



**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO EM  
REPRODUÇÃO EQUINA NA CIDADE DE TRÊS  
CORAÇÕES- MG E REGIÃO**

**RAFAELA NEGREIROS ALVARENGA DINIZ**

**LAVRAS- MG**

**2022**

**RAFAELA NEGREIROS ALVARENGA DINIZ**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO EM REPRODUÇÃO EQUINA  
NA CIDADE DE TRÊS CORAÇÕES E REGIÃO - MG**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Colegiado do  
Curso de Zootecnia da  
Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências para  
obtenção do título de Bacharel  
em Zootecnia

**ORIENTADOR**

Prof. José Camisão de Souza, Ph.D.

**LAVRAS- MG 2022**

## Agradecimentos.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por abrir caminhos para a realização desse sonho.

Aos meus pais, Bianca, Tiago, Luciano e Cris, por não medirem esforços em me ajudar em tudo, pelo amor, companheirismo, incentivo e por acreditarem em mim.

Aos meus avós, de sangue e de criação, obrigada pelo amor incomparável e por todo apoio.

A minha bisavó Dody, gratidão por toda dedicação em sempre me agradar e me apoiar.

Aos meus irmãos Igor e Pedro, obrigada pelo companheirismo e pela amizade.

Ao meu namorado Enrique, por todo companheirismo, apoio e compreensão nessa trajetória.

Ao professor Camisão por nunca medir esforços em me auxiliar no meu crescimento pessoal e profissional. Foi uma honra ser sua orientada. Obrigada pela amizade e confiança, será sempre um grande exemplo a ser seguido.

Ao GERE e todas as pessoas que convivi nesses anos de grupo, vocês agregaram em todo meu aprendizado e nas oportunidades de ensinar aos mais novos um pouco do que aprendi.

A Médica Veterinária Giovanna S. Takakura, pela oportunidade de estágio, por todo empenho e dedicação em passar o máximo de seu conhecimento, por todas as oportunidades, pela paciência, confiança e amizade. Com toda certeza se tornou uma amiga e uma referência na reprodução equina.

Aos meus amigos e companheiros de jornada, obrigada por todo o companheirismo e trocas de ideias e experiências.

E a todos que de alguma forma contribuíram com meu crescimento profissional e pessoal.

## RESUMO

Com o decorrer dos anos o número de criadores de equinos cresceu consideravelmente. Hoje no Brasil temos em média 5.962.126 animais, sendo o estado de Minas Gerais possuindo o maior rebanho do país com 828.296 cabeças. Esse fato se deve principalmente aos criadores da raça Mangalarga Marchador que contribuem com um total de 697.688 animais distribuídos pelo país, porém com concentração maior também em MG. Entre 2018 e 2021 foram registrados na raça 40.695 nascimentos indicando que o plantel de equinos tende a crescer cada vez mais. Com o objeto de sempre melhorar a qualidade genética e índices zootécnicos de seus animais, os grandes e pequenos criadores estão investindo cada vez mais em biotecnologias aplicadas a reprodução como a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embrião (TE). Com a IA é possível realizar cruzamentos entre éguas do plantel com garanhões com qualidade superior, porém que estão localizados em outras cidades, até mesmo estados e países. Além de ser possível, com apenas um ejaculado inseminar mais de uma égua, ampliando a produção desse garanhão com a diluição e distribuição do sêmen entre diferentes criatórios. Com a TE o principal objetivo é obter mais de um produto por estação de uma mesma doadora, sem comprometer sua performance no caso de animais de competição. É possível também obter potros de éguas mais velhas, éguas com infecção uterina crônica, lesões cervicais e problemas externos, sendo esses animais incapazes de levar gestações a termo. Outro fator de grande relevância sobre as técnicas de IA e TE é a movimentação financeira que gira em torno de determinada raça e suas atividades. Na raça Mangalarga Marchador no ano de 2021, foram movimentados 25 milhões de reais em distribuição em reprodução, exposições e leilões. Um grande contribuinte dessa quantia foi a crescente melhora genética dos animais, consequência direta dos programas de IA e TE. Por isso é relevante nos atentar aos fatores que inviabilizam a qualidade desses programas, como qualidade seminal dos garanhões e tendo a endometrite como principal causa de subfertilidade e até mesmo infertilidade nas éguas. Por isso, no período de estágio foram utilizadas diferentes técnicas que buscavam sempre o melhor resultado nas TE realizadas.

**Palavras-chave: Coleta de sêmen, Endometrite, Inseminação artificial, Mangalarga marchador, Qualidade seminal, Transferência de embrião.**

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO.</b> ....	<b>7</b>
<b>2-REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1- Ciclo estral</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2- Éguas doadoras</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3- Agentes indutores de ovulação</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3.1- Gonadotrofina coriônica humana (hCG )</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3.2- Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4- Éguas receptoras.</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 Sincronização doadora-receptora.</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6 Colheita de embrião e recuperação embrionária.</b> .....	<b>12</b>
<b>2.7- Técnica de transferência de embrião- Inovulação</b> .....	<b>14</b>
<b>2.8- Diagnóstico de gestação.</b> .....	<b>14</b>
<b>2.9- Afecções uterinas- Diagnóstico e tratamento.</b> .....	<b>15</b>
<b>2.10- Anatomia testicular.</b> .....	<b>17</b>
<b>2.11- Endocrinologia do garanhão.</b> .....	<b>17</b>
<b>2.12- Espermatogênese</b> .....	<b>18</b>
<b>2.13- Anatomia do pênis e fisiologia da ejaculação.</b> .....	<b>19</b>
<b>2.14- Colheita de sêmen</b> .....	<b>20</b>
<b>2.15- Características físicas do ejaculado.</b> .....	<b>20</b>
<b>2.16- Refrigeração e transporte de sêmen</b> .....	<b>21</b>
<b>3- DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1- Propriedade 1</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2- Propriedade 2</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3- Propriedade 3</b> .....	<b>29</b>

<b>3.4- Propriedade 4.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5- Propriedade 5.....</b>	<b>35</b>
<b>4- MATERIAL UTILIZADO. ....</b>	<b>37</b>
<b>5- DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS. ....</b>	<b>37</b>
<b>5.1- Manejo de éguas doadoras. ....</b>	<b>37</b>
<b>5.2- Manejo de éguas receptoras. ....</b>	<b>40</b>
<b>5.3- Colheita de embrião. ....</b>	<b>41</b>
<b>5.4- Recuperação embrionária e diagnóstico de gestação.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5- Afecções uterinas. ....</b>	<b>47</b>
<b>5.5.1- Lavagem uterinas com peróxido de hidrogênio- água oxigenada .....</b>	<b>47</b>
<b>5.5.2- Lavagem uterina com infusão de querosene .....</b>	<b>48</b>
<b>5.5.3- Lavagem uterina com infusão de ozônio. ....</b>	<b>50</b>
<b>5.6- Colheita de sêmen .....</b>	<b>53</b>
<b>5.7- Análise seminal. ....</b>	<b>56</b>
<b>5.8- Envio de sêmen .....</b>	<b>56</b>
<b>6- Conclusão .....</b>	<b>57</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é considerado um dos grandes países criadores de cavalo no mundo, com um crescimento constante nesses números. Ocupando o terceiro lugar no ranking mundial, o país conta hoje com 5.962.126 animais por todo o território nacional. Em 2012 se teve o reconhecimento nacional de uma raça considerada originalmente brasileira o Mangalarga Marchador, animais provenientes do cruzamento das raças Alter com cavalos regionais há aproximadamente 200 anos. Por ser uma raça que tem como maior característica a docilidade e comodidade tem ganhado cada vez mais adeptos. Minas Gerais, mais precisamente o sul de Minas é considerado o berço do Mangalarga Marchador. O caminho real, fazendas históricas e centenárias, e a cultura local da região, juntamente com característica da raça tem se evidenciando cada vez mais a prática de cavalgadas como meio de passeio turístico, fomentando ainda mais o mercado.

Atualmente a raça conta com 697.688 animais registrados na associação, em que esse registro definitivo ocorre após a monta do animal, em torno dos 3 anos de idade. Em 2021 tivemos o registro de 40.695 nascimentos indicando que o plantel de equinos tende a crescer cada vez mais.

O mercado de leilões, provas, exposições, cavalgadas e turismo se mantém aquecido movimentando em 2021 um total de 25 milhões de reais, gerando emprego e oportunidades para todos envolvidos na atividade. Devido a isso os proprietários tendem a buscar melhorias genéticas e zootécnicas em seu plantel, fazendo uso das biotecnologias aplicadas a reprodução como inseminação artificial, transferência de embriões, transporte de sêmen fresco e congelamento de sêmen para o uso de sêmen congelado.

Em busca de sempre melhorar os resultados na reprodução, deve-se atentar a fatores importantes que podem alterar o rendimento das atividades, como nutrição e sanidade das éguas e garanhões em geral, qualidade seminal, vida reprodutiva da doadora, qualidade zootécnica e manejo de receptoras e afecções que podem acometer as fêmeas, como, principalmente, a endometrite.

A endometrite é a principal causa de subfertilidade e infertilidade, por isso busca-se sempre diminuir seu índice com uso de lavagens uterinas e tratamentos como a ozonioterapia.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1- Ciclo estral da égua**

O ciclo estral equino é definido como o período em que ocorrem modificações referentes ao trato reprodutivo da fêmea, no qual se repete, em média de 21 a 22 dias durante as estações de primavera e verão (SHARP et al., 1980). A estação de monta ocorre nessas estações devido à interferência do foto período, em que as fêmeas equinas são classificadas como poliéstricas estacionais de dias longos, ou seja, tem a atividade ovulatória direcionada a maior quantidade de luminosidade durante o dia (Palmer; Guillaume, 1992; Hafez; Hafez, 2000). Este ciclo é dividido em duas fases, a fase folicular (estro) e a fase luteal (diestro) (DUTRA, 2016). Fatores como idade, status reprodutivo, nutrição, condição corporal e temperatura (Nagy; Guillaume; Daels 2000; Sessions et al., 2004) são capazes de interferir no ciclo dessas fêmeas.

Na hipófise, é liberado o hormônio folículo estimulante (FSH), que estimula o crescimento dos folículos primários. No decorrer do processo de desenvolvimento e maturação folicular, juntamente com o FSH, o hormônio luteinizante (LH) atua estimulando a ovulação dos folículos maduros. A fase de estro é caracterizada pela presença de um folículo com mais de 30 mm de diâmetro em um dos ovários, o qual produz níveis elevados de estrógeno a partir das células da granulosa (JACOB, 2007), tendo como início de estro a receptividade em relação ao macho (CLAYTON et al., 1981), resultando na ovulação, e em seguida na formação do corpo lúteo, a partir da elevação dos níveis de LH. Os níveis de LH aumentam de acordo com as proporções crescentes de estradiol que os folículos ovarianos secretam, influenciando no comportamento específico do estro (MACHADO, 2004).

A duração do período do estro é bastante variável, mas em média compreende o período de sete dias, com o mínimo de dois dias e o máximo de 14 dias. Sabe-se que esta fase termina quando o animal ovula e cessam as manifestações de cio, porém, mesmo após a ovulação (12 a 48h após) a maioria das éguas ainda pode apresentar receptividade sexual (MCCUE, 2003). Após esse período, a égua volta a ficar agressiva quando um garanhão se aproxima, não aceitando mais o macho (DUTRA, 2016).

As elevadas concentrações de estrógeno são responsáveis também por expandir o edema uterino, porém a intensidade do edema é reduzida até dois dias antes da ovulação (BURATINI, 1997).

