to follow haras activities, amongst them, 52 semen collection, 130 artificial inseminations, 113 embryo transfer, 76 pregnancy numbers. It was possible to acquire practical experiences in topics that had theoretical content during the undergraduate course, and three months after the practice of central reproduction, covering areas of Gynecology and Andrology, as well as Reproductive Pathophysiology and Treatment of Uterine Diseases, having contact with various biotechnologies applied to equine breeding. This work includes an internship report, a literature review and a comparative between fertility rates of fresh semen use and freeze semen in mares of Mangalarga Marchador breed.

Keywords: Equine reproduction, semen, artificial insemination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vista interna do pavilhão de baias	16
Figura 2 - Vista interna do pavilhão de baias	17
Figura 3 - Vista interna do pavilhão de baias	17
Figura 4 – Redondel para apresentação de animais	18
Figura 5 - Tronco para contenção	18
Figura 6 - Tronco para contenção	18
Figura 7 – Farmácia	19
Figura 8 – Laboratório para manipulação de embrião e sêmen.....	19
Figura 9 – Laboratório para esterilização de materiais	20
Figura 10 – Laboratório para esterilização de materiais	20
Figura 11 – Fenil.....	21
Figura 12 - Colheita de sêmen em manequim	24
Figura 13 - Material para análise de sêmen.....	25
Figura 14 – Embrião D9.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

UFLA - Universidade Federal de Lavras
TCC - Trabalho de Conclusão de Curso
DMV - Departamento de Medicina Veterinária
Km – Quilômetros
OPG - Ovos por grama de fezes do animal
IA - Inseminação Artificial
TE - Transferência de Embrião
IM - Intramuscular
GTA - Guia de Trânsito Animal
AIE - Anemia Infecciosa Equina
Kg - Quilogramas
DG - Diagnóstico de Gestação
US - Ultrassonografia
CL - Corpo Lúteo
Hz - Hertz
HSP - Proteínas de choque térmico
hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana
IV - Intravenoso
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
E2 - Estrógeno
P4 - Progesterona
D4 – Quarto dia após a ovulação
D8 - Oitavo dia após a ovulação
D9 - Nono dia após a ovulação
PGF2 α - Prostaglandina 2 alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HARAS ZEL	15
2.1 Introdução.....	15
2.2 Estrutura física	15
2.3 Manejo alimentar	20
2.4 Manejo sanitário e controle de doenças reprodutivas	21
3 ATIVIDADES ACOMPANHADAS.....	23
3.1 Manejo Reprodutivo de Machos.....	23
3.1.1 Colheita de sêmen	23
3.1.2 Análise de Sêmen.....	25
3.1.3 Acompanhamento da temperatura corpórea dos garanhões	26
3.2 Manejo Reprodutivo de Fêmeas	27
3.2.1 Controle Reprodutivo	27
3.2.2 Indução de Ovulação	27
3.2.3 Ciclo Estral Artificial	28
3.2.4 Protocolo de Ciclo Estral Artificial Preconizado	28
3.2.5 Inseminação Artificial	29
3.2.6 Colheita, Manipulação e Transferência de Embrião	30
4. Relato de Caso: Taxas de fertilidade do uso de sêmen fresco e de sêmen congelado.....	32
4.1 REVISÃO DE LITERATURA: Aspecto morfofisiológico do aparelho reprodutivo do macho equino	32
4.2 Endocrinologia do sistema reprodutivo do garanhão	33
4.3 Análise do sêmen	34

4.3.1 Manejo de sêmen equino.....	34
4.3.2 Avaliação espermática.....	34
4.3.3 Morfologia espermática.....	39
4.4 Taxa de fertilidade.....	39
4.5 Descrição do relato de caso: Comparativo entre as taxas de fertilidade do uso de sêmen fresco e de sêmen congelado em éguas da raça Mangalarga Marchador.....	41
4.5.1 Identificação.....	41
4.5.2 Avaliação do sêmen fresco.....	41
4.5.3 Avaliação do sêmen congelado.....	42
4.5.4 Inseminação artificial.....	42
4.5.5 Resultado de fertilidade.....	42
5 Considerações finais.....	44
6 Referências Bibliográfica.....	45

1 INTRODUÇÃO

O curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) tem duração de cinco anos, dividido em 10 períodos, os quais abrangem disciplinas de caráter obrigatório e eletivas, estas escolhidas de acordo com o interesse do discente. O último período da grade curricular contém apenas uma disciplina, que é obrigatória, denominada PRG107 – Estágio Supervisionado, com 476 horas, das quais 408 horas são destinadas a atividades práticas, para que o aluno possa aliar a teoria aprendida/discutida na sala de aula à prática da vida profissional, além de poder conhecer o mercado de trabalho da área de interesse. As 68 horas restantes são reservadas para a elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), que tem como base a rotina vivenciada durante o período de estágio.

O presente trabalho visa relatar o estágio supervisionado realizado no Haras Zel, situado na cidade de Ouro Fino, no estado de Minas Gerais. O estágio ocorreu durante o período de 17 de agosto de 2020 a 30 de outubro de 2020. Sob orientação do Médico Veterinário Professor Doutor Luis David Solis Murgas e supervisão do Médico Veterinário Pedro Augusto Santos Costa. A escolha do local de estágio foi feita pelo fato do Haras ser referência nacional na criação de animais da raça Mangalarga Marchador, possuir uma excelente estrutura, ao fácil acesso, e à oportunidade de acompanhamento do trabalho de excelentes médicos veterinários, qualificados na área da reprodução equina, bem como a possibilidade de aperfeiçoamento na formação acadêmica.

As atividades acompanhadas são aqui relatadas, entre elas, a descrição física e operacional do local, as atividades desenvolvidas, bem como as biotecnologias aplicadas, e um comparativo entre as taxas de fertilidade do uso de sêmen fresco e de sêmen congelado em éguas da raça Mangalarga Marchador.

2 HARAS ZEL

2.1 Introdução

A Fazenda Talismã abrange o Haras Zel, com sede na cidade de Ouro Fino, Estado de MG, na Estrada Peitudos, S/N, Zona Rural. Além do Haras Zel (equideocultura), a Fazenda Talismã compreende o Café Zel (cafeicultura) e Agropecuária Boa Ventura (bovinocultura de corte).

O Haras Zel é criatório da raça Mangalarga Marchador, conhecido nacionalmente, possuindo animais considerados de elite, de alta genética racial. O haras conta com infraestrutura adequada desde nascimentos de potros até treinamento de animais de pista, desempenhando alta performance. O Haras possui uma área de cerca de 100 hectares com piquetes, baias, redondéis (*figura 4*) para doma e treinamento, pista de treinamento, área de apresentação de animais, exercitador circular dentre outras estruturas necessárias para criação adequada de equinos. Esta área da Fazenda Talismã, abriga aproximadamente 320 animais entre: doadoras, matrizes, garanhões, potros e potras, o que corresponde a 80% da tropa, os outros 20% correspondente as receptoras, são manejadas na Fazenda Cachoeira, localizada no município de Inconfidentes-MG.

Além da infraestrutura, conta com uma equipe de profissionais habilitados a transmitir todo seu conhecimento, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento pessoal e profissional. A equipe profissional do haras conta com dois médicos veterinários responsáveis, sendo um desses o gerente do haras e outro responsável pela reprodução e uma médica veterinária residente, 3 ajudantes no manejo da reprodução, além de 5 tratadores e 3 treinadores.

O intuito do estágio foi acompanhar a rotina de um importante haras, com veterinários que são referência na reprodução equina no Brasil, conjugando teoria e prática. Além de poder vivenciar e entender os desafios que enfrentamos na busca dos melhores índices reprodutivos, e também acompanhar o uso de diversas biotecnologias.

2.2 Estrutura Física

O Haras é composto por três pavilhões de cocheiras com 54 baias (4 X 4 m cada baia). Dois desses pavilhões são destinados aos animais da clínica e animais que vão ser monitorados para a reprodução (indução e/ou acompanhamento folicular de madrugada), totalizando 30 baias. O outro pavilhão é destinado aos animais de pista (garanhões, éguas e potros desmamados que serão de pista), e também esse pavilhão conta com duas baias maternidade (6 x 6 m), no total são 24 baias (*figuras 1, 2, 3 e*

4).

