

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

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

Orientadora: Daniela dos Santos Brum

Joana Closs Engelhardt

Uruguaiiana, novembro de 2018.

JOANA CLOSS ENGELHARDT

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

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

Orientadora: Daniela dos Santos Brum
Médica Veterinária, Msc, Dra.

**Uruguaiana
2018**

JOANA CLOSS ENGELHARDT

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

Área de concentração: Reprodução de equinos.

Relatório apresentado e defendido em 14 de novembro de 2018

Prof. Msc. Dra. Daniela dos Santos Brum
Orientadora

Prof. Msc. Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Msc. Dr. Marcos da Silva Azevedo
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força nos momentos difíceis sempre me auxiliando a superar obstáculos e vencer dificuldades.

A minha mãe e minha irmã, por sempre acreditarem em mim e me estimularem a crescer profissionalmente e como pessoa, além de todo amor e suporte neste período.

Ao meu pai, por sempre me auxiliar financeiramente para que eu pudesse realizar o que desejava.

A todos meus amigos por estarem comigo, sempre me apoiando e incentivando, entendendo a distância e ausência durante a faculdade e a realização do ECSMV.

Agradeço especialmente a Jordana Zimmermann, que esteve ao meu lado ao longo da faculdade, mas que mesmo distante se mostrou uma amiga fiel, compartilhando dificuldades, preocupações e alegrias, mas principalmente acreditando que no final, tudo daria certo.

Ao Pedro Bussade que me mostrou o melhor caminho a seguir nunca desistindo da área equina, agradeço também pela paciência, indicações, mas principalmente pela amizade fiel.

Agradeço imensamente a minha orientadora Daniela dos Santos Brum, por toda paciência e dedicação ao longo do período de estágio, sempre me servindo de exemplo como profissional e pessoa além de me incentivar, ensinar e dividir conquistas.

Aos Médicos Veterinários que conheci e convivi neste período, Luciano Beretta, Márcio do Carmo e Aline Nicolodelli, obrigada por toda paciência, gentileza e principalmente por dividirem comigo tanto conhecimento quanto puderam!

A Prof. Mirela Noro e ao Prof. Tiago Gallina pelos ensinamentos da faculdade e da vida, mas principalmente por se preocuparem não só com o conhecimento, mas também com o bem-estar dos alunos mesmo longe do campus Uruguaiana.

Agradeço a Janice Villela por sanar dúvidas, tendo paciência e sempre fazendo críticas construtivas, auxiliando tanto na parte acadêmica quanto pessoal.

A toda equipe da CER, em especial a Nádia, Jéssica, André, Dr. Orpheu Ávila e todos outros estagiários pela construção desta amizade tão forte.

Por fim, agradeço ao meu Supervisor de estágio, Ariel Cunhasque Bertoldi por ser tão presente durante a rotina de estágio e não medir esforços em explicar e sanar dúvidas.

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi realizado na Central Equina de Reprodução (CER) localizada na cidade de Boituva, São Paulo sob a supervisão do Médico Veterinário Ariel Cunhasque Bertoldi, no período de 27 de julho a 20 de outubro de 2018, perfazendo um total de 480 horas. O presente relatório descreve as principais atividades acompanhadas e desenvolvidas na área de reprodução equina desde a rotina diária do manejo reprodutivo, incluindo as principais biotécnicas utilizadas atualmente. As principais atividades observadas foram: controle folicular de doadoras e receptoras, manejo de garanhões (envolvendo coleta, análise e congelamento de sêmen) coleta e transferência de embriões que, por sua relevância foram discutidas no relatório. Durante o desenvolvimento do ECSMV, foi possível avaliar a importância da aplicação de biotécnicas reprodutivas, no atual contexto da equinocultura brasileira.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Inseminação artificial com sêmen congelado com auxílio de haste flexível.	15
FIGURA 2 - À esquerda o filtro após colheita do embrião e a direita, procedimento de inovulação do embrião na receptora.	17
FIGURA 3 - À esquerda coleta de sêmen utilizando manequim e a direita coleta utilizando égua contida.	18
FIGURA 4 - Caixa térmica compartimentada.	19
FIGURA 5 - Éguas doadoras mantidas em baias.	26
FIGURA 6 - Éguas doadoras a campo.	26
FIGURA 7 - Esquema do ciclo estral da égua.	28
FIGURA 8 - Esquema representando o protocolo para dupla ovulação na CER.	30
FIGURA 9 - Preparo da égua doadora para coleta de embriões, à esquerda contenção e à direita, limpeza da vulva e vestíbulo.	31
FIGURA 10 - – Figura esquemática representando o envase de embriões no método convencional e no método sugerido por Peter Daels.	34
FIGURA 11 - – Esquema representando o protocolo utilizado na CER em casos de receptoras acíclicas.	37
FIGURA 12 - À esquerda, diagnóstico de gestação aos 13 dias de desenvolvimento embrionário e, à direita, avaliação de batimentos cardíacos após 30 dias.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Número (n) e porcentagem (%) de atividades acompanhadas durante a realização do estágio curricular.	12
Tabela 2:Quantidade de palhetas, motilidade pré e pós-congelamento, descartes de partidas e utilização de Equipure® para cada garanhão.	20
Tabela 3:Relação entre o uso de CIDR®, eficácia e vaginite.	28
Tabela 4:Classificação de embriões conforme aparência e características.	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