A fase subsequente ao estro compõe um período mais delimitado, com duração média de 15 dias. Essa fase é conhecida como fase luteal (diestro), sendo caracterizada pela

presença de um corpo lúteo formado a partir da ovulação antecedente (BACK et al., 1974). Nesta fase acontece a produção de progesterona (P4), responsável pela manutenção inicial da gestação. Independente da presença de folículos em crescimento secretando estrógeno, a P4 é o hormônio predominante no diestro, promovendo alterações no trato reprodutivo da fêmea, preparando o mesmo para o decorrer da gestação (SAMPER, 2008).

A fase de diestro finaliza quando há luteólise ou regressão do corpo lúteo (CL), que acontece quando o endométrio libera prostaglandina, que pela circulação sistêmica é conduzida até o ovário que contém o corpo lúteo (GINTHER, FIRST., 1971). Na ausência de um concepto no útero, a prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) induz a luteólise. Quando há presença de concepto no útero, haverá bloqueio da luteólise ou prolongamento dessa fase (ALLEN, 2005).

## **2.2- Éguas doadoras**

O foco principal da transferência de embrião é a genética de éguas doadoras de oócitos, consideradas de melhor qualidade genética e zootécnica. Vários são os critérios para a seleção dos animais, tais como valor de interesse zootécnico, registro definitivo e diretrizes na raça trabalhada, histórico reprodutivo, valor da égua e de seus produtos, premiações em competições e demanda do mercado (Evangelista, 2012).

Para uma Inseminação de qualidade, em busca de bons resultados, o manejo de controle do ciclo estral da égua doadora é fundamental, incluindo palpação transretal, ultrassonografia para acompanhamento das atividades foliculares e detecção de possíveis impasses que possam atrapalhar a inseminação e posteriormente o lavado positivo do embrião.

Como na maioria das vezes é utilizado sêmen de garanhões que não estão presente na propriedade, saber o momento de induzir a égua para inseminar é fundamental para toda a logística do processo.

O objetivo de induzir a ovulação é ter um maior controle do ciclo estral, reduzindo o período do estro e sincronizar o momento da inseminação mais próximo possível da ovulação. (MEZALIRA, 2018). O intervalo de inseminação é variável de acordo com o sêmen utilizado, em caso de sêmen fresco ou refrigerado, a ovulação pode ocorrer até 48 horas após a realização da inseminação (BERGEFELT, 2009), já em sêmen congelado, o ideal é que a inseminação seja realizada o mais próximo possível da ovulação, em até 6 horas antes ou 6 horas depois da ovulação (MILLER, 2008).

Diversos são os indutores de ovulação disponíveis no mercado, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), o GnRH (DUCHAMP et al., 1987) e seus análogos, sendo eles: a deslorelina (FARIA, GRADELA., 2010), a buserelina (BARRIERBATTUT et al., 2001), e a histrelina (GRECO, 2016). Dentre estes, os dois principais agentes indutores da ovulação mais usados em equinos são a hCG e a deslorelina (FARIAS et al., 2016). Essa indução deve ocorrer com a presença de no mínimo um folículo dominante, com diâmetro de 35mm por 35mm e edema uterino grau 3 (Evangelista, 2012).

## **2.3- Agentes indutores de ovulação**

### **2.3.1- Gonadotrofina coriônica humana (hCG)**

O hCG tem a função semelhante do LH, sendo um hormônio peptídico produzido pela placenta humana (GRECO, 2012). A partir de sua administração, o hormônio tem a capacidade de induzir a ovulação entre o período de 36 a 48 horas (BERGEFELT, 2000).

Esse hormônio é um estimulante de receptores foliculares e sua administração induz a ocorrência de um pico de LH, promovendo a maturação oocitária e folicular, além da indução da ovulação (Evans, 2006).

### **2.3.2- Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH)**

O GnRH é um hormônio sintetizado e armazenado no hipotálamo sendo o indutor que faz a ligação dos sistemas nervosos e endócrinos, pois quando ocorre a estimulação nervosa referente a esse hormônio, pulsos de GnRH são ativados no sistema porta-hipotálamo-hipofisário-gonadal, induzindo a liberação de LH e FSH ao atuar na hipófise anterior ou adenohipófise (HAFEZ; HAFEZ., 2004).

O GnRH geralmente é utilizado como um substituto potencial do hCG, induzindo folículos pré-ovulatórios (FLEURY et al., 2003). Análogos do GnRH são mais utilizados devido ao tempo de meia vida mais longa, sendo mais eficientes para a indução da ovulação, entre os mais utilizados está a deslorelina (FARIAS et al., 2016).

Em relação à dosagem de deslorelina, Fleury et al. (2004) indica que dosagens entre 0,5 ml a 1,0 mg tem resultados semelhantes, promovendo a ovulação entre 40 a 50 horas após sua aplicação. Já Squires et al. (2003), ao administrar 1 ml em fêmeas que seriam inseminadas com sêmen congelado teve a ovulação em um período médio de 36 a 46 horas após a indução.

## **2.4- Éguas receptoras**

As receptoras de embriões levam consigo uma grande importância para o sucesso dos programas de TE, pois são elas que irão reconhecer o embrião e fornecer condições necessárias para seu desenvolvimento e levar a gestação a termo (Fleury et al., 2007). Por isso, a seleção e manejo dessas receptoras é de importância fundamental nesse processo (Vanderwall & Woods, 2007).

Critérios de seleção incluem peso adequado, de 400 a 500 Kg, idade do animal entre 3 a 10anos, ciclo estrais normais, conformação física deve ser semelhante à égua doadora, indicando bom escore de condição corporal, habilidade materna, e histórico satisfatório (Evangelista (2012). Por isso, em muitos casos se utilizam animais da mesma raça, ou raças semelhantes (Alvarenga et al., 2008).

O manejo sanitário das receptoras também merece bastante atenção, sendo fundamental que toda a vacinação necessária esteja em dia, não tenham doenças infectocontagiosas, como, Leptospirose, Mormo, Anemia Infecciosa Equina, entre outras. Devem também estar livres de endo e ectoparasitas, (Alvarenga et al. 2008).

Esse grupo de éguas também devem ser examinadas diariamente, se possível, para detecção e identificação da fase do ciclo estral em que cada animal se encontra, monitorando sempre o crescimento folicular, ovulação e qualidade uterina (McKinnon & Squires, 2007).

No momento da ovulação Carnevale et al., (2000) classificou através de palpação retal e ultrassonografia éguas aceitáveis para transferência de embrião quando as mesmas apresentavam corpo lúteo bem definido, tônus uterino e cervical variando de bom a excelente, e nenhuma outra alteração uterina.

## **2.5- Sincronização doadora- receptora**

A sincronização entre doadora e receptora é um ponto fundamental para a transferência de embrião ocorrer de forma adequada, pois a falta de sincronia pode resultar em mortalidade embrionária (EVANGELISTA, 2012).

Essa evento pode ocorrer de duas formas, com o cio natural da receptora, ou com a terapia hormonal. Com a terapia as chances da sincronização ocorrer são mais satisfatórias. O ideal é que se tenha, no mínimo, duas receptoras para cada doadora, assim,

a probabilidade de se ter uma receptora adequada para receber o embrião é maior (SILVA, 2014).

Para realizar a sincronização, a prostaglandina é bastante utilizada em cio em fêmeas equinas, mas a resposta a este agente luteolítico é dependente da existência de um corpo lúteo funcional, levando em consideração que o CL só se torna responsivo a prostaglandina a partir do quinto dia após a ovulação. A utilização da prostaglandina, associados a administração de indutores de ovulação, são bastante utilizados para a preparação de receptoras nos programas de transferência de embriões, dessa maneira se tem o controle do cio estral da receptora (MEIRA, 2007).

Os embriões são carreados da tuba uterina para o útero entre o quinto e o sexto dia após a ovulação. Preconiza-se que a coleta de embriões seja realizada entre o sexto e o nono dia de gestação, sendo que o período ideal é entre o sétimo e o nono dia após a fertilização (LIRA et al., 2009). Geralmente, consideram-se como sincronizadas as receptoras que ovulam um dia antes até no máximo três dias após a doadora, verificando-se que melhores condições do ambiente uterino para estabelecimento e manutenção da gestação (SILVA, 2014).

## **2.6- Colheita de embrião e recuperação embrionária**

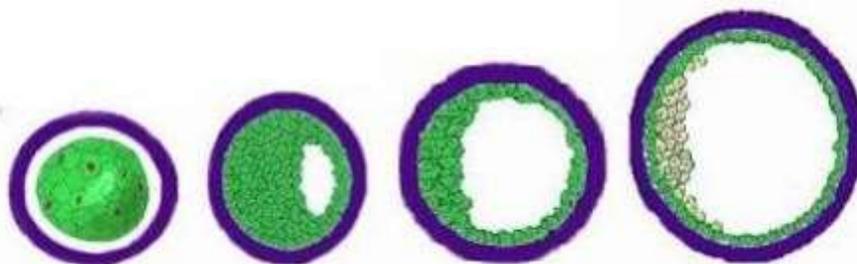
O oócito da égua equina é fecundado na tuba uterina e transportados para o útero entre o quinto e sexto dia após a ovulação e fecundação, e se encontram na fase de mórula compactada para blastocisto inicial (Hafez & Hafez 2004). Essa característica permite que a colheita do embrião seja viável do sexto ao nono dia após a ovulação (Alvarenga et.al., 2008) em que o ideal seja no sétimo e oitavo dia. A indicação para que os embriões sejam recuperados no sexto dia é para o seu congelamento, pois ainda se encontram na fase de mórula (Squires & Seidel, 1995). Já no nono dia para aqueles embriões que foram oriundos de inseminação artificial com sêmen congelado, que naturalmente seu tamanho é reduzido em aproximadamente 1 dia, devido à inseminação ser realizada após a ovulação, e a descida do embrião para o útero ser mais tardia (Cuervo-Arango et al., 2009).

Para a recuperação do embrião se utiliza uma sonda transvaginal com a presença de um balonete que é inflado anteriormente a cérvix para realizar a lavagem uterina (Fleury et al., 2001). Uma vez que a sonda é inserida no corpo do útero, lava-se o útero com solução de Ringer com lactato de 3 as 4 vezes, com infusão de 1 litro por vez (Alvarenga et al., 1992).

A manipulação do embrião é subjetiva e relativamente simples, no qual o rastreamento do embrião é realizado por uma lupa de aumento de 10 a 40 vezes. A placa de petri deve estar previamente riscada, auxiliando na localização do embrião. Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 ml, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de cultura, no qual esse embrião será lavado nesse meio por 10 vezes consecutivas (Alvarenga et.al., 2008).

A qualidade do embrião e seu grau de desenvolvimento é fundamental para uma transferência segura. Com 6 dias após a fertilização o embrião se encontra na fase de mórula, com presença de zona pelúcida e delimitação evidente e blastômeros tomando boa parte do espaço perivitelínico. Com 7 dias o embrião atinge a fase de blastocisto inicial, podendo observar a blastocele e, cavidade que está situada internamente ao longo das células do trofoblasto, também sendo observável a massa celular interna e a cápsula embrionária, peculiar dos equinos, bem definida. Com 7,5 dias o blastocisto expande, sendo possível a distinção do trofoblasto, do botão embrionário e do blastocele (Alvarenga et.al. 2008).

Figura 1: Estágio de desenvolvimento embrionário.



Legenda: Da esquerda para direita: mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido.

Fonte: Fleury (2000).

Em cada estágio de desenvolvimento os embriões são classificados em relação a parâmetros de qualidade. Embriões com escores de qualidade pobres ( $\geq 3$ ) resultam em baixa taxa de prenhez (Squires & Seidel, 1995). Embriões que são menores que o normal para a idade deles, ou têm anormalidades morfológicas, também resultam em taxas de prenhez reduzidas (Squires et al., 2003).