O local também conta com um escritório; um refeitório; espaço para acomodação de feno e ração; um laboratório para manipulação e análise de embriões, e análise e manipulação de sêmen (*Figura 8*), contendo materiais para tais procedimentos, como 1 microscópio óptico, 1 lupa, 1 placa aquecedora, diluentes de sêmen, pipetas, inovuladores, placa de cultivo celular, hormônios e medicamentos para a reprodução, seringas, agulhas. Outro laboratório para congelamento de sêmen e esterilização (*Figuras 9 e 10*), com uma 1 estufa, 1 autoclave, 1 banho-maria, 1 centrífuga, além desses itens, encontra-se também os botijões de sêmen. Há também dois troncos (*figuras 5 e 6*), um deles é para uso dos treinadores, para preparo dos animais (tosa e limpeza) e o outro para uso da clínica e reprodução, onde são feitas as palpações transretais, exame ultrassonográfico, aplicação de hormônios e medicamentos, inseminações artificiais, colheitas de embrião, controle e acompanhamento folicular das doadoras, receptoras e matrizes. Há também o tronco acoplado à seringa, que é utilizado para facilitar o manejo com as receptoras. Também possui uma sala utilizada como farmácia (*Figura 7*), onde ficam os medicamentos de uso geral, instrumentais cirúrgicos, estoque de seringas e agulhas, etc. Na parte externa, fica a área de colheita de sêmen, que possui um manequim para tal atividade.

Figura 1 – Pavilhão de Baías



Fonte: Autor (2020)

Figura 2 – Pavilhão de Baias



Fonte: Autor (2020)

Figura 3 – Pavilhão de Baias



Fonte: Autor (2020)

Figura 4 – Redondel



Fonte: Autor (2020)

Figura 5 – Tronco para contenção

Figura 6 – Tronco para contenção



Fonte: Autor (2020)



Fonte: Autor (2020)

Figura 7 - Farmácia



Fonte: Autor (2020)

Figura 8 – Laboratório para manipulação de embrião e sêmen



Fonte: Autor (2020)

Figura 9 – Laboratório para esterilização de materiais



Fonte: Autor (2020)

Figura 10 – Laboratório para esterilização de materiais



Fonte: Autor (2020)

2.3 Manejo Alimentar

A reprodução equina é influenciada por diversos fatores, como por exemplo, fotoperíodo, nutrição, estresse, individualidade de cada animal. Uma das premissas do bem estar animal, é estar livre de fome e sede, e caso as necessidades daquele indivíduo, não forem atendidas, a reprodução não alcançará os resultados desejados. Com uma nutrição deficitária, o metabolismo de qualquer ser vivo não consegue atingir à homeostase ideal para que seus sistemas respondam corretamente. Dessa forma, além do organismo do animal, o eixo e o trato reprodutivo necessitam de uma manejo alimentar eficiente para que a reprodução tenha sucesso. Portanto, para que a reprodução obtenha os resultados almejados, são ofertados aos animais os

seguintes grupos de alimentos: volumoso (silagem de milho, feno tipo A), concentrado (ração) e suplementação mineral (sal mineral para equinos), à vontade. Os animais que são mantidos piquetes recebem silagem, ração e sal mineral, outros recebem feno (*Figura 11*), de acordo com valor zootécnico, função que desempenha e escolha do proprietário.

Figura 11 - Fenoil



Fonte: Autor (2020)

2.4 Manejo sanitário e controle de doenças reprodutivas

É realizada vacinação contra Encefalomielite, Influenza, Rinopneumonia e Tétano em todos os animais desmamados. A imunização contra Leptospirose e Raiva também é feita, com reforço anual.

VACINA	Esquema de vacinação preconizado			
	ADULTO	POTRO LACTENTE	POTRO	ÉGUA PRENHE
Lexington® (ENCEFALOMIELITE EQUINA leste e oeste, INFLUENZA EQUINA, HERPES VÍRUS EQUINO tipo 1, TÉTANO)	Anual	1ª dose no 4º mês e 2ª dose 30 dias depois (na desmama, com 5 meses completos)	Anual	Anual
Raiva	6/6 meses	1ª dose 30 dias após a 1ª dose da Lexington® e 2ª dose 30 dias depois	6/6 meses	6/6 meses
Herpesvírus (EHV-1 EHV-4)				5º, 7º e 9º meses de gestação
Leptospirose	6/6 meses	1ª dose 30 dias após a 1ª dose da Lexington® e 2ª dose 30 dias depois	6/6 meses	6/6 meses

Algumas doenças pode afetar os equinos, causando prejuízos à gestação, como por exemplo, reabsorção embrionária, aborto, endometrite, entre outros. Dessa forma, o haras adota um protocolo vacinal de imunização das fêmeas gestantes com cinco, sete e nove meses de gestação, para a prevenção contra o Aborto Equino à Vírus, causado por um *Hespesvírus* Tipo I, o qual é o segundo agente mais comum como causador de aborto (12% dos casos), ocorrendo nos últimos quatro meses de gestação (MCKINNON et al., 2011).

Apesar de ocorrer casos de garrotilho na propriedade e ser uma vacina importante, o Haras não adota em seu protocolo vacinal, a vacina contra o garrotilho.

A vermifugação é feita em intervalos de 3 em 3 meses em todos os animais a partir do primeiro mês de vida, ocorrendo alternância nas bases utilizadas buscando o controle dos principais parasitas, dentre as bases alternadas podemos encontrar ivermectina com praziquantel e moxidectina, e a dosagem é escolhida baseada no peso do animal. Sendo coletadas amostras de fezes no dia da vermifugação para realização do exame que determina o

número de ovos por grama de fezes do animal (OPG).

3 ATIVIDADES ACOMPANHADAS

Dentre as atividades acompanhadas no estágio, pode ser citados o manejo diário de rotina dos animais alojados como alimentação, cuidado com pelagem e cascos, vacinação, vermifugação e manejo clínico, quando necessário.

Com relação à reprodução foram acompanhadas as seguintes atividades: controle reprodutivo de doadoras, receptoras e matrizes; hormonioterapia; ciclo estral artificial; IA; exames complementares; tratamentos uterinos; colheita e transferência de embrião; DG; manejo reprodutivo de garanhões, incluindo colheita, manipulação e biotecnologias aplicadas ao sêmen equino.

3.1 Manejo Reprodutivo de Machos

3.1.1 Colheita de sêmen

Durante o período estágio foram acompanhadas 52 coletas de sêmen e dentre essas coletas, foi possível realizar 12 coletas de sêmen. A colheita de sêmen era realizada para IA no próprio Haras ou para ser usado em outras propriedades que, nesse caso, era enviado de forma refrigerada. O modelo da vagina artificial utilizada era a de Botucatu ou a da IMV, a escolha do modelo da vagina artificial dependia do tamanho do pênis do garanhão que iria ser coletado. O modelo da Botucatu era usado para os garanhões que possuíam pênis menor, já o modelo IMV, era para garanhões com pênis maior, pois esse modelo é além de mais larga, mais comprida.

Para a montagem da mesma, era utilizado uma mucosa de látex, depois colocava-se uma mucosa plástica onde era acoplado o copo coletor contendo um saquinho e um filtro. Para conforto do garanhão e com o intuito de tentar mimetizar o ambiente vaginal da fêmea, a vagina artificial era preenchida com água aquecida entre 50°C a 55°C. A justificativa para uma temperatura mais alta, é porque a vagina artificial não era toda preenchida com água, depois de colocada a medida necessária de água, preenchia o resto da vagina artificial com ar, com o intuito de não ficar tão pesado.

Como a colheita era feita em manequim (*Figura 12*), utilizava-se uma égua no cio, próximo ao manequim, para estimular a emissão e posterior ereção do pênis do macho. Posteriormente, o macho era conduzido e bem posicionado ao manequim. O responsável pela colheita desviava o pênis com a mão, introduzindo-o na vagina artificial.