C°	graus Celsius
CER	Central Equina de Reprodução
CIDR	Dispositivo intravaginal de progesterona
CL	Corpo lúteo
D0	Dia zero/dia da ovulação
DMSO	Dimetilsulfóxido
E ₂	Estrógeno
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
FSH	Hormônio folículo-estimulante
IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
LH	Hormônio luteinizante
MEP	Perda embrionária precoce
P ₄	Progesterona
PMN	Polimorfonuclear
PSA	Puro Sangue Árabe
PSL	Puro Sangue Lusitano
QM	Quarto de Milha
TE	Transferência de embrião
US	Ultrassom
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	11
2.1 Descrição do local do estágio	11
2.2 Rotina de atividades durante o estágio	11
2.2.1 Controle folicular.....	12
2.2.2 Inseminação artificial com sêmen fresco.....	13
2.2.3 Inseminação artificial com sêmen congelado.....	13
2.2.4 Colheita e inovulação de embriões	15
2.2.5 Diagnóstico de gestação e sexagem fetal	17
2.2.6 Colheita de sêmen.....	18
2.2.7 Refrigeração e criopreservação do sêmen	19
2.2.8 Citologia	20
3 DISCUSSÃO	22
3.1 Transferência de embrião	22
3.1.1 Fisiologia reprodutiva da égua	23
3.1.2 Manejo da doadora	25
3.1.5 Colheita de embrião.....	30
3.1.6 Manipulação, avaliação e inovulação de embriões	33
3.2 Manejo de receptoras.....	35
3.3 Diagnóstico de gestação	37
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A – Referência para análise e classificação de embriões.	45
ANEXO B – Certificado de congressista no III Encontro Minitube sobre Biotecnologia da Reprodução Equina Aplicada à Raça Crioula.	46
ANEXO C – Certificado do Estágio Curricular em Medicina Veterinária	47

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é caracterizado por uma associação entre cadeias produtivas, com relações comerciais e industriais que influenciam o crescimento da economia (HEREDIA; PALMEIRA; LEITE, 2010). Neste contexto, o mercado equino vem gradativamente sendo inserido, sendo caracterizado como um complexo agropecuário, ou seja, um agronegócio independente, porém com inter-relação entre setores comerciais, industriais e agropecuários. Podemos explorá-lo por meio de seus aspectos funcionais segundo trabalho, esporte, lazer entre outros, associando-os com fatores relacionados com “antes da porteira” e “depois da porteira” (LIMA; CINTRA, 2016).

No Brasil há aproximadamente 5,9 milhões de equinos, sendo um mercado economicamente mais ativo e lucrativo que o próprio mercado automobilístico, movimentando em torno de 16 bilhões de reais/ano e gerando cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (LIMA; CINTRA, 2016). Apesar de considerado como um mercado difícil devido à crise financeira vivenciada nos últimos anos, o mercado equino continua atrativo, representando parte ativa da economia brasileira onde grande parcela de sua valorização é devido ao seu crescimento no mercado urbano brasileiro.

Aprimoramentos aplicados ao manejo equino vêm crescentemente beneficiando a resolução de impasses usuais, bem como aumentando o desempenho reprodutivo da espécie. Neste contexto, a utilização de biotécnicas qualificadas vem sendo uma grande aliada, tanto para o melhoramento genético, como para otimização da fertilidade em éguas, proporcionando ao Brasil uma posição de destaque mundial nesta área. Dentre as biotécnicas reprodutivas, a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco, resfriado e congelado e a transferência de embriões (TE) são frequentes nesta espécie e, cada vez mais incentivadas, a fim de se ter maior controle e maior número de produtos de um mesmo animal, além de melhorar valores zootécnicos, atendendo tanto exigências das associações quanto dos proprietários (LOOMIS; SQUIRES, 2005).

A área de escolha para a realização do ECSMV foi a de Reprodução Equina. Sendo o Estado de São Paulo referência na utilização de biotécnicas em reprodução equina e devido ao grande número de animais concentrados nesta região, o local de escolha para a realização do ECSMV foi a Central Equina de Reprodução (CER). Este local foi escolhido devido a sua grande rotina com TE e manejo reprodutivo, além de ser reconhecido no mercado. O ECSMV

foi supervisionado pelo Médico Veterinário Ariel Cunhasque Bertoldi e teve como orientação a Professora Dra. Daniela dos Santos Brum, sendo realizado no período de 27 de julho a 20 de outubro de 2018, totalizando 480 horas.

Este trabalho tem como objetivo descrever as principais atividades acompanhadas e realizadas, como coleta e congelamento de sêmen; inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado e congelado; coleta e transferência de embriões. As principais raças acompanhadas foram Puro Sangue Árabe, Quarto de Milha e Puro Sangue Lusitano.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Nesta seção será apresentado o local de estágio, contemplando sua infraestrutura e funcionamento. Também serão descritos a rotina, as atividades acompanhadas e/ou realizadas.

2.1 Descrição do local do estágio

A Central Equina de Reprodução (CER) é uma empresa voltada para a reprodução equina, com objetivo de fornecer para os criadores de cavalos as principais biotecnologias conhecidas no mercado. É localizada na cidade de Boituva, estado de São Paulo, e destaca-se por ser a única Central Equina de Reprodução Brasileira credenciada na Comunidade Europeia, além de também ser credenciada no Ministério da Agricultura Brasileiro.

A empresa possui uma área de 20 alqueires (1 alqueire = 2,42 hectares), contemplando alojamento para doadoras e garanhões, piquetes para receptoras, troncos para a realização do manejo reprodutivo, laboratório para manipulação de embriões e manipulação de sêmen, farmácia veterinária, local com manequim para coleta de sêmen, instalações para quarentena, escritório para atividade administrativa e alojamento para estagiários.

Durante o ECSMV, aproximadamente 424 animais estavam alocados na CER, sendo 4 garanhões, 20 doadoras e 400 receptoras, número que varia de