**Tabela 1** - Critério de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.

Classificação	Qualidade
<b>Grau 1</b>	<b>Excelente</b> - Ideais, esféricos, com tamanho, cor e textura uniformes
<b>Grau 2</b>	<b>Bom</b> - Pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação de trofoblasto
<b>Grau 3</b>	<b>Razoável</b> - Problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocelo colapsada
<b>Grau 4</b>	<b>Pobre</b> - Blastocelo 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 degenerado

Fonte: McKinnon & Squires, 1988

## 2.7- Técnica de transferência de embrião- Inovulação

Com o advento de novo estudos, a técnica mais utilizada hoje em dia é a inovulação, que tem como base a avaliação da receptora, sendo pouco invasiva e de alto percentual de sucesso (Fleury et al., 2007).

Consiste no envase do embrião em pipeta plástica igualmente de inseminação artificial. Se alternam proporções de meio de cultivo e ar, juntamente com o embrião, com o objetivo de menor movimentação do embrião dentro da mesma e assegura a perfeita deposição do embrião no corpo do útero. Emprega-se uma bainha plástica sobre a pipeta, que será rompida na entrada na cérvix, evitando passar para o útero qualquer tipo de contaminação (Silva, 2003).

## 2.8- Diagnóstico de gestação

O estabelecimento de gestação no animal ocorre quando o conceito inibe a regressão do corpo lúteo, impedindo a produção de Prostaglandina e o retorno do animal ao estro (HAFEZ, 1987).

O embrião equino tem a chega ao útero a partir do 5º e do 6º dia pós a IA, através da migração no lúmen se inicia o processo de reconhecimento materno da gestação (Hafez & Hafez 2004).

Nas éguas, o reconhecimento materno da gestação ocorre, principalmente pela mobilidade embrionária no útero, pois acredita-se que durante a migração do conceito o mesmo secreta pequenas quantidades de PGF2 $\alpha$  e PGE2, possivelmente responsável pelo estímulo local para as contrações miométriais que movimentam o embrião (STOUT; ALLEN, 2011a). Essas substâncias são antiluteolítica, inibindo a secreção pulsátil de prostaglandina F2 $\alpha$  pelo endométrio, evitando a lise do corpo lúteo (ALLEN, 2005).

O término da fixação se refere ao término da mobilidade embrionária, ocorrendo pelo 16º dia (GINTHER, 1995). Nesse momento o embrião se fixa na parede do endométrio, elevando o tônus uterino e reduzindo o padrão de contratilidade (Gastal et al., 1996).

O diagnóstico de gestação pode ser realizado através da palpação retal, observando modificações uterinas, como aumento do corno gestante e aumento do tônus uterino. Esse método pode ser realizado de forma precisa a partir dos 25 dias após a ovulação (SIMPSON et al 1982). Porém, com esse método é muito difícil a detecção da vesícula embrionária, ou diferenciar quando forem gemelares.

A ultrassonografia é o método de diagnóstico que permite a detecção da prenhez precoce, em torno de 10 dias pós ovulação, sendo possível visualizar a vesícula esférica não-ecogênica com 10 a 15 mm de diâmetro (De LaCorte et al., 1994). Além de avaliar certas anormalidades que eventualmente podem ocorrer em uma gestação, e também gestação gemelar.

Deve-se realizar o exame novamente após os 60 dias de gestação, com o objetivo de reconfirmação da prenhez através da visualização de batimentos cardíacos. É possível também realizar a sexagem fetal.

## **2.9- Afecções uterinas- Diagnóstico e tratamento**

São diversas as afecções que podem acometer e interferir no estado de saúde reprodutivo dos equinos, e se tratando do útero, a que mais incide é a endometrite, sendo a principal causa de subfertilidade e infertilidade (OVERBECK et al., 2011; RASMUSSEN et al., 2015).

A endometrite é caracterizada por uma inflamação aguda, crônica ou degenerativa do endométrio (Kenney, 1992). Devido a essa inflamação, alguns animais apresentam acúmulo de líquido no útero, podendo estar associada a contaminação bacteriana ou fúngica (LeBLANC e CAUSEY, 2009). A bactéria mais frequentemente associada à falha reprodutiva em éguas é a *Escherichia coli*, seguida pelo *Streptococcus beta hemolítico* como o segundo mais frequente (ALBIHN et al., 2003) e em terceiro os fungos foram os microrganismos mais encontrados em éguas com problemas de fertilidade segundo (Albihn e colaboradores (2003). Durante a cobertura ou inseminação artificial, a deposição do sêmen ocorre de forma intrauterina, fazendo com que o útero das éguas seja exposto a microrganismos induzindo uma resposta inflamatória fisiológica e transitória conhecida como endometrite pós-cobertura (KOTILAINEN, 1994; TROEDSSON, 2000).

Após o contato do sêmen com o endométrio, é iniciado um processo inflamatório fisiológico (KATILA, 2012). O objetivo desta resposta é eliminar o excesso de espermatozoides não viáveis, plasma seminal e contaminantes, evitando prejudicar o transporte de espermatozoides viáveis, a fertilização e antes também que o embrião adentre o útero aos 5,5 dias após a ovulação, aproximadamente (LeBLANC e CAUSEY, 2009). Em condições normais de saúde do animal, essa resposta ocorre, em média 96 horas após o início do processo inflamatório.

Foi observado que éguas inseminadas com sêmen congelado eram mais susceptíveis a endometrite pós inseminação artificial. Watson, 2000b; Troedsson et al., 2001 e Kotilainen, 1994 indicam que fatores como, idade das éguas, hipersensibilidade a alguns componentes do diluidor, já que o diluidor de sêmen congelado contém gema de ovo e glicerol, remoção do plasma seminal durante o processo de criopreservação levando a uso de pequenos volumes com elevadas concentrações espermática, são fatores que podem favorecer a incidência dessa endometrite. A liberação enzimática de células danificadas durante o processo de criopreservação também indica uma maior resposta inflamatória. De acordo com Fiala et al., 2007, a quantidade de neutrófilos no útero vinte e quatro horas depois é maior nas éguas inseminadas com dose de 1 bilhão de espermatozoides quando comparada as éguas inseminadas com dose menores de 100 ou 500 milhões de espermatozoides. Assim, sugere que a deposição de sêmen com maior número de espermatozoides lesados, promova maior resposta inflamatória uterina. Outro fator sugerido por Reilas, 2001 é que como a inseminação é realizada próximo ao momento da ovulação, sendo o período de tempo de fechamento da cérvix menor, o que impediria que éguas susceptíveis eliminassem o material inflamatório em tempo adequado.

Éguas normais conseguem debelar a inflamação entre 24 a 96 horas após a cobertura (KATILA, 1995) e nas susceptíveis a inflamação persiste por mais de cinco dias após a inseminação (CAUSEY, 2006). Quando ocorre falha no sistema de defesa uterino a inflamação torna hostil o ambiente uterino, inviabilizando a gestação (LEBLANC, 2003).

Nos casos de endometrite com sinais clínicos evidentes, é possível constatar ao exame ultrassonográfico o acúmulo de líquido intrauterino, bem como as características do conteúdo através da ecogenicidade. Dobras endometriais intensas indicam edema patológico do endométrio e alta correlação com baixas taxas de prenhez (ADAMS et al., 1987). Rasmussen e colaboradores (2015) demonstraram que éguas portadoras de

endometrite apresentam edema uterino exacerbado quando comparadas às éguas clinicamente normais.

Assim, tratamentos são feitos com o objetivo de tratar e prevenir essas patologias, antes que se instalasse um problema maior. As lavagens uterinas devem ocorrer durante o período de estro, em que a cérvix se encontrava relaxada e aberta, facilitando a passagem da sonda e drenando o conteúdo uterino, com posterior aplicação de ocitocina para auxiliar na drenagem mecânica desse líquido para o meio externo, através das contrações uterina provocadas pelo medicamento. Segundo Brinsko et al (1991), as lavagens uterinas com aplicação de ocitocina podem ser realizadas quatro horas após a inseminação artificial ou monta natural sem efeitos maléficos nas taxas de prenhez.

## **2.10- Anatomia testicular**

Em condições normais, um garanhão possui dois testículos localizados na região inguinal, no qual cada um tem formato elipsoide, orientados longitudinalmente no eixo horizontal com um cordão espermático localizado crânio-dorsal. O funículo espermático é recoberto pela túnica albugínea e contém a artéria testicular, plexo pampiniforme e ducto deferente (LOVE, 1992, TURNER, 1998). A artéria testicular forma ramificações sobre a superfície do testículo, estes ramos se estendem para o parênquima testicular e retornam para o plexo pampiniforme do funículo espermático em direção à cavidade (TURNER, 1998). A região cranial do testículo é ligeiramente mais elevada que a porção caudal (LOVE, 1992).

## **2.11- Endocrinologia do garanhão**

Para que ocorra uma adequada produção de espermatozoides de forma contínua, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal necessariamente precisa estar em sincronia, para que os hormônios envolvidos em todo o processo sejam liberados adequadamente (ALMEIDA, 2004).

O hipotálamo, localizado no diencéfalo, é responsável pela liberação de GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofinas). O GnRH vai até a hipófise estimular a secreção de gonadotrofinas FSH- hormônio folículo estimulante e de LH- hormônio luteinizante. Ambos os hormônios atuam nas células de Leydig e células de Sertoli, controlando a quantidade e qualidade das células espermáticas produzidas, e são essas células responsáveis pela produção de hormônios esteroides, estrógeno e testosterona, que participam da formação dos espermatozoides.

No testículo, as células de Leydig são estimuladas pelo LH a produzir e secretar estrógeno e testosterona, que estão diretamente relacionados à qualidade espermática. Já as células de Sertoli são estimuladas pelo FSH a secretar inibina, ativina e proteínas ligadoras de andrógeno (ABP) (ROSER, 2001).

Nos equinos, diferentemente das outras espécies, os machos produzem uma elevada quantidade de estrógeno que são responsáveis pela maturação funcional dos espermatozoides, além do desenvolvimento das células de Leydig (HOFFMANN & LANDECK, 1999). Por isso, caso ocorra uma baixa nos níveis de FSH, não irá ocorrer interferência direta na qualidade espermática, pois a testosterona e o estrógeno isoladamente são capazes de manter a qualidade da espermatogênese (INOUE et al, 1993).

## **2.12- Espermatogênese**

O processo denominado espermatogênese consiste na divisão e diferenciação de células para a produção dos espermatozoides nos túbulos seminíferos. O epitélio seminífero é composto por células de Sertoli e células germinativas em desenvolvimento (JOHNSON et al., 1997; JOHNSON et al., 2000).

As espermatogônias são as primeiras células da divisão para a formação do espermatozoide e estão localizadas na porção basal do epitélio seminífero, sustentadas pelas células de Sertoli (JOHNSON et al., 1997). As espermatogônias dividem-se várias vezes por mitose originando os espermatócitos, que por meiose seguida de mitose, formam quatro espermátides. Posteriormente estas sofrerão modificações progressivas originando os espermatozoides, sendo esta última etapa denominada espermiogênese (JOHNSON et al., 2000).

Detalhadamente a espermatogênese é dividida em três fases. A primeira fase chamada proliferativa onde as células se encontram na fase de célula germinativa passando por mitose I e formando as espermatogônias que em seguida passam por mitose II, se dividindo novamente e mantendo o mesmo material genético, se diferenciando em espermatócitos primários. Cada espermatogônia se torna um espermatócito primário. Na segunda fase ocorre meiose I e II onde os espermatócitos primários entram em meiose I ocorrendo a divisão e redução do material genético formando os espermatócitos secundários. Os espermatócitos secundários passam pela meiose II se dividindo e formando as espermátides haploides. Já na terceira e última fase ocorre a diferenciação em que nesse momento os espermatozoides sofrem alterações estruturais, perdendo a

forma redonda, adquirindo flagelo e reduzindo o citoplasma. Assim o espermatozoide está apto para se movimentar, devido ao flagelo e a sua redução de peso (perda do citoplasma).