A ejaculação é percebida pelo balanço da cauda (cauda em bandeira), contração dos músculos perianais, sapatear com os membros posteriores, e o pulso uretral. Ao finalizar a colheita, o ejaculado era levado para o laboratório, o mesmo era analisado macroscopicamente, quanto a cor, que na espécie equina é desejável ser branco acinzentado; aspecto, que depende da concentração de espermatozoides, e no caso dos equinos, é classificado como aquoso; e no microscópio óptico para avaliar motilidade (número de espermatozoides móveis, sendo dividida em motilidade total e progressiva, que é determinada pela avaliação da porcentagem de células espermáticas que apresentarem movimento retilíneo e movimento circular aberto); vigor (representa a intensidade do movimento espermático e é classificado de 1 a 5, no qual 1 é exclusivamente oscilatório e 5 é progressivo retilíneo e muito rápido); e concentração espermática (número de espermatozoides por milímetro ou centímetro cúbico). Depois ele era preparado conforme sua destinação (fresco ou refrigerado).

Figura 12 – Colheita de sêmen em manequim



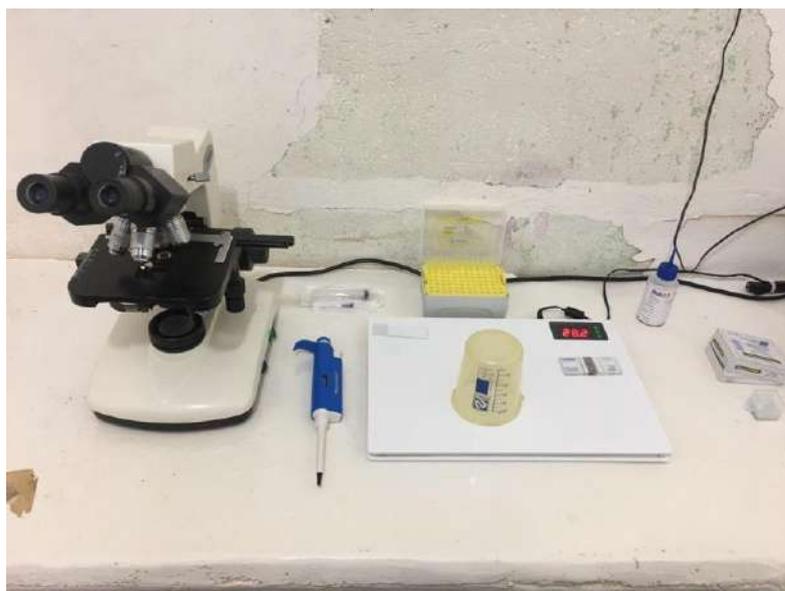
Fonte: Autor (2020)

3.1.2 Análise de Sêmen

Os materiais utilizados para manipulação e análise do sêmen eram previamente aquecidos em placa aquecedora, com temperatura de 37°C (*Figura 13*). Para fazer a concentração espermática na câmara de Neubauer a diluição era feita com 1,9 mL de água e 100 µL de sêmen, resultando em 20:1.

O próximo passo era diluir todo o sêmen 1:1 com o diluente adequado e coletar, dessa solução, uma gota para colocar na lâmina com lamínula. O diluente de eleição era o da Biodux®. Esse material era levado ao microscópio óptico onde era determinado a motilidade e o vigor. A motilidade é um percentual dado ao número de células móveis, já o vigor é a intensidade com que as células se movimentam, sendo classificado de um a cinco, em que um é ruim e cinco é o máximo que se deseja.

Figura 13 - Material para análise de sêmen



Fonte: Autor (2020)

3.1.3 Acompanhamento da temperatura corpórea dos garanhões

A termorregulação é um fator decisivo para quem busca o êxito reprodutivo, dessa forma as células da linhagem germinativa são susceptíveis a ação do calor. O aumento da temperatura dos testículos pode acontecer por conta de fatores externos ou internos e potencializa a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, levando assim a uma degeneração testicular e consequentemente, perda de células germinativas. Além disso, pode ocorrer alterações nas concentrações de testosterona e de corticosteroides em animais expostos ao estresse térmico, interferindo na capacidade reprodutiva. Entretanto, ocorre um aumento na síntese de proteínas de choque térmico (HSP), com o objetivo de proteger. Assim sendo, a quantidade e qualidade do sêmen, como fertilidade, são afetados pelo estresse térmico testicular.

Dado a importância, pela manhã é aferido a temperatura de todos os garanhões ativos na reprodução, com o intuito de verificar se algum deles apresenta aumento de temperatura, para que dessa forma, se possa evitar grandes lesões testiculares.

Houveram aferições que a temperatura do garanhão estava acima do fisiológico, dessa forma, ele foi levado ao tronco e examinado, e medicado de acordo com a necessidade do caso.

3.2 Manejo Reprodutivo de Fêmeas

3.2.1 Controle Reprodutivo

As fêmeas equinas são animais poliéstricos estacionais, ou seja, ciclam em determinada época do ano. Essa época corresponde ao período de dias mais longos, com maior incidência de luz. O controle reprodutivo é realizado através de palpação transretal, avaliando tônus uterino, classificado de um a três, e com auxílio da ultrassonografia (US) na mensuração e avaliação de folículos, presença de corpo lúteo (CL), grau de edema uterino, classificado de um a quatro (edema inflamatório) segundo a escala de Samper, ou presença de fluido inflamatório e ar. Além disso, no US é possível avaliar e classificar a ecogenicidade uterina, também classificado de um a três. Determinadas características e alterações morfológicas como edema e tônus uterinos, além de desenvolvimento folicular, são perceptíveis tanto na palpação quanto na ultrassonografia, que correspondem aos diferentes estágios do ciclo estral, sendo que os mais importantes na prática de reprodução equina são: anestro, estro e diestro. No Haras Zel era utilizado o Sonoscape A5, com probe linear de frequência de 5 Hz.

As alterações observadas com relação ao início do estro são edema uterino fisiológico (com classificação de um a três), tônus uterino, relaxamento de cérvix e mensuração folicular.

As éguas eram palpadas e realizado a ultrassonografia diariamente em aproximadamente 70% do total de doadoras que estavam no programa de reprodução no início da estação de monta, que eram 36 éguas. Durante o período de estágio foi possível palpar em torno de duas éguas por dia, principalmente, levando em consideração o acompanhamento folicular que era feito durante a madrugada.

3.2.2 Indução de Ovulação

Durante o período de estágio as éguas foram induzidas utilizando hCG juntamente com análogo ao GnRh, as induções eram feitas, em sua maioria, as 22h para que fosse possível o acompanhamento folicular dessas éguas e posterior inseminação. O horário da indução dependia de qual e como o sêmen seria utilizado e como é a resposta daquela éguas quanto a inflamação pós IA. Adota-se como padrão para acompanhamento de ovulação, éguas que apresentem folículos ≥ 35 milímetros (mm) de diâmetro e edema uterino de grau três (MELO, 2006). Ao atingir o ponto de indução para ovulação, conforme os parâmetros apresentados anteriormente, podemos utilizar de diversos protocolos hormonais

(FARIAS et al, 2016). A indução, era feita associando a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) na dose de 1500 U.I via intravenosa (IV), com análogo de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), a deslorelina, na dose de 1 mg via IM. Tal protocolo confere uma melhor qualidade oocitária e maior confiabilidade na indução de ovulação.

3.2.3 Ciclo Estral Artificial

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

3.2.4 Protocolo de Ciclo Estral Artificial Preconizado

O tipo de estrógeno utilizado era o Benzoato de Estradiol (Sincrodiol)®, que pode ser administrado nas doses de 3 mL no dia do início do protocolo, 6 mL no segundo dia e 3 mL no terceiro dia. Mimetizando um pico de estrógeno, como ocorreria em um ciclo natural. Após 48 horas da última aplicação de E2, coloca-se o implante intravaginal de progesterona (P4) apenas se o animal tiver respondido ao estrógeno, ou seja, ter apresentado um edema de grau três.