Ao final da espermatogênese os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (JOHNSON et al., 1997; JOHNSON et al., 2000), nesta fase estes possuem flagelo, porém estas células ainda são imóveis e inférteis (BARTH & OKO, 1989).

À medida que passam pelo epidídimo, os espermatozoides sofrem importantes alterações morfofuncionais (BARTH e OKO, 1989). O epidídimo é um órgão alongado, enovelado, localizado na superfície do testículo (SULLIVAN et al., 2005). Ele pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: cabeça, onde há absorção de fluidos (MARENGO, 2008); corpo, onde os espermatozoides passam a apresentar capacidade fecundante, e cauda, cuja função básica é o armazenamento e a manutenção de espermatozoides maduros (SHIVAJI, 1988).

Estudos indicam melhores taxas de fertilização utilizando espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo, quando comparado a amostras colhidas da cabeça e do corpo epididimário (YOUNG, 1931; ORGEBIM-CRIST, 1969; HOLTZ e SMIDT, 1976).

Após a maturação os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo e, ao saírem da mesma, entram em contato com as secreções das glândulas anexas que, por sua vez, estimulam a motilidade inicial dos espermatozoides (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

### **2.13- Anatomia do pênis e fisiologia da ejaculação**

A cópula resulta de mecanismos reflexos integrados à ereção, emissão e ejaculação.

O pênis do equino é classificado como musculocavernoso e pode ser anatomicamente dividido em base, corpo e glândula. Os corpos cavernosos do pênis estão rodeados pela túnica albugínea. O corpo esponjoso é uma pequena área de tecido que circunda a uretra ao longo do corpo do pênis e continua até a glândula (TURNER, 1998).

A ereção caracteriza-se pelo enrijecimento do pênis, desencadeado pela estimulação psíquica do córtex cerebral ou estímulos sensoriais na glândula do pênis (AMANN, 1993). Impulsos parassimpáticos sacrais da medula espinhal promovem a vasodilatação arterial e arteriolar, simultaneamente a rede venosa contrai aprisionando o sangue nos corpos cavernosos e esponjosos do pênis (McDONNELL, 1992). Além disso, existe um aumento do tônus dos músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso e uretral levando à compressão da rede venosa contra o arco isquiático, favorecendo a ereção (AMANN, 1993).

A emissão é a liberação de espermatozoides e fluídos das glândulas acessórias para a uretra conhecido como ejaculação. Esse processo ocorre pela contração da musculatura lisa da parede da cauda do epidídimo, ducto deferente, ampola, glândula vesicular, glândula prostática e possivelmente glândula bulbouretral, com consequente liberação de fluidos e espermatozoides dentro da uretra. O reflexo de emissão está envolvido com estimulação de fibras pré-ganglionares simpáticas das regiões lombares e sacrais (McDONNELL, 1992).

#### **2.14- Colheita de sêmen**

A recuperação de células espermáticas pode ser obtida por várias técnicas como vagina artificial (PICKETT, 1993), estimulação manual (McDONNELL & LOVE, 1990), ejaculação química (JOHNSTON & DeLUCA, 1998; McDONNELL, 2001) e colheita de espermatozoides cauda do epidídimo (MONTEIRO, 2010).

A vagina artificial é o método mais utilizado em equinos, e, consiste em um tubo rígido envolto internamente por uma mucosa de látex. Entre o tubo rígido e a mucosa de látex é adicionado água a temperatura de 42°C a 45°C e ar na tentativa de uma maior proximidade com a sensação térmica da monta natural. Por dentro, em contato com a mucosa de látex é colocada uma mucosa plástica onde será acoplado o copo coletor com a presença do filtro (PICKETT, 1993). Para realizar a coleta pode ser usado manequim artificial ou em uma égua devidamente contida. O pênis do garanhão deve ser higienizado de forma adequada com água e posteriormente é feita a secagem da região com papel descartável. Vale ressaltar que não se utiliza lubrificante.

Nos equinos, após a colheita, o gel presente no ejaculado é descartado (PICKETT, 1993).

#### **2.15- Características físicas do ejaculado**

De acordo com Pickett, 1992, após a colheita do sêmen, algumas características físicas e visuais do ejaculado são observadas, como volume, aspecto, motilidade, vigor e concentração.

O volume é expresso em mililitros (ml), sendo um valor relativo de acordo com a raça, regime de serviços, tempo de excitação, frequência e método de coleta, em que na vagina artificial é o método que apresenta valores mais próximos dos fisiológicos. Nos equinos que apresentam o gel, os valores devem ser analisados após a retirada do gel pelo filtro acoplado no copo coletor e podem variar de 20 a 80 ml (PICKETT, 1993).

O aspecto é a avaliação visual que indica a cor e a aparência do ejaculado, sendo diretamente influenciável pela concentração de espermatozoides e eventual presença de sangue, pus e urina. Nos equinos a aparência ideal é branco acinzentado (PICKETT, 1993).

A motilidade é expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozoides que apresentam movimento, sendo uma avaliação subjetiva, podendo variar de acordo com o treinamento do técnico responsável. Os valores de motilidade total e motilidade progressiva devem ser atribuídos separadamente, em que motilidade total são todos os espermatozoides em movimento, enquanto a motilidade progressiva indica apenas a quantidade de espermatozoides com movimentos retilíneos para frente (PICKETT, 1993).

Vigor representa a força do movimento que acaba influenciando a velocidade com que os espermatozoides se movimentam. O mesmo é classificado de zero a cinco, onde zero indica a ausência de movimento e cinco indica movimentos vigorosos e velozes, geralmente esses movimentos são progressivos (PICKETT, 1993).

A concentração representa o número de espermatozoides por ml. O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática é a contagem na câmara de Neubauer e espectrofotometria. Para o cálculo na câmara de Neubauer deve-se diluir em solução salina na porção de 1/20 o sêmen coletado e analisado em microscópio ótico na lente de aumento de 10 a 40 vezes. Ao fim da contagem se utiliza a seguinte fórmula: CE= ao número de espermatozoides que foram contados sobre altura a câmara e lamínula (1/10) vezes diluição utilizada (1/20) vezes os cinco quadrados que foram contados na câmara (5/25). Ao fim, para converter para ml se multiplica o resultado por 1000. Ou seja, CE=  $\frac{\text{.....n.....}}{1/10 * 1/20 * 5/25} = X * 1000$  (PICKETT, 1993).

$$1/10 * 1/20 * 5/25$$

## **2.16- Refrigeração e transporte de sêmen**

A utilização da biotecnologia de sêmen refrigerado equino intensificou-se nos últimos anos. Isto ocorreu devido maior aceitação nas associações de criadores de cavalos, além da maior flexibilidade para colheita e transporte do sêmen (PICKETT, 1992).

A manutenção de espermatozoides em baixas temperaturas tem a capacidade de reduzir a atividade metabólica e conseqüentemente diminuir a produção de subprodutos, proporcionando maior viabilidade espermática (ALTHOUSE et al.,1998).

Os diluidores de sêmen são soluções importantes na proteção dos espermatozoides em condições desfavoráveis e em prolongar sua sobrevivência durante a refrigeração e o

transporte (DARENIUS, 1998).

O sêmen deve ser diluído com no mínimo 2 partes do meio diluente para 1 parte de sêmen, visando sempre manter na concentração entre 20 e 50 milhões de espermatozoides viáveis por ml. As amostras serão refrigeradas em caixas próprias para tal, como a Botuflex da Botupharma, e ficarão em sistema de refrigeração de 15°C e 5°C devem ser utilizadas no período máximo de 24 e 48 horas, respectivamente (PICKETT, 1993).

### **3. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO**

O estágio supervisionado foi realizado sob orientação da Médica Veterinária Giovanna S. Takakura, mestre pelo programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia em Produção e Reprodução animal pela Universidade Federal de Lavras, no período de 01 de novembro de 2021 a 01 de janeiro de 2022.

As seguintes atividades foram desenvolvidas: manejo reprodutivo de doadoras e receptoras através de palpação e ultrassonografia transretal, inseminação artificial utilizando sêmen resfriado e congelado, transferência de embrião e tratamentos de afecções uterinas. Além de colheita, envase e envio de sêmen.

Tais atividades foram desenvolvidas em cinco propriedades, propriedade 1 em Campanha, propriedade 2 em Varginha, propriedade 3 em Carmo da Cachoeira, propriedade 4 e 5 em Três corações.

#### **3.1- Propriedade 1.**

A propriedade 1 fica localizada na cidade de Campanha sendo uma propriedade destinada apenas a criação de equinos. Nela se encontram doadoras, receptoras e garanhões. Ao todo a propriedade é composta por grandes pastos e 11 piquetes de 25m X 35m, separados por um corredor de 2 metros de distância.

Doadoras e receptoras são divididas em seus respectivos lotes e alojadas em piquetes formados de forrageira *BRS Tamani*. Esse capim é a primeira cultivar híbrida lançada pela Embrapa é resultado do cruzamento entre a planta sexual S12 e o apomítico T60 (BRA-007234) e foi realizado na Embrapa Gado de Corte a partir de 1992. A cultivar foi selecionada com base no seu porte baixo, abundância de folhas e perfilhos, produtividade, vigor, valor nutritivo (elevados teores de proteína bruta e digestibilidade), resistência à cigarrinha-das-pastagens e facilidade e flexibilidade de manejo e é indicada para diversificação das pastagens (embrapa, 2015), sendo um capim que apresentou excelente resposta nutricional dos animais.

Os garanhões são alojados em piquetes também de 25m por 35m e tem o fornecimento do capim *BRS Tamani* diariamente misturado com ração farelada e sal equino. Para o fornecimento dos alimentos tem no piquete uma área coberta que protegeo alimento fornecido, a água e também serve de abrigo nos períodos de chuvas.

Figura 2: Piquete onde fica um dos garanhões.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 3: Parte coberta do piquete



Fonte: Do Autor (2021)

Figura 4: Imagem panorâmica do piquete



Fonte. Do Autor (2021).

Figura 5: Cocho de fornecimento de capim, ração farelada e sal.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 6: Cocho para fornecimento de água.



Fonte: Do Autor (2021).

Para avaliação ultrasonográfica dos animais, a propriedade conta com uma estrutura fechada que composta por: um tronco de contenção individual, um ambiente de espera caso precise separar o potro da mãe, laboratório e na parte de tras quatro baias que não são utilizadas.

Figura 7: Parte externa do local onde realiza os exames reprodutivos.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 8: Tronco individual.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 9: Local de espera.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 10: Imagem panorâmica do troco de palpação e local de espera. Ao fundo (parede vermelha) estão localizadas as 4 baias. No corredor a direita está localizado o laboratório.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 11: Imagem interna do laboratório.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 12: Imagem externa das quatro baias.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 13: Imagem interna de uma das quatro baias. (Tais baias não são utilizadas)



Fonte: Do Autor (2021).

### **3.2- Propriedade 2.**

A propriedade 2 está localizada na cidade de varginha e é sócia da propriedade 4, por esse motivo as éguas da propriedade 2 se encontram na propriedade 4. Assim, as atividades exercidas no local eram apenas colheita de semên para utilização nas propriedades e envio comercial das doses.

Figura 14: Colheita de semên equino.



Fonte: Do Autor (2021).

### **3.3- - Propriedade 3.**

A propriedade 3 se encontra em Carmo da Cachoeira e tem suas atividades na criação equina e cafeicultura.