Durante o período de estágio foram colocados diversos implantes e a técnica que foi orientada para colocar o implante intravaginal de progesterona, seguia os seguintes passos: deve-se lavar adequadamente a vulva, vestir uma luva estéril, retirar o cabo do dispositivo e banhá-lo com terramicina spray, Terra-Cortril®, repetindo o mesmo em toda a luva. Após a inováção do embrião coloca-se outro dispositivo de Progesterona, repetindo todo o processo já descrito anteriormente, e a aplicação de 5ml de P4-300 (300 UI), de longa ação, pode ser utilizada após confirmação do embrião na receptora aos 12 dias (levando em consideração o tempo máximo de 7 dias do uso do implante), sendo o implante retirado após 48 horas da primeira aplicação da P4-300, pois esta demora dois dias para atingir seu pico. A suplementação de Progesterona exógena deve ser mantida uma vez por semana, até os 120 dias de gestação, período em que a placenta assume a produção de P4 exógena.

3.2.5 Inseminação Artificial

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

Durante o período de estágio, foram realizadas 113 IA, entre IA com sêmen fresco e congelado. Foi possível realizar 8 IA ao longo do estágio. A IA era realizada, aproximadamente de 24-36 horas após a indução da ovulação, sendo que quanto mais próximo à ovulação, maiores chances de fertilização do oócito. Esse intervalo varia de acordo com a biotecnologia aplicada ao sêmen do garanhão. O sêmen fresco (in natura) tem viabilidade de 48 horas, por isso, a IA pode ser aplicada com maior antecedência à ovulação da fêmea. O sêmen refrigerado possui viabilidade de 24 horas, além de necessitar de um período de capacitação espermática. Já o sêmen congelado tem viabilidade de fertilização de somente 12 horas após sua deposição intrauterina, por isso, ao ser utilizado, é necessário que se faça o acompanhamento da fêmea através da ultrassonografia em intervalos de 1 hora, próximo ao momento estimado para ovulação.

Para realizar a inseminação, o processo instruído foi: manter a égua contida em tronco de contenção adequado, para que fosse realizada a limpeza do reto, palpação e ultrassonografia transretal e posteriormente lavagem externa da vulva e região perineal com detergente neutro, repetindo o procedimento de lavagem três vezes, posteriormente, era feita a secagem com papel toalha. Para a inseminação em si, coloca-se a luva de palpação ao contrário (estéril), depois lubrifica essa luva com gel íntimo estéril, e já com a pipeta em mãos, protegendo sua extremidade, o Médico Veterinário introduz o braço pelo canal vaginal e com auxílio do dedo indicador a cérvix é localizada, e nesse momento a pipeta é introduzida até o útero. Em seguida, acopla-se uma seringa ou frasco (Botu-IA®) contendo o sêmen fresco ou refrigerado, depositando-o no corpo do útero. Para IA com sêmen congelado, primeiramente ele deve passar pelo processo de descongelamento, que foi utilizado uma temperatura de 37 °C, sendo ele exposto a ela por um minuto. É usado uma pipeta flexível para que a deposição de sêmen seja feita na ponta do corno uterino *ipsi* lateral à ovulação.

3.2.6 Colheita, Manipulação e Transferência de Embrião

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

O embrião colhido da égua doadora deve estar no dia 8 ou 9 pós ovulação (*Figura 14*), a escolha do dia para lavado dependerá do uso do sêmen fresco ou congelado e do histórico de qualidade de produção embrionária da doadora. A receptora pode estar entre o dia 4 e 8 pós ovulação, sendo mais indicado entre os dias 4 e 6, devido ao nível de progesterona e a receptividade uterina da égua.

Durante o estágio foram realizadas 113 TE e através do acompanhamento e auxílio da atividade, observou-se todo o procedimento, incluindo a observação do embrião na lupa. No qual o Médico Veterinário responsável deve vestir uma luva de palpação virada ao contrário, para minimizar os riscos de contaminação e, com a ajuda de um auxiliar, retira a sonda de TE do saco estéril, com a mão enluvada protegendo a extremidade que será introduzida no ambiente intrauterino. Posteriormente, conecta-se soro Ringer com Lactato e deixava o líquido passar pela sonda, com objetivo de retirar todo ar que existia dentro dela. Lubrificava-se o dorso da luva com gel estéril, e a sonda era introduzida através da vagina, passando pela cérvix até chegar ao útero. Para fixar a sonda dentro do útero é necessário inflar o cuff (balonete) com aproximadamente 30 mL de ar, o que impedia que a sonda ou líquido voltasse pela cérvix. Após a fixação da sonda, a mão era retirada da vagina e introduzida no reto com isso, acompanhava-se a distensão do útero, possibilitando a manipulação do mesmo para ajudar o preenchimento de toda extensão dos cornos e corpo uterino. O líquido era infundido com pressão para o interior do útero.

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

Após a recuperação do embrião, sua manipulação acontece no laboratório. Neste local ocorria a lavagem do embrião em meio “holding” (oito a doze gotas) até que todas as sujidades fossem removidas. Posteriormente, o embrião era colocado em uma palheta estéril,

de 0,25 ou 0,5 mL (dependendo do tamanho do embrião) com o próprio “holding” na maioria das vezes, ou em pipeta de IA. Com o auxílio de uma seringa de 1 mL aspira-se uma coluna de meio, uma coluna de ar, o meio com o embrião, uma coluna de ar e completava-se a palheta com o meio. Assim o embrião fica isolado por duas bolhas de ar no centro da palheta, isso impede que o embrião tenha muito movimento dentro da palheta e sofra lesões que torne inviável sua transferência e gestação.

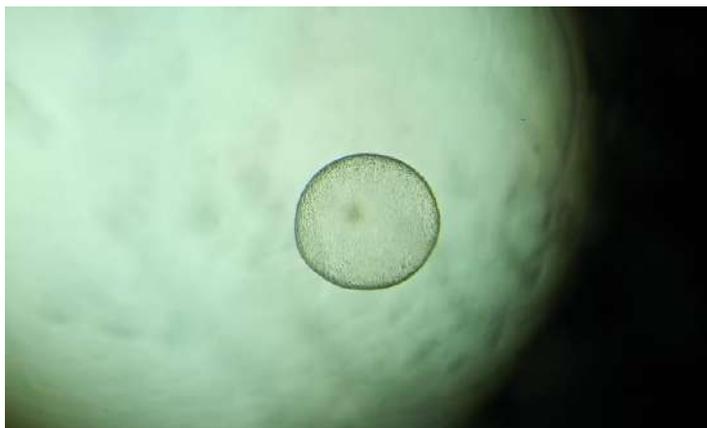
A palheta, já com embrião, era colocada no inovulador ou na pipeta, os quais eram revestidos por uma camisinha sanitária, com o objetivo de proteger o inovulador e evitar possíveis contaminações (CUERVO-ARANGO et al., 2018). O Médico Veterinário deve então vestir uma luva de palpação virada ao contrário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

Deve-se sempre conferir se o embrião não ficou na palheta nem na ponta do inovulador.

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

O DG precoce é feito aos 12 dias de gestação na receptora, através de um exame ultrassonográfico, repetindo a avaliação a cada 7 dias, até 120 dias de gestação, ou seja, até o final do protocolo de suplementação de progesterona. A partir de 60 dias de gestação, a receptora poderá ser enviada para a fazenda Cachoeira, onde irá permanecer até o seu 10º mês de gestação. No 10º mês a receptora retorna a Fazenda Talismã, com o objetivo de ocorrer a adaptação e preparo da imunidade que será transmitida da mãe para o potro através do colostro.