Na propriedade eram realizadas todos os manejos reprodutivos em um só local, colheita de sêmen, e acompanhamento reprodutivo das doadoras e receptoras.

Conta também com um laboratório amplo e adequado para manuseio de embriões.

Os garanhões ficam em baias e são soltos através de um revesamento entre os 3 garanhões da fazenda.

Para a colheita de sêmen, os garanhões são destinados ao curral onde ocorre a coleta.

Figura 15: Colheita de sêmen.



Fonte: Do Autor (2021).

Já as éguas ficam soltas em pastos de Tifton 85 com água e sal *ad libitum*, divididas em lotes de receptoras vazias, com potro ao pé, doadoras e gestantes.

Para análise das doadora e receptoas, as éguas eram dispostas em lanchonetes de 2m X 0,70m, com a observação que poderia ser de 1,70m X 0,70m.

Figura 16: Avaliação das doadoras e receptoras em lanchonetes.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 17: Foto panorâmica da lanchonete.



Fonte: Do Autor (2021).

### 3.4- Propriedade 4.

Essa propriedade está localizada em Três Corações, é destinada a criação de equinos, pôneis e mini vacas.

As éguas doadoras ficam em baias durante todo o dia e noite. Essas baias são abertas as 7 da manhã e fechadas as 16 horas. Esse galpão é composto por duas baias de garanhão e doze baias de doadoras. Os animais da baia têm fornecimento de capim e ração, além de água a vontade.

Figura 18: Galpão de baias



Fonte: Do Altor (2021).

Figura 19: Baias internas do galpão de doadoras.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 20: Estrutura externa das baias de garanhões.



Fonte: Do Autor (2021).

A higienização da cama ocorre todos os dias, já a troca é realizada uma vez por semana. A cama é reposta em média 60 cm e é composta por serragem.

As baias são estruturadas com três cochos de granito, um para água, um para sal e o terceiro para ração. Além de uma estrutura para sustentação de capim e feno.

Figura 21: Imagem da cama de serragem e os cochos de concreto



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 22: Cama da baia reposta, capim fornecido, sal, ração e água.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 23: Cocho de sal mineral.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 24: Cocho de fornecimento de água.



Fonte: Do Autor (2021).

Já as receptoras ficam em piquetes de *Brachiaria Decumbens*. Ao todo são 4 grandes piquetes, com fornecimento de silagem, sal mineral e água a vontade.

O local indicado pela seta laranja é a área de plantação de milho para produção de silagem. A seta azul indica os piquetes das receptoras, já a seta amarela indica o galpão de baia.

Figura 25: Imagem do alto da propriedade.



Fonte: Do Altor (2021).

### 3.5- Propriedade 5.

A propriedade fica localizada na cidade de Três Corações sendo composta por duas unidades, a unidade 1 é destinada a sede e manejo das doadoras e os garanhões e a unidade 2 destinada as receptoras. A distância de entre ambas as unidades é de aproximadamente 2 km.

As éguas doadoras ficam próximas a sede da central, sendo o local dividido em diversos piquetes de *Panicum Maximum* (Mombaça) e Tifton 85 e sete baias para três garanhões e caso alguma égua precise de acompanhamento veterinário mais próximo. O fornecimento de volumoso, sal mineral e água é à vontade para todos os animais.

Todas as baias tem manejo de troca de cama semanalmente, e a cama era feita de serragem.

Figura 26: Cama das baias de manejos dos animais e dos garanhões.



Fonte: Do Autor (2021).

Neste local há uma estrutura para realização de exames de rotina, como palpação e ultrassonografia transretal, administração de fármacos, manejo sanitário e também avaliação física dos animais. Tais avaliações são realizados com os animais contidos em um tronco de contenção individual. Os animais ficam em um curral de espera e são levados um por vez ao tronco para a realização de tais exames.

Figura 27: Tronco para avaliação individual.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 28: Curral de espera indicado pela seta laranja



Fonte: Do Autor (2021).

O local para manuseio de embriões não é o apropriado, sendo o local em conjunto com o quarto de ração e demais medicamentos.

#### **4. MATERIAL UTILIZADO**

As sondas utilizadas para lavagem, tratamento uterino e coleta de embriões são esterilizadas na casa da Veterinária, no qual não acompanhei o processo. Porém foi informado que o material passa por uma fervura e pressão e em seguida é armazenado em estufa. As placas de Petri utilizadas para rastreamento dos embriões são placas novas e estéreis, no qual são descartadas após a utilização. Os filtros para coleta são esterilizados em estufa para reutilização. O meio de cultivo (Holding Plus®, Vitrocell, Embriolife) fica mantido na geladeira a 6°C. O indutor utilizado (Deslorrelina), Lutalyse, ocitocina e demais medicamentos não necessitam serem mantidos refrigerados..

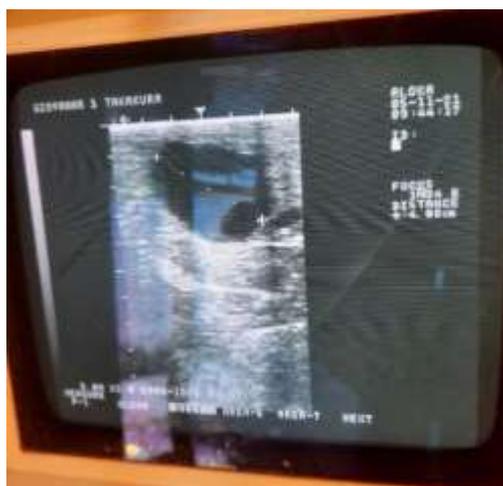
#### **5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

As visitas no haras seguiam, na medida do possível, dias corretos na semana, sendo que na segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira eram visitas nas propriedades 2, 4 e 5. Já na terça-feira, quinta-feira e sábado as visitas eram nas propriedades 1 e 3. Porém, em dias de lavado de embrião, inseminação de sêmen oriundo de outras propriedades e inseminação de sêmen congelado, visitas eram realizadas independente do dia em qualquer um desses haras.

##### **5.1- Manejo das éguas doadoras**

As éguas doadoras eram avaliadas igualmente em todas as propriedades, seguindo sempre a mesma metodologia. Eram observados ausência de prenhez, características uterinas com o objetivo de determinar a fase do ciclo estral em que cada animal se encontrava. Quando em estro, na presença de folículo dominante, com diâmetro superior a 30 mm, o controle folicular era realizado diariamente. A atividade ovariana era analisada através de palpação e ultrassonografia transretal. Os indivíduos que eram constatados com folículos de diâmetro mínimo de 35 mm x 35 mm e edema uterino classificado entre 2 e 3, recebiam o agente indutor de ovulação, Deslorrelina. No momento da indução era avaliado se a inseminação seria com sêmen fresco de algum cavalo próprio da propriedade, se seria sêmen refrigerado de cavalo de outra propriedade, ou se seria com Sêmen congelado. Esse fator era importante para determinar o horário de indução. Nas situações em que o sêmen era fresco ou refrigerado não tinha horário determinado para indução, já nas situações em que o sêmen era congelado a indução, necessariamente era realizada as 19 horas da noite, para que tenha controle folicular a partir de 36 horas pós indução.

Figura 29: Imagem de folículo com mais de 35 mm de diâmetro.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 30: Imagem de edema uterina grau 3.



Fonte: Do Autor (2020).

No dia posterior a indução era realizada a Inseminação Artificial. Para a realização adequada do procedimento era necessário envolver a cauda com luva de palpação ou faixa e amarrada no próprio animal ou no tronco de contenção. Realizava a higienização do local com detergente neutro e bastante água e logo após secava a região perineal. Esse procedimento era feito com o objetivo de reduzir possíveis contaminações. Feito isso, a inseminação artificial era realizada e se levava em consideração o tipo de sêmen. Sêmen fresco e refrigerado era inseminado no corpo do útero, já o sêmen congelado sua deposição era mais próxima do corno uterino possível.

Figura 31: Inseminação com sêmen fresco.



Fonte: Do Autor (2021).

No dia seguinte à inseminação as éguas eram avaliadas para detecção da ovulação e condição uterina. Em casos que o útero apresentasse alguma pequena alteração como acúmulo de ar, ou pequena quantidade de líquido era aplicado nos animais 2 ml de ocitocina. Em casos de histórico de éguas já com problemas pós inseminação artificial, era realizada a lavagem uterina com ringer com lactato e em alguns casos com água oxigenada ou solução iodada para auxílio na expulsão desse conteúdo. Nesses casos também era feita a aplicação de ocitocina para estimular a contração uterina, o que auxiliava na eliminação do líquido ao todo. A ocitocina pode ser aplicada até três dias após a inseminação, pois após esse período do desenvolvimento embrionário não é desejável que tenha contrações. Entre sete a nove dias após a ovulação era realizado a coleta de embrião.

Figura 32: Imagem ultrassonográfica de Corpo Lúteo.



Fonte: Do Autor (2020).

Figura 33: Lavado terapêutico pós IA com ringer com lactato e solução iodada.



Fonte: Do Autor (2021).

## 5.2- Manejo das éguas receptoras

As éguas receptoras eram avaliadas através de palpação e ultrassonografia transretal nos mesmos dias das éguas doadoras, devido a logística de manejo de cada haras. Quando o folículo dominante atingia 35x35 mm de diâmetro e havia edema endometrial classificado em 2 ou 3, era avaliado a necessidade de indução (com análogos de GnRH-

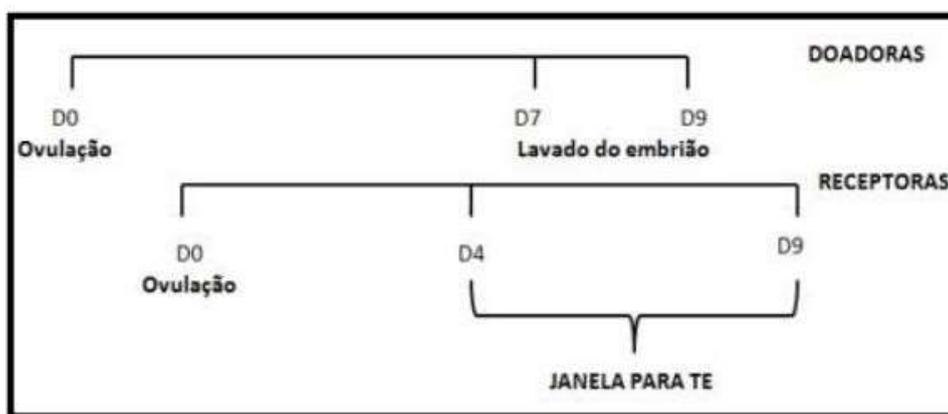
Deslorelina) em relação a sincronização com a doadora, caso não era necessário, a ovulação ocorria de forma natural.

A seleção da receptora que ia receber o embrião era baseada no histórico do animal e na avaliação do exame ultrassonográfico. Se o clico estral e crescimento folicular ocorreu de forma correta, a presença e ecogenicidade do corpo lúteo, a homogeneidade da parede uterina (ausência total de dobras endometriais), a ausência de ar no lúmen que está diretamente relacionado a capacidade da cérvix de manter o isolamento uterino com o meio externo, caracterizada no ultrassom por pontos ecogênicos no interior do útero; e a simetria entre os cornos uterinos. Na palpação retal, eram avaliados o tônus da cérvix e do útero.

A presença de um corpo lúteo de qualidade indica, provavelmente, a produção satisfatória de progesterona, no qual, quando a concentração sanguínea está igual ou mais elevada que 1 ng/ml provoca a ausência de dobras endometriais (ALVES, 2018).