Figura 14 – Embrião D8



4 Relato de Caso: Taxas de fertilidade do uso de sêmen fresco e de sêmen congelado

4.1 REVISÃO DE LITERATURA: Aspecto morfofisiológico do aparelho reprodutivo do macho equino

Na reprodução, as funções do macho vão desde a formação dos gametas até sua deposição na fêmea. O sistema genital do macho equino é composto por dois testículos, vias espermáticas (ductos eferentes, epidídimos, ductos deferentes, uretra e pênis), glândulas acessórias (vesículas seminais, próstata e glândula bulbouretral) e estrutura que fornecem suporte, como o músculo uretral-pélvico, músculo isquiocavernoso e músculo bulboesponjoso (DAYCE, 3ª edição).

Os testículos são localizados extra-abdominal, sendo recoberto pelo escroto, que apresenta várias glândulas sudoríparas que agem na manutenção da temperatura dos testículos, sendo esta função associada com a ação do musculo cremaster, que se contraí ou se relaxa, afastando ou aproximando os testículos do corpo. Esta ação ocorre pois os testículos devem ser mantidos em temperatura abaixo da temperatura corpórea, sendo descrito por Reece(2006) que se faz necessário que a temperatura das gônadas esteja entre 4° e 7°C abaixo da corporal, para que a espermatogênese ocorra normalmente. Segundo, Ramires Neto et al. (2013), em cavalos a espermatogênese é desencadeada a uma temperatura testicular de 35°C.

Os testículos apresentam duas funções principais: produção de espermatozoides (função exógena) que transmitem os genes do macho para a prole e produção de andrógenos (função endócrina), que dão as características ao indivíduo macho (STANBENFELD e EDQVIST, 1996)

As vias espermáticas são responsáveis pela maturação e transporte das células espermáticas, constituída da seguinte maneira: o epidídimo é responsável pelo processo de maturação e capacitação espermática; após esse processo, as células são conduzidas pelo ducto deferente até a uretra, sendo nesse processo incorporado as secreções das glândulas acessórias (ampola do ducto deferente, glândula vesicular, próstata e glândula bulbouretral), denominado plasma seminal. O pênis e a glande são constituídos por músculo cavernoso; e o prepúcio, que envolve a parte exposta do pênis, o mesmo é constituído de dupla camada que favorece a deposição do esmegma (Dyce et al., 2004; Reece, 2008).

O epidídimo é dividido anatomicamente em três regiões: cabeça, corpo e cauda. A cabeça fica ligada intimamente ao testículo, se curvando sobre o mesmo, o corpo é uma estrutura cilíndrica e se encontra na superfície dorsal do testículo. Na porção proximal da cabeça do epidídimo, encontramos os túbulos eferentes, provenientes dos túbulos contorcidos extratesticulares, que se fundem, formando o ducto epididimário, que percorre cabeça, corpo e cauda do epidídimo, continuando com o ducto deferente. Na porção inicial do epidídimo encontramos a cabeça proximal e epitélio dos ductos eferentes, que são responsáveis pela absorção de solutos e fluidos do testículo; no segmento médio ocorre a maturação dos espermatozoides e o segmento terminal que é composto pela cauda do epidídimo e porção dos ductos deferentes, que é um sítio de armazenamento de espermatozoides (AMANN, 2011). Os ductos deferentes se estendem da cabeça do epidídimo, passa pelo cordão espermático, chegando à uretra pélvica. Possui uma parede de musculatura lisa espessa, podendo ser inspecionado pela palpação escrotal. Quanto mais próximo da uretra pélvica, o ducto deferente apresenta uma dilatação que se comunica com a ampola do ducto deferente (AMANN, 2011).

4.2 Endocrinologia do sistema reprodutivo do garanhão

A produção espermática é o resultado do funcionamento sincronizado do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, onde há a liberação adequada de hormônios responsáveis pelo desencadeamento do processo de produção dos gametas.

O hipotálamo é responsável pela liberação de GnRH que, quando chega na hipófise, desencadeia a secreção das gonadotrofinas (FSH e LH) que através da corrente sanguínea se dirigem até os testículos, resultando na produção de esteróides (estrógeno e testosterona), que participam da formação dos espermatozoides. Os hormônios envolvidos na reprodução são liberados através de feedback positivo ou negativo, conforme a necessidade, estimulando ou inibindo, de maneira a se manter concentrações adequadas para a plena produção espermática.

Nos testículos há a presença de dois tipos de células. As células de Leydig que quando estimulada pelo LH, produzem testosterona, que se liga as células de Sertoli (estimulada pelo FSH), que por sua vez controlam o processo da espermatogênese. Conforme há um aumento das concentrações de testosterona circulante, ocorre um feedback negativo no hipotálamo resultando numa diminuição dos pulsos de liberação de GnRH desencadeando uma menor liberação de LH, resultando na diminuição da produção de testosterona. O

inverso também ocorre, ou seja, quando uma produção maior de testosterona se faz necessária, ocorre um feedback positivo e os níveis de testosterona são novamente restabelecidos.

As células de Sertoli também são responsáveis pela produção de inibina, sendo esta responsável por promover uma maior ou menor liberação dos pulsos de GnRH, alterando a secreção do FSH e, conseqüentemente, afetando a produção da ABP e da própria inibina.

4.3 Análise do sêmen

4.3.1 Manejo de sêmen equino

A colheita de sêmen equino pode ser realizada através da vagina artificial, no qual o garanhão deve ter um condicionamento prévio para que este monte uma égua em cio ou um manequim. Dentre vários modelos de vagina artificial, existe o modelo Botucatu que contém um tubo rígido, uma mucosa de látex, um copo coletor protegido de luz. A vagina deve ser preenchida com água quente, para permanecer a uma temperatura entre 42-45°C para a colheita. O animal deve realizar o salto sobre a égua em cio devidamente contida ou sobre o manequim, deve ter seu pênis desviado e introduzido na vagina artificial. A comprovação da ejaculação deve ser verificada através do movimento de cauda em bandeira (movimento da cauda para cima e para baixo), contração dos músculos perianais, sapatear, fluxo pulsátil uretral da ejaculação.

Após colheita, o sêmen deve passar por algumas análises mediatas e imediatas, como citadas acima. Como por exemplo: características macro e microscópicas.

4.3.2 Avaliação espermática

Segundo Mocé e Graham (2008), a importância da avaliação seminal através de testes laboratoriais se baseia no fato de permitir que seja estimada a capacidade fertilizante de espermatozoides, da mesma forma que possibilita classificar as amostras de sêmen por qualidade.

Porem Arruda et al. (2007) descreve a necessidade de avaliar vários aspectos seminais, já que nenhum teste isoladamente mostrou capaz de avaliar a fertilidade de um ejaculado. Sendo reafirmado por AX et al (2004), que descreve a necessidade da soma das análises de cada característica espermática a fim de alcançar um análise cuidadoso.

De acordo com Mies Filho (1982), deve-se realizar o exame microbiológico, onde compreende os caracteres físicos e químicos, e os microscópicos. Sendo que na avaliação

microbiológica deve-se determinar o volume, cor, aspecto, odor, pH, osmolaridade e composição química do ejaculado, enquanto no exame microscópico deve-se determinar os índices relativos à concentração, motilidade, vigor, proporção de espermatozoides vivos e morfologia espermática. Ou seja, os testes laboratoriais de análise espermático compreende principalmente a avaliação de movimentação, integridade estrutural e integridade funcional.

A determinação do número de células espermáticas por volume de ejaculado determina a quantidade de doses inseminantes possíveis sobre este ejaculado, ou seja, estabelece a quantidade de fêmeas que poderão ser inseminadas. A concentração espermática pode ser realizada através de hemocítômetro, fotocolorímetro ou espectrofotômetro, sendo uma técnica avaliativa de extrema importância, pois seus parâmetros variam devido a fatores como método e frequência de coleta, idade do reprodutor e saúde testicular (AX et al., 2004).

A motilidade espermática consiste na avaliação, em porcentual, da quantidade de espermatozoides que apresentam atividade cinética, ou seja, as células espermáticas que apresentam movimentação (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Segundo Salviano e Souza (2008), a motilidade das células espermáticas não apresentam um padrão único, podendo deslocar-se para frente, em circunferência ou apenas uma oscilação no campo microscópico, sendo estes movimentos denominados progressivo, circular ou oscilatório, respectivamente.

Sabendo desta alteração, o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), em 2013, estabeleceu que a motilidade progressiva deve ser expressa separadamente da avaliação da motilidade total quando o porcentual de células espermáticas móveis se apresente superior aos espermatozoides com motilidade progressiva. A importância da avaliação da motilidade progressiva está relacionada a viabilidade espermática após o processo de criopreservação, já pode ocasionar alterações nos espermatozoides, que vão interferir na movimentação celular e, segundo Kumar (2000), este é o parâmetro mais importante para a fertilização, pois deduz a possibilidade do deslocamento do gameta masculino até o gameta feminino, porém esse dado é contradito por Siqueira et al. (2007), que após avaliarem a correlação da motilidade progressiva com a taxa de prenhez em fêmeas bovinas, constataram não haver interferência ou correlação entre estas características.

O vigor é determinado a partir da intensidade dos movimentos da célula espermática, sendo que esta atividade causa influência sobre a velocidade de deslocamento do espermatozoide. A avaliação é expressa em um índice de zero a cinco, onde zero classifica a total falta de movimentos e cinco classifica a presença de movimentação intensa (FONSECA

et al., 1997). Porém, segundo Rota et al. (2004) as avaliações da motilidade e vigor por meio visual apresentam resultados subjetivos, mesmo quando feita por técnicos experientes.

A avaliação da integridade estrutural é obtida através de análises das características morfológicas espermáticas, sendo estes realizados através de esfregaços corados a base de Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras ou a técnica da câmara úmida. Estas técnicas são utilizadas pelo fato das células espermáticas serem translúcidas e, por isto, não apresentarem boa nitidez sob a microscopia ótica, quando não coradas. Já na técnica de câmara úmida não há o uso de corantes, porém deve-se utilizar microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de interferência diferencial, para destacar os contornos celulares (Johnson et al., 1997; Celeghini, 2005). As anormalidades morfológicas podem ser classificadas de diversas formas, sendo que alguns autores classificam de acordo com a região da célula onde ocorreu a alteração, enquanto outros classificam em defeitos primários e secundários ou defeitos maiores e menores (Howard e Pace, 1988; CBRA 1998).

A avaliação da integridade funcional pode ser realizada de acordo com as diferentes funções dos componentes da célula espermática, como a avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade do acrossomo, integridade do material genético e atividade mitocondrial da peça intermediária (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

A membrana plasmática do espermatozoide é formada por lipídeos e proteínas, desenvolvida durante a espermatogênese e maturada durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e ejaculação, sendo que a composição só é estabelecida após a maturação que ocorre no epidídimo (GADELLA et al., 2000). Os principais lipídeos presentes nesta estrutura são fosfolipídeos como colina, serina, glicerol e inositol, glicoesfingolipídeos e esteróides (FLESCHE; GADELLA, 2000).

A integridade da membrana plasmática é importante na sustentação da atividade metabólica, permitindo a capacitação celular e, posteriormente, a penetração na zona pelúcida (TÖPFER-PETENSEN et al., 2000). Sendo assim, danos nesta estrutura, podem causar perda da homeostase, implicação na sobrevivência espermática no trato genital da fêmea, incapacidade fertilizante e posterior morte celular (AMANN et al., 1979).

Como meios avaliativos da integridade de membrana plasmática destaca-se o uso de teste hipotônico, uso de sondas fluorescentes, e microscopia de campo claro através do uso de corantes supra-vitais, como eosina-nigrosina (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

De acordo com Dell'Aqua et al. (2002), as membranas biológicas são as responsáveis pela homeostase celular, tendo a habilidade de permitir o transporte seletivo de moléculas, principalmente aquelas com baixo peso molecular (Takahashi et al., 1990). Quando colocada em uma solução hipo-osmótica, a água penetra o espermatozoide, buscando alcançar o equilíbrio osmótico, e este influxo de água irá aumentar o volume espermático e a membrana plasmática provocando uma turgidez, diminuindo a razão volume e superfície.

Segundo Vazquez et al. (1984), o flagelo do espermatozoide apresenta maior susceptibilidade ao teste hiposmótico por apresentar uma membrana mais frágil do que a presente na região da cabeça. Sendo que, a capacidade do flagelo de se dobrar na presença de uma solução hiposmótica indica que o transporte de água através da membrana ocorre normalmente e que a membrana se encontra íntegra e com funcionalidade (Fuse et al., 1993).

Segundo autores como Palomino et al. (2001) e Poto et al. (2000), a integridade da membrana em uma célula viva não permite a impregnação de colorações, o que não acontece em células mortas cujas membranas estão alteradas.

A integridade acrossomal apresenta grande importância no processo de fertilização, já que é a parte celular responsável pelo armazenamento das enzimas acrossomais, que são liberadas durante a reação acrossômica, sendo este, o evento essencial para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (FLESCHE; GADELLA, 2000).

A avaliação da integridade da membrana acrossomal pode ser feita observando suas alterações morfológicas, através de microscopia eletrônica, ou através de testes funcionais, através do uso de corantes ou sondas fluorescentes (HARAYAMA; KUSUNOKI; KATO, 1993).

A principal função da mitocôndria é a produção de energia, adenosina tri-fosfato (ATP), apresentando grande importância no processo de fertilização, já que a motilidade espermática é gerada pelo movimento flagelar e este movimento exige um alto gasto energético, sendo esta produção energética é coordenada pelo potencial de membrana mitocondrial interno (KATO et al., 2001). Sendo assim, é indispensável que a produção energética pelas mitocôndrias, para que haja motilidade espermática (COSSON, 1996).

Segundo Kramer et al. (1993), a motilidade, o "status" mitocondrial e a integridade da membrana são fatores importantes para determinar a fertilidade, sendo complementado por

Vetter et al. (1998), que descreveram que o “status” mitocondrial pode apresentar grande utilidade em análises que envolvem componentes que podem alterar o metabolismo energético sem afetar a integridade da membrana.

Os métodos avaliativos da atividade mitocondrial incluem testes como a Rodamina 123, o JC-1 e o Mito-tracker®. Porém por utilizarem fluorescência, estes testes se tornam muito dispendiosos e pouco práticos para sua utilização rotineira, visto que o material precisa ser analisado num curto espaço de tempo (CELEGHINI et al., 2007).

Alterações na organização do material genético do espermatozoide estão relacionados a impacto na fertilidade, pois, ainda que com seu material genético fragmentado, o espermatozoide pode vir a fecundar o ovócito podendo causar problemas na prole ou mesmo em gerações futuras (HAINES, 2001).

Diversos métodos para avaliação de fragmentação de fitas de DNA espermático “in situ” foram desenvolvidos sendo que entre os principais testes avaliativos, destaca-se o ensaio SCSA (“Sperm Chromatin Structure Assay”); e o EC (Ensaio Cometa) (EVENSON; WIXON, 2006).

O Ensaio SCSA permite a análise qualitativo da integridade da cromatina espermática, definida pela susceptibilidade do DNA à desnaturação ácido-induzida “in situ” (LARSON et al., 2000). A técnica baseia-se no uso de uma solução de baixo pH, onde ocasionará a desnaturação do DNA nos espermatozoides com a cromatina alterada, alteração que não ocorre quando há cromatina intacta, e o uso de um corante fluorescente intercalante pode-se fazer a determinação através da citometria de fluxo (EVENSON; JOST, 1994).

O Ensaio Cometa baseia-se na eletroforese associada ao uso de corantes intercalantes fluorescentes, sendo o único que permite mensurar o grau de fragmentação do DNA de cada célula individualmente, além de permitir a avaliação dos danos provocados pela criopreservação e pelo estresse oxidativo sobre a célula espermático (DUTY et al., 2002).