A ovulação da receptora deve, dentro do possível, ocorrer de 2 a 3 dias após a ovulação da doadora. Assim as receptoras eram usadas no intervalo de D4 a D9, sendo o dia preconizado D6.

Figura 34: Desenho esquemático da sincronização de doadoras e receptoras.



Fonte: Alves, (2018).

### 5.3- Coleta de embrião

A coleta de embrião é realizada por meio não cirúrgico transvaginal. Todos os materiais que entravam em contato com a vagina do animal, útero e embrião já tinham sido esterilizados. Para tal procedimento utilizava sonda de silicone, filtro de malha 75 micras, solução de ringer com lactato, seringa de 20 ml para inflar o balonete e gel.

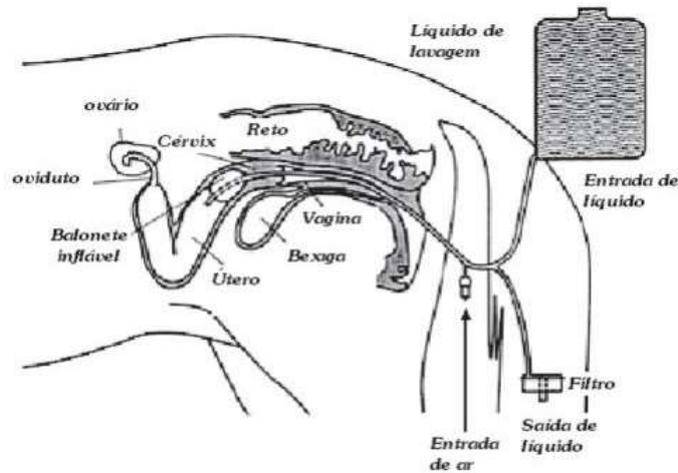
Figura 35: Materiais utilizados na lavagem de embrião.



Fonte: Alves (2018).

Após contenção e limpeza da região perineal da égua, de mesma forma e metodologia realizada na inseminação artificial, a sonda era introduzida via vaginal e posicionada no corpo do útero, o balonete era inflado com 30 a 45 ml de ar e levemente tracionado contra o óstio cranial do cérvix, para evitar refluxo de líquido durante a lavagem uterina. O ringer com lactato era infundido em quantidade suficiente para preencher o corpo e os cornos uterinos. Após o completo preenchimento do útero, a mão do técnico era colocada no reto do animal para que a massagem uterina fosse realizada de forma eficiente, depois o líquido era drenado, passando por um filtro. O filtro permanecia com no mínimo 20 ml de solução, para evitar a desidratação do embrião. Este procedimento era repetido de acordo com a visualização a olho nu do embrião. Caso o embrião era visto no primeiro soro, não eram necessárias mais lavagens, caso o embrião não fosse visto, esse procedimento se repetia, em média, de duas a três vezes. Posteriormente retirava o ar do balonete, para a saída da sonda do útero e o líquido contido nela era transferido para o filtro.

Figura 36: Esquema de lavagem de embrião.



Fonte: Adaptado de Squires & Seidel (1985).

Figura 37: Lavado de embrião.



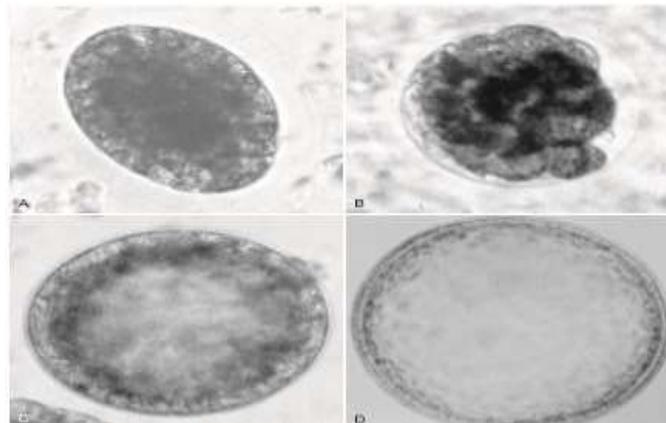
Fonte: Do Autor (2021).

Após a coleta era administrado 1 ml de análogo da prostaglandina  $F2\alpha$  (PGF-lutalyse), por via intramuscular, para induzir a luteólise do corpo lúteo que estava em atividade e o retorno ao cio dentro de três a cinco dias. Posteriormente à cada coleta era feita a procura e manipulação do embrião pela médica veterinária responsável.

O filtro era levado para o laboratório e seu conteúdo colocado em uma placa de petri estéril descartável previamente riscada, com linhas paralelas no fundo, para guiar a procura do embrião que não fosse visualizado a olho nu e com isso era feita a procura com auxílio de uma lupa de aumento. Detectada a presença do embrião, este era classificado de acordo com seu estágio de desenvolvimento e quanto à qualidade. A classificação por estágio de desenvolvimento considera o aspecto morfológico do

embrião que encontrar-se em fase de mórula, blastocisto inicial ou blastocisto expandido. Na classificação quanto à qualidade era observado o formato (esférico), coloração (homogênea), extrusão celular, integridade da zona pelúcida e também se havia alguma sujidade nesse embrião.

Figura 38: Fases de desenvolvimento do embrião equino. A- Oócito não fertilizado. B- Mórula de compactação. C- Blastocisto precoce. D- Blastocisto expandido.



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

Posteriormente à classificação, uma outra placa de petri era preparada com onde gotas de meio de cultivo (Holding Plus®, Vitrocell, Embriolife) previamente aquecido de 32 a 37°C para a lavagem do embrião, então com uma palheta acoplada na seringa de 1 cc, o embrião era resgatado da placa de petri que continha o lavado e colocado em uma das gotas de meio. O embrião era lavado à medida que passava pelas gotas sendo que o processo era realizado através de movimentos de aspiração e expiração do embrião com auxílio de palheta.

Figura 39: Lavagem de embrião na placa e meio Holding.



Fonte: Do Autor (2021).

Após estes lavados, o embrião era transferido para um tubo criogênico contendo meio de cultivo para ser transportado até o setor onde se encontravam as éguas receptoras. No momento da transferência o embrião era aspirado juntamente com o meio por uma pipeta de inseminação, respeitando a seguinte ordem, uma coluna de meio, uma coluna de ar, uma segunda coluna de meio e outra de ar, a terceira coluna de meio contendo o embrião, outra coluna de ar e outra com meio.

Figura 40: Meio de embrião armazenado em meio Holding aguardando a transferência.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 41: Preparo da pipeta para transferência de embrião.



Fonte: Do Autor (2021)

A égua receptora escolhida para receber o embrião era contida na lanchonete e realizava-se a lavagem e secagem da região perineal. A pipeta com o embrião era envolvida por uma camisa sanitária (IMV® France) para proteger das contaminações vaginais e era introduzida no cérvix. Após introduzir a pipeta no terço inicial do cérvix,

a camisa sanitária era rompida e a transferência do embrião realizada no corpo do útero. Ao sentir resistência do corpo uterino, tracionava-se a pipeta 2 cm para trás e o êmbolo da seringa era empurrado para depositar o embrião no útero.

#### **5.4- Recuperação embrionária e diagnóstico de gestação**

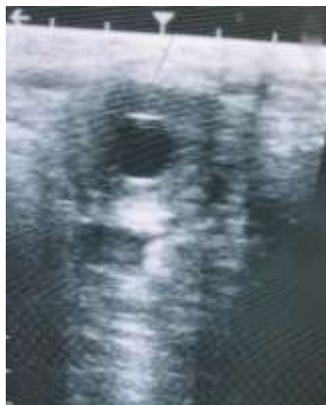
As taxas de recuperação embrionária nos programas de Transferência de embrião são diretamente influenciadas pelo tipo de sêmen utilizado, qualidade do sêmen, número de ovulações da doadora, idade da doadora e receptora, clima, conformação física da receptora, ambiente favorável, nutrição adequada, entre outros fatores como a experiência do Médico Veterinário no momento da transferência. O diagnóstico de gestação nas receptoras é realizado por exame ultrassonográfico 10 dias após a TE (De LaCorte et al., 1994).

Figura 42: Diagnóstico de transferência de embrião. D10.



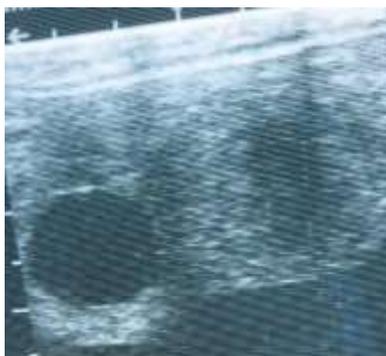
Fonte: Do Autor (2021).

Figura 43: Diagnóstico de transferência de embrião. D14.



Fonte: Do Autor (2021).

Figura 44: Diagnóstico de transferência de embrião. D16.



Fonte: Do Autor (2021).

### **5.5- Afecções uterinas**

Os tipos de lavagem realizadas foram com peróxido de hidrogênio (água oxigenada), querosene e infusão uterina com o ozônio ou soro ozonizado. Cada tratamento era indicado individualmente para cada animal, levando em consideração a gravidade da endometrite encontrada. Vale ressaltar que antes do procedimento de lavagem ou infusão uterina a cauda das éguas era envolta por uma luva de palpação e amarrada no próprio animal para que fosse realizada a lavagem e secagem da região perineal e posteriormente os procedimentos eram realizados.

#### **5.5.1- Lavagem uterina com peróxido de hidrogênio- água oxigenada.**

O peróxido de hidrogênio, conhecido popularmente como água oxigenada, cuja sua fórmula é  $H_2O_2$ , é muito utilizado devido seu elevado poder antisséptico, exercendo efeito antimicrobiano de amplo espectro contra bactérias, fungos, vírus, leveduras e esporos (Takakura, 2020), sendo muito utilizada em lavagens de feridas externas e esterilização de instrumentos.

Esse tratamento começou a ser utilizado em endometrite após (Verstraelen, 2008) descobrir que bactérias que produzem a substância que causava a patologia, como por exemplo os lactobacilos, tinham seu desenvolvimento modulado após a administração de  $H_2O_2$  intrauterino.

Para a eficiência do tratamento de endometrites em éguas com peróxido de hidrogênio é recomendado a realização de lavagem uterina com solução ringer com lactato acrescido de solução de  $H_2O_2$  a 3% (LeBLANC e McKINNON, 2011).

A escolha na utilização desse tratamento era quando as éguas estavam no início do estro, com presença de líquido intrauterino, animais com histórico de falha reprodutiva,

indiferentemente de éguas doadoras ou receptoras, e pós cobertura, principalmente de sêmen congelado, com o objetivo de promover uma limpeza uterina e evitar endometrite pós cobertura.

Em 900 ml de ringer lactado eram adicionados 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10 volumes, através da utilização de uma sonda, o produto ficava no útero por em média de 2 a 3 minutos, sendo retirado em seguida, sendo possível a avaliação a olho nu se havia presença de descamação ou qualquer tipo de sujidade. Após a retirada do conteúdo, eram administrado 2 ml de ocitocina para elevar a contração uterina e promover uma melhor drenagem de uma possível quantidade que tenha ficado no útero por não sair tudo na sonda. Foi possível observar que, nos animais que eram realizados esse procedimento, a taxa de lavados de embrião positivos eram maiores.

Figura 45: Pós lavado uterino com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com presença de descamação uterina.



Fonte: Alves, (2019).

#### **5.5.2- Lavagem uterina com infusão de querosene**

O querosene é um líquido resultante da destilação do petróleo, com alto poder irritativo na parede uterina causando necrose e descamação das células, renovando o epitélio (Martins et al 2006).