4.3.3 Morfologia espermática

Os espermatozoides maduros são células alongadas, constituídos basicamente de três partes: cabeça, acrossomo e cauda. São recobertos pelo plasmalena, que é responsável por revestir, proteger e fazer a permeabilidade seletiva. (GENESSI et al., 1997). A cabeça da célula é oval e achatada, sendo composta por um núcleo que contém cromatina altamente condensada à base de ácido desoxirribonucleico (DNA). Devido às divisões meióticas durante a espermiogênese, os espermatozoides são células portadoras de apenas metade das células somáticas da mesma espécie, sendo, portanto, caracterizada como uma célula haploide (Hafez, 1995; GRANEMANN, 2006). Na porção anterior do núcleo espermático, há o acrossomo, formado por uma dupla camada de membrana que recobre o núcleo. Apresenta enzimas hidrolíticas importantes durante o processo de fertilização, como a acrosina e a hiduronidase. É a estrutura que inicialmente se funde com a membrana do oócito durante a fertilização. (OLIVA et al., 2009). A cauda espermática é formada por colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal. O colo é uma placa basal ajustada dentro da superfície posterior do núcleo, sendo formado por nove grosseiras fibras que se projetam ao longo da maior parte da cauda. A peça intermediária é formada por uma grande concentração de mitocôndrias em espiral, sendo elas responsáveis pela produção de energia celular necessária para a motilidade espermática e, juntamente com o comprimento total da cauda, formam o axonema. A peça principal apresenta uma associação de fibras grosseiras, sendo elas responsáveis pelo fornecimento de estabilidade dos elementos contrateis da cauda. Já a peça terminal é composta pelo axonema central e recoberta pela membrana plasmática. (Hafez, 1995; Alberts, 2004).

4.4 Taxa de fertilidade

A taxa de fertilidade em um rebanho é consequência de vários fatores, como por exemplo: qualidade seminal, manejo das éguas, escore de condição corporal e condição sanitária dos animais e também fatores ambientais. É sabido que o acompanhamento ideal do ciclo estral das fêmeas, resulta em taxas de prenhez mais satisfatórias (Van der Holst, 1984, citado por Nunes, 2006.). Rota et al. (2004) demonstraram que, sob condições adequadas de manejo, éguas

submetidas a inseminação artificial em centros especializados, apresentam taxas de prenhez maiores, cerca de 80,6% (n=31), que as obtidas a campo, 52% (n=25).

Já foi relatado por Jasko et al. (1992), que taxas de gestação obtidas com sêmen refrigerado por 24 horas são similares às atingidas com sêmen fresco, porém, após 48 horas, pode haver uma redução de aproximadamente 50%. Segundo trabalho publicado em 1984 por Douglas-Hamilton et al., a taxa de gestação usando sêmen equino refrigerado a 4°C e armazenado por 6 a 23 horas, foi de 91% ao terceiro ciclo em 46 fêmeas equinas de várias fases reprodutivas. Foi observado por Darenius em 1998, boas taxas de natalidade atingidos com o sêmen refrigerado, de 68,83%. Os resultados atingidos com monta natural foi de 69,83% e com sêmen a fresco foi 74,50%, entretanto com sêmen congelado foi inferior (56,57%).

Na literatura são encontrados vários índices que podem ser usados para expressar a fertilidade do sêmen refrigerado, como por exemplo, taxa de recuperação embrionária, taxa de natalidade, taxa de gestação por ciclo.

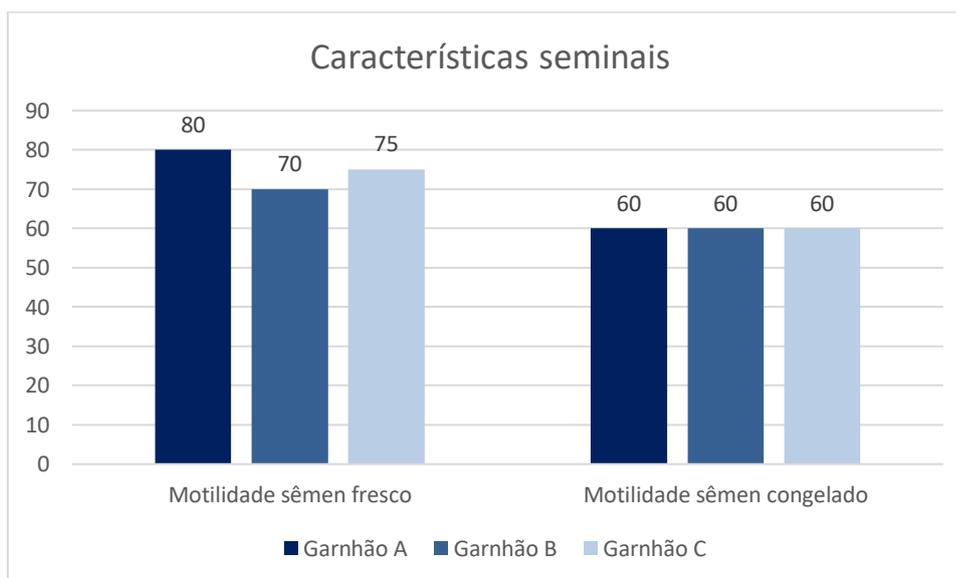
4.5 Descrição do relato de caso: Comparativo entre as taxas de fertilidade do uso de sêmen fresco e de sêmen congelado em éguas da raça Mangalarga Marchador

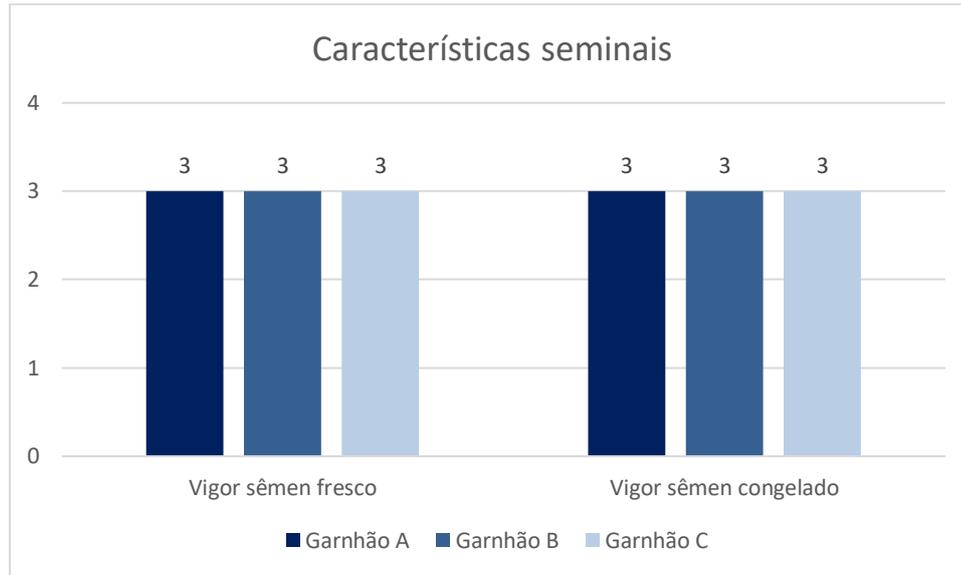
4.5.1 IDENTIFICAÇÃO

Três garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades entre sete e vinte anos, durante os meses de agosto, setembro e outubro da estação de monta 2020/2021, foram usados para reprodução, sendo o sêmen utilizado da forma a fresco e congelado em éguas doadoras de embrião e também em matrizes.

4.5.2 AVALIAÇÃO DO SEMEN FRESCO

Na avaliação do sêmen a fresco, realizada de forma subjetiva, além da avaliação macroscópica, foi avaliada motilidade e vigor, sendo encontrado no garanhão A 80% de motilidade e vigor 3; no garanhão B 70% de motilidade e vigor 3 e no garanhão C, 75% de motilidade e vigor 3.





4.5.3 AVALIAÇÃO DO SEMEN CONGELADO

Já na avaliação do sêmen congelado, também realizada de forma subjetiva, além da avaliação macroscópica, pôde ser observado, uma motilidade de 60% para os três garanhões e um vigor 3.