A infusão intrauterina com querosene ainda é bastante discutida entre os autores e veterinários, sendo descrita com resultados positivos em que não afetam a saúde em geral

da égua (Podico e colaboradores, 2019) e negativos em relação ao endométrio (BRADECAMP et al, 2014; LeBLANC e CAUSEY, 2009).

O tratamento do útero com aplicação de querosene remove muco, cílios e células epiteliais, permitindo a regeneração do epitélio e do aparelho mucociliar (Morris e colaboradores et al, 2020). Bradecamp e colaboradores (2014), relataram através de biopsias seriadas que, em média vinte e quatro horas após a infusão, o querosene promove uma diminuição significativa das células epiteliais ciliadas, no qual posteriormente sua concentração retorna a níveis normais quatro dias após a infusão. O mesmo parece induzir a curetagem química do epitélio endometrial, removendo de forma efetiva de microrganismos proporcionando ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário (BRADECAMP et al, 2014).

Estudos de tratamento uterino realizado com querosene concluíram que a infusão de querosene não afeta a saúde da égua e não mostrou sinais de aumento de fibrose e degeneração uterina pela avaliação histológica (Podico et al., 2020). Martins et al., (2006), afirmaram que o querosene pode ser uma alternativa usada no tratamento de endometrite tendo em vista que é capaz de induzir uma resposta inflamatória de curta duração além de potencial antisséptico sendo considerada uma curetagem química sem ser um potencial causador de fibrose uterina.

Esse procedimento era realizado em éguas receptoras de embrião que apresentavam diversos problemas reprodutivos relacionados a viabilidade uterina, no qual demais tratamentos não foram eficazes. Nos casos que o útero apresenta biofilmes já formados e instalados por bactérias algumas substâncias não são capazes de remove-los, devido a ineficiência de penetrar na matriz desses patógenos, já com a utilização do querosene, devido a descamação uterina que ele provoca, é possível a retirada do biofilme. (Costerton et al., 1995; LeBlanc, 2010). O objetivo desse tratamento é evitar o descarte dos animais e torna-los viáveis para a vida reprodutiva.

Figura 46: Infusão intrauterina de querosene



Fonte: Alves, (2018).

A infusão era realizada utilizando uma botuIA e uma pipeta de inseminação artificial comum. Eram administrados via intrauterina 80 ml de querosene puro, sempre feito quando o animal se encontrava no início do estro. Após a infusão era realizada uma massagem uterina via transretal para uma distribuição homogênea pelos cornos e a solução era deixada no útero.

### **5.5.3- Lavagem uterina com infusão de Ozônio.**

O ozônio é composto por uma molécula contendo três átomos de oxigênio, com potencial oxidante. Por ser altamente instáveis em elevadas temperaturas, as moléculas de O<sub>3</sub> se decompõem facilmente em moléculas de O<sub>2</sub>, sendo isentas de resíduos tóxicos. (LUKES et al, 2005). Essa molécula de ozônio, ao entrar em contato com fluidos corporais produz mensageiros com ação oxidante, que ao atingir a circulação sistêmica do animal desencadeia estímulos de efeitos farmacológicos. (RE et al, 2014). Na circulação sistêmica, a ozonioterapia estimula a vasodilatação, através da liberação de óxido nítrico pelas células, altera a plasticidade das hemácias melhorando a circulação periféricas e sua oxigenação, permitindo a chegada de componentes do sistema imune para reparação de tecidos danificados (Takakura, 2020).

Em éguas, lavagens uterinas utilizando soro ozonizado indicou importantes resultados no tratamento de éguas com falhas reprodutivas. No estudo foram utilizados 33 animais, em que 10 receberam o tratamento controle com lavagem uterina com solução fisiológica e 23 receberam lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada, indicando que apenas uma lavagem uterina com solução ozonizada causa redução significativa de células polimorfonucleares no endométrio inflamado (Takakura, 2020).

Durante o estágio, as éguas que, após a inseminação, apresentava alguma falha na limpeza uterina ou que pelo histórico do animal já era sabido a necessidade do tratamento anterior a inseminação, era realizado a aplicação do ozônio. A máquina é de propriedade da veterinária responsável, o que facilitava toda a logística. O equipamento gerador de ozônio é portátil e modelo O&L 1.5 (Ozone&Life®).

Figura 47: Máquina geradora de ozônio.



Fonte: Takakura, 2020.

A aplicação do ozônio ocorria de duas maneiras, através da insuflação ou através do soro ozonizado, ambos diretamente no corpo do útero, sempre no estro, devido a abertura cervical e resposta inflamatória. Previamente a ambas as formas de tratamento, a égua era contida, cauda amarrada e região vaginal higienizada, como na inseminação artificial.

No tratamento que era realizado a insuflação, utilizava uma pipeta rígida de inseminação artificial que era acoplada na máquina através de uma micro sonda. A pipeta ultrapassava a cérvix e depositava o gás no corpo do útero. O fluxometro utilizado é regulável, porém, na grande maioria se utilizava na dosagem de  $\frac{1}{4}$  de litros por minuto, na concentração 8, sendo liberado então  $40 \mu\text{g/ml}$  por minuto. Esse procedimento era realizado até que notasse que o gás estava tendo refluxo pela cérvix. Durava em média 5 minutos, ou seja,  $200 \mu\text{g/ml}$  por tratamento. O gás era deixado no animal, no qual era expelido naturalmente após algumas horas.

Figura 48: Insuflação de Ozônio intrauterina.



Fonte: Do Autor, 2021.

Figura 49: Pipeta utilizada na insuflação da ozonioterapia.



Fonte: Do Autor, 2021.

No tratamento com o soro ozonizado, a regulagem do fluxômetro de entrada de O<sub>2</sub> também era  $\frac{1}{4}$  de litros por minuto na concentração 8, tendo os mesmos 40  $\mu\text{g/ml}$  por minuto, porém o soro era ozonizado por 10 minutos, dobrando a concentração final, passando para 400  $\mu\text{g/ml}$  por tratamento. Devido à instabilidade do ozônio em soluções aquosas a lavagem uterina era realizada imediatamente após o preparo da solução. O soro era introduzido no animal através de uma sonda de tratamento comum e logo em seguida retirado.

Figura 50: Soro já ozonizado para tratamento.



Fonte: Takakura, 2020.

Figura 51: Tabela de controle do fluxômetro e potência.

**Ozone & Life**  
Tecnologia em Geradores de Ozônio

Tabela de concentração de Ozônio mg O<sub>3</sub>/L=µg/mL

Fluxo O <sub>2</sub>	Volume/min	Concentração de ozônio mg O <sub>3</sub> /L=µg/mL											
		Fluxo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/2	500 mL	1.0 L/min	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/4	250 mL	1.4 = 0.75L/min	0	1.5	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1/8	125 mL	1.2 = 0.50L/min	0	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		1.4 = 0.25L/min	0	5	9	12	16	22	29	35	40	47	52
		1.8 = 0.125L/min	0	10	17	22	28	37	46	53	59	66	71

16118059J

Gerador de Ozônio O&L 1.5 - PORTÁTIL

Fonte: Do Autor, 2021.

## 5.6- Coleta de sêmen

As coletas de sêmen eram realizadas de acordo com a demanda na propriedade em relação ao uso interno do sêmen de determinado garanhão e ao envio de sêmen.

Previamente a água era aquecida em torno de 45 graus para que no momento que colocasse na vagina artificial essa temperatura fosse para 37 graus.

A vagina já era pré-montada, em que a mucosa de látex já está acoplada e fixada no tubo rígido da vagina. A mucosa plástica é adicionada no momento da coleta, juntamente com o filtro e o tubo coletor.

Figura 52: Vagina artificial



Fonte: Do Autor, 2020.

Figura 53: Tubo e filtro coletor.



Fonte: Do Autor (2020).

A água em cio era devidamente contida para evitar possíveis riscos e usada como manequim para o momento da coleta.

Figura 54: Égua contida usada como manequim para coleta de sêmen



Fonte: Do Autor (2021).

No momento da coleta o pênis do garanhão era higienizado com água corrente e abundante, retirando qualquer sujidade presente na parte externa da uretra, glânde e corpo do pênis. Em seguida a peça do animal era seca com papel toalha.

Figura 54: Lavagem do pênis do garanhão previamente a coleta



Fonte: Do Autor (2021).

Após esse processo o sêmen era analisado e diluído.

### **5.7- Análise seminal**

A análise era realizada para obter parâmetros de motilidade, vigor e concentração do ejaculado, para assim realizar a diluição adequada. Geralmente se utilizava a diluição 1:1 ou 2:1, sempre priorizando a Dose inseminante mínima que é de  $1 \times 10^9$  sptz viáveis, com diluição entre 20 e 50 x 10<sup>6</sup> sptz/ml e volume final entre 20 e 50 ml.

### **5.8- Envio de sêmen**

Para os envios de sêmen, o procedimento de coleta e análise eram os mesmos, assim o sêmen era colocado em um recipiente chamado BotuIA e em seguida posicionada na caixa de refrigeração BotuFlex que mantém esse sêmen entre 15 e 5 graus, por até 48 horas. A quantidade de gelo na caixa era variável de acordo com a característica de cada cavalo, sendo no mínimo um gelo seco e no máximo dois.

A caixa então era lacrada e enviada ao solicitante com todas as informações do momento da coleta e análise inicial.

## **6- Conclusão**

Com o término desse trabalho fica claro a importância do conhecimento e execução com excelência das técnicas desenvolvidas, uma vez que o mercado exige cada dia mais a capacitação de bons profissionais na área. O valor agregado no processo é relativamente alto, fazendo com que as melhores técnicas sejam desenvolvidas em buscas de resultados superiores.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINH, A.; BÂVERUD, V.; MAGNUSSON, U. **Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems.** *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.44, p.121-129, 2003.
- ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 209-223, 2005.
- ALLEN, W.R. The **development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding.** *Reproduction of Domestic Animals*, v. 40, p.310-329, 2005.
- ALMEIDA, H.B. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen equino resfriado.** 2004. 137f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T. do.; OLIVEIRA, J.V. **Transferência de embriões na espécie equina.** Botucatu- SP, Apostila. 2008.
- AMANN, R.P. **Physiology and Endocrinology.** In: MCKINNON, A.O. VOSS, J.L. (Ed). *Equine Reproduction*, Lea & Febiger. Philadelphia, 1993, p.658-685.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. **Spermatozoal function.** In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine reproduction.* Philadelphia: Saunders, 1993. p.715-745.
- BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J.F.; TAINURIER, D.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. **Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability.** *Theriogenology*, v.58, p.229-232, 2002.
- BARRIER-BATTUT, I.; LE POUTRE, N.; TROCHERIE, E.; HECHT, S.; GRANDCHAMP DES RAUX, A.; NICAISE, J.L.; VÉRIN, X.; BERTRAND, J.; FIÉNI, F.; HOIER, R.; RENAULT, A.; EGRON, L.; TAINURIER, D.; BRUYAS, J.F. **Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare.** *Theriogenology*, v.55, p. 1679- 1695, 2001.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BERGEFELT, D.R. **Estrous synchronization. mare.** In: *Equine Breeding Management and Artificial Insemination.* Philadelphia: Saunders, p.195-228, 2000.
- BERGEFELT, D.R. **Anatomy and physiology of the mare.** In: SAMPER, J.C. 2ed. *Equine breeding management and artificial insemination.* Missouri: Saunders Elsevier, 113-131p. 2009.
- BLANCHARD, T.L. et al. **Reproductive Physiology of the Nonpregnant Mare.** In: BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. **Manual of Equine Reproduction.** 2 ed., USA, 249p. 2003.
- BLASH, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W. **Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats.** *Theriogenology*, v.54, p.889-905, 2000.
- BONIN, B.F. **Efeito do tratamento com extrato de pituitária equina na resposta ovariana e eficiência reprodutiva de éguas idosas em programa de transferência de embriões.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, BotucatuSP. 2010.