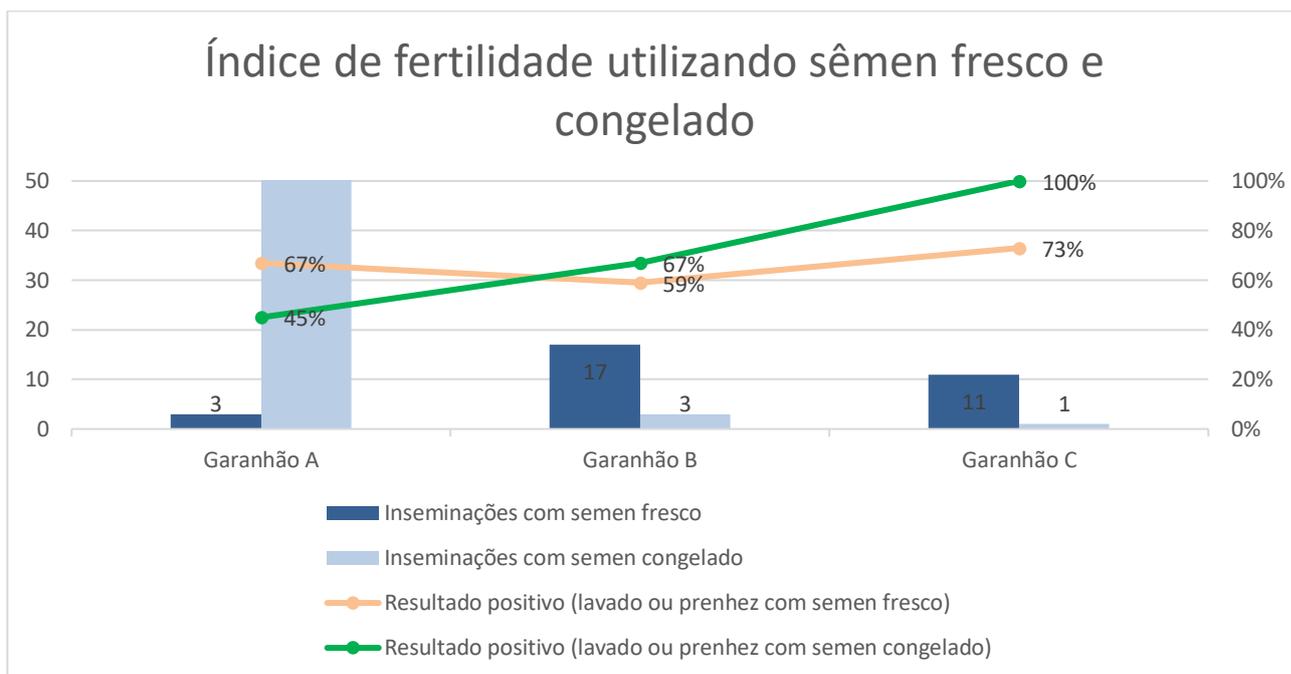
4.5.4 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Durante o período de estágio, foram realizadas um total de 91 inseminações artificiais, entre matrizes e doadoras, utilizando sêmen fresco e congelado. Dessas 91 inseminações, 59 foram do garanhão A, sendo três com sêmen fresco e 56 com sêmen congelado. Do garanhão B foram, 20 inseminações, sendo três com sêmen congelado e 17 com sêmen a fresco. E do garanhão C, foram realizadas 12 inseminações, uma com sêmen congelado e 11 com sêmen fresco. Das 91 inseminações, 13 forma feitas em matrizes e o restante em doadoras de embrião.

4.5.5 RESULTADO DE FERTILIDADE

Do garanhão A, foram realizadas 50 inseminações em doadoras, das quais 23 obtiveram lavados positivos, sendo uma inseminação com sêmen fresco e o restante com sêmen congelado e 9 inseminações em matrizes, com dois diagnósticos de gestação positivos, sendo em um deles utilizado sêmen a fresco. Do garanhão B, foram feitas 17 inseminações em doadoras, totalizando 10 lavados positivos, todos foram resultado de inseminação com sêmen fresco e três

inseminações em matrizes, com dois diagnósticos de gestação positivos, utilizando sêmen fresco. Já o garanhão C, foram 11 inseminações em doadoras, com oito lavados positivos, com apenas uma inseminação utilizando sêmen congelado e uma inseminação em matriz utilizando sêmen fresco, com diagnóstico de gestação negativo.



Assim, pode-se observar que houve uma discrepância significativa entre a quantidade de inseminações utilizando sêmen fresco e congelado nos três garanhões, sendo assim, pode-se considerar insuficiente os dados para avaliação da taxa de fertilidade dos garanhões citados. Além do que pode-se correlacionar as taxas com as características fisiológicas e possíveis patologias apresentadas no começo da estação de monta da raça avaliada. Apesar de alguns garanhões terem sua fertilidade comprometida com o processo de congelamento, e a associação com a taxa de fertilidade e a avaliação subjetiva de motilidade espermática e vigor, como citado por OLIVEIRA, (2013) e VITA et al. (2019); o número de dados citados acima, não foi suficiente para comprovar a teoria, devido às variáveis presentes principalmente no início da estação de monta.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio supervisionado obrigatório confirmou sua importância para a formação do Médico Veterinário, pois através dele, é possível vivenciar a rotina da profissão na área de interesse, tendo a oportunidade de colocar em prática os conhecimentos teóricos obtidos durante a graduação. O estágio no Haras Zel permitiu acompanhar procedimentos e técnicas que só havia tido contato teórico, possibilitando o meu crescimento profissional e também pessoal, principalmente, em relação à postura e às decisões que o Médico Veterinário deve tomar diante de alguns situações.

O acompanhamento das atividades durante o estágio só foi possível, devido ao alto nível de conhecimento dos supervisores, Pedro Costa, Francisco Ayres e Ana Caroline, e também pela disponibilidade e dom de transmitir conhecimento.

O que também ficou claro, é a necessidade de sempre estar se aprimorando e buscando novos conhecimentos, para assim, ir em busca dos melhores resultados, sempre presando pela saúde e bem-estar dos animais trabalhados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A., DELL'AQUA, J. A.; MONTEIRO, G. A.; ANCLER-SILVA, Y. F. R.; NETO, C. R. Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen equino. 2014. Disponível em: <<http://botupharma.com.br/arq/Andrologia.pdf>>. Acesso em: 21 de abril de 2021.

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

VIEIRA, J. I. T.; SILVA, T. A. W., BARBOSA, W. M. P.; LIMA, F. C. S.; SILVA, E. C. B. Influência da temperatura sobre a função testicular. Outubro 2018. Medicina Veterinária (UFRPE) 12(1):62. DOI: 10.26605/medvet-v12n1-2153.

OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A; STUMPP, T. **Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica.** O Mundo da Saúde, v.33, p.419-425, 2009.

RUSSEL, L. **The Mammalian Sertoli Cell and Its Role in Spermatogenesis.**XI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. anais - II Congresso Brasileiro de Reprodução Animal - Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995, p. 1-6.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS et al. **Organização interna da célula: Estrutura da membrana.** Biologia Molecular da Célula. 4. Ed. Porto Alegre:Artmed,2004. 1463 p.

(MORAES, I.A.)

DAYCE. **Tratado de Anatomia Veterinária.** Cap 5: Aparelho Urogenital. p. 164 – 207. 3ª edição; Ed. Elsevier.

FERNANDES, Carlos et al. **Características seminais e fertilidade em garanhões.** Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.5, p.829-834, 2002

RODRIGUES, Luis et al. **Aspectos do manejo reprodutivo de equinos**. Vol. 14, Nº 02, mar./abr. de 2017

AGNE, Gustavo. **Características seminais e fertilidade em garanhões**. CARACTERÍSTICAS SEMINAIS E FERTILIDADE EM GARANHÕES. Porto Alegre, 2011

OLIVEIRA, R.A. **Fatores que influenciam na fertilidade do sêmen equino congelado**. PUBVET, Londrina, V. 7, N. 26, Ed. 249, Art. 1648, Suplemento 2, 2013.

Medicina Veterinária • Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 71 (3) • May-Jun 2019

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