BOUÉ, F.; BLAIS, J.; SULLIVAN, R. Surface localization of P34H, **an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa.** *Biology of Reproduction*, v.54, p.1009-1017, 1996.

BRADECAMP, E.A. Pneumovagina. In: **Equine Reproduction.** McKINNON, E.L.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. Blackwell Publishing Ltd, 2.ed., p. 2538- 2544, 2011.

BRINSKO, S.P. et al. Pregnancy: Physiology and Diagnosis. In: BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D.L. **Manual of Equine Reproduction.** 3ª Ed, Mosby, Elsevier, p.85-93. 2011.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. **The Effect of Uterine Lavage Performed Four Hours Post-insemination on Pregnancy Rates in Mares.** *Theriogenology*. v.35, p.1111- 1120, 1991.

BURATINI JR. J. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas da raça Mangalarga Marchador utilizando a ultrasonografia e as concentrações plasmáticas de progesterona e hormônio luteinizante.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista UNESP-Botucatu, p. 27-39, 1997.

CAMARGO, C.E.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; DUARTE, M.P.; DUARTE, M.C.G.; BERTOL, M.A.F.; GAIEVSKI, F.R.; BASTOS, G.M. **Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião.** *Vet. e Zootecmar.*; 20(4): 74-83. 2013.

CARD, C. **Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.** *Theriogenology*, v. 64, p. 580-588, 2005.

CAUSEY, R.C. **Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance.** *The Veterinary Journal*, v.172, p.405-421, 2006.

CHENIER, T.S. Anatomy and physical examination of the stallion. In SAMPER, C.S. **Equine breedings management and artificial insemination.** 2 Ed, p.1-17, 2009. CLAYTON, H.M.; LINDSAY, F.E.F.; FORBES, A.C.; HAY, L.A. **Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys.** *Applied Animal Ethology*, v. 7, p. 169-174, 1981.

COSTERTON, J. W., Z. LEWANDOWSKI, D. E. CALDWELL, D. R. KORBER & H. M. LAPPINSCOTT. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, 49, 711–745. 1995.

Cuervo-Arango J., Aguilar J. & Newcombe J.R. 2009. **Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound.** *Theriogenology* 71:1267-1275.

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

DONADEU, F.X.; WATSON, E.D. **Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse.** *Animal Reproduction Science*, v.100, p.225– 242, 2007.

DUCHAMP G, Bour B, Combarous Y, Palmer E. **Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare.** J Reprod Fertil, v.35, p.221-228, 1987.

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

EVANS, M.J.; GASTAL, E.L.; SILVA, L.A.; GASTAL, M.O.; KITSON, N.E.; ALEXANDER, S.L.; IRVINE, C.H.G. **Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotropin to estrous mares.** Animal Reproduction Science, v. 94, p. 191-194, 2006.

EVERTS, P.A.M. et al. **Platelet-rich plasma and platelet gel: a review.** Journal of ExtraCorporeal Technology, Bloomsburg, v.38, n.2 p.174-187, 2006.

FARIA, D.R.; GRADELA, A **Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. v.34, n.2, p.114-122, 2010.

FARIAS, L. D. et al. **Indução da ovulação em éguas: uma revisão.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.40, n.1, p.17-21, jan/mar. 2016.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport in the uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

FLEURY J, Fleury P, Sousa FA, Gilley R. **Preliminary evaluation of a BioRelease delivery system for the controlled release of deslorelin for advancing ovulation in the mare: effects of dose.** Rev Bras Reprod Anim, v.27, p.501-502, 2003.

FLEURY PDC, Alonso MA, Alvarenga MA, Douglas RH. **Intervals to ovulation after treatment with oestradiol cypionate (ECP) or biorelease deslorelin (BRT-DES).** Havemeyer Foundation Monograph Series. 2004.

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.

FREEMAN, k.P.; ROSZEL, J.F.; SLUSHER, S.H.; PAYNE, M. **Mycotic Infections of the Equine Uterus.** **Equine Practice**, v.8, n.1, p. 34-42, 1986.

GASTAL, M. O. et al. Effect of oxytocin, prostaglandin F<sub>2</sub>alpha, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 46, n. 7, p. 1171-1180, 1996.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Horses.** Madison, Wisconsin: Equiservices. 1995. V. 2, 400 p.

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

GINTHER, O.J.; FIRST, N.L. **Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares.** American Journal of Veterinary Research, v. 32, p.1687- 1691, 1971.

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

Giorgia PODICO, Igor F. Canisso, Patrick J. Roady, Scott M. Austin, Mariano Carossino, Udeni Balasuriya, Robyn E. Ellerbrock, Fabio S. Lima, Graça FerreiraDias, Robert H. Douglas. Uterine responses and equine chorionic gonadotropin concentrations after two intrauterine infusions with kerosene post early fetal loss in mares. **Journal Pre-proof**. p. 21. 2019.

GRECO, G.M.; BURLAMAQUI, F.L.G.; PINNA, A.E.; QUIEROZ, F.J.R.; CUNHA, M.P.; BRANDÃO, F.Z. **Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares**. Revista Brasileira de zootecnia, v. 41, n. 3, p. 607-611, 2016.

GRECO, G.M.; BURLAMAQUI, F.L.G.; PINNA, A.E.; QUIEROZ, F.J.R.; CUNHA, M.P.; BRANDÃO, F.Z. **Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares**. Revista Brasileira de zootecnia, v. 41, n. 3, p. 607-611, 2012.

HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals** 5 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987, 649 p.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproductin in Farm Animals**. 7. Ed. Philadelphia: Williams e Wilkins, 2000.

HOFFMANN, B.; LANDRECK, A. **Testicular endocrine fuction, seasonality and semen quality of the stallion**. Animal Reproduction Science, v.31, n.57, p.89-98, 1999.

INOQUE, J.; CERBITO, W.A.; OGURI, N.; MATSUZAWA, T.; SATO, K. **Serum levels of testosterona and oestrogens in normal and infertile stallions**. Journal of Andrology, v.16, n.2, p.155-158, 1993.

JACOB, J.C.F. **Dinâmica ovariana e endócrina em éguas de diferentes idades**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.2007.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. **Factors affecting spermatogenesis in the stallion**. *Theriogenology*, v.48, n.7, p.1199-1216, 1997.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. **Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach**. *Theriogenology*, v.60, n.2, p.471-480, 2000.

JONES, R. **Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis**. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 53, p.73-84, 1998.

KATILA, T. **Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen**. *Biology of Reproduction*, v.52, p.515-517, 1995.

KATILA, T. Post-mating **Inflammatory Responses of the Uterus**. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, Suppl.5, p.31-41, 2012.

KEDIA, K.; MARKLAND, C. The effect of pharmacological agents on ejaculation. *Journal of Urology*, v.114, p.559-573, 1975.

KENDALL, N.R.; McMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R.G. **The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs**. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.277-283, 2000.

KENNEY, R.M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v.25, n.3, p.185-186, 1992.

KING, S.S. Autumnal Transition Out of the Breeding Season. In: McKINNON, A.O.;SQUIRES, E.L.; VAALA W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2ª Ed.Blackwell Publishing, cap.181, p.1732-1753. 2011.

KOTILAINEN, T.; HUHTUNEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 16, p. 630-631, 1994.

LeBLANC, M.M. **Persistent Mating Induced Endometritis in the Mare**: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Recent Advanced in Equine Reproduction. International Veterinary Information Service. Disponível em [www.ivis.org](http://www.ivis.org) 2003. Acesso em 28 fev de 2022.

LeBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C. **Clinical and subclinical endometrites in the mare: both treats to fertility**. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p. 10-22, 2009.

Lee H A Morris<sup>1</sup>, P M McCue<sup>2</sup> and Christine Aurich<sup>3</sup>. **Equine endometritis: a review of challenges and new approaches**, p. 11, 2020.

LOVE, C.C. **Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis, and spermatic cord of the stallion**. *Vet Clin North Am Equine Pract.* v.8, n.1, p.167-182, 1992.

MACHADO, M.S. **Avaliação da dinâmica folicular em éguas superovuladas com extrato de pituitária equina e FSH equino purificado**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Equídeos**. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>> Acesso em 01 de março de 2022.

MARENCO, S.R. **Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane**. *Animal Reproduction Science*, v.105, p.52-63, 2008.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. **Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma**. *Theriogenology*, v.52, p.1273-1280, 2000.

MCCUE, P. M. **Induction of ovulation**. In: ROBINSON, N.E. Current therapy in equine medicine 5. Philadelphia: Saunders, 2003. chap. 5.7, p. 240-242.

McDONNELL, S.M. **Ejaculation: physiology and dysfunction**. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.8, n.1, p.57-70, 1992.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2.ed. Wiley-Blackwell, 2011. 3288p.

MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.

MONTEIRO, G.A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo**. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado) Universidade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PODICO, G., CANISSO, I. F., ROADY, P. J., AUSTIN, S. M., CAROSSINO, M., BALASURIYA, U., ELLERBROCK R. E., LIMA, F. S., FERREIA-DIAS, G., DOUGLAS, R. H. **Uterine responses and equine chorionic gonadotropin concentrations after two intrauterine infusions with kerosene post early fetal loss in mares**. *Theriogenology*, v. 148, p. 202-210, 2020.

RE, L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; BORDICCHIA, M.; MALCANGI, G.; POCOGNOLI, A.; MORALES-SEGURA, M.A.; ROTHCHILD, J.; ROJAS, A. **Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result**. *European Journal of Pharmacology*, v.742, p.158-162, 2014.

Recio del Pino et al, 1999 RECIO DEL PINO, E.; SERRANO, M.A.; RODRÍGUEZ DEL RIO, M. **Aspectos de la ozonioterapia em pacientes com neuropatia epidémica.** Revista Cubana de Enfermería, v.15, p.114-118, 1999.

REILA, T. **Uterine luminal environment of the mare.** 2001. 80f. tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Helsinki, 2001.

SAMPER JC. **Induction of estrous and ovulation: Why some mares respond and others do not.** Theriogenology. 2008; 70:445-7

SHARP, W. R. et al. **The physiology of in vitro asexual embryogenesis.** Horticultural reviews, v. 2, p. 268-310, 1980.

Silva L.A. 2003. **Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em eqüinos.** Tese (Pósgraduação em Medicina Veterinária), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, Brasil, 145 p.

Squires E.L. & Seidel G.E. 1995. **Collection and transfer of equine embryos.** Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin. Colorado State University, Fort Collins. p.397.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Embryo technologies in the horse.** Theriogenology, v.59, p.151-170, 2003.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, p. 771-775, 2001a.

TAKAKURA, Giovanna. **Avaliação do efeito da utilização de lavagem uterina com solução fisiológica ozonizada em éguas**, repositório.ufla.br, 2020. Disponível em: [http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/41917/3/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Avalia%C3%A7%C3%A3o%20do%20efeito%20da%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20lavagem%20uterina%20com%20solu%C3%A7%C3%A3o%20fisiol%C3%B3gica%20ozonizada%20em%20%C3%A9guas.pdf](http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/41917/3/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Avalia%C3%A7%C3%A3o%20do%20efeito%20da%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20lavagem%20uterina%20com%20solu%C3%A7%C3%A3o%20fisiol%C3%B3gica%20ozonizada%20em%20%C3%A9guas.pdf). Acesso em 04/03/2022.

TROEDSSON, M. H. T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A. M.; DAHMS, B.; CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduce Science**, v. 68, p. 273-278, 2001.

TROEDSSON, M.H.T. Endometritis. In: **Equine Reproduction.** McKINNON, E.L.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. Blackwell Publishing Ltd, 2.ed. p.2608- 2619, 2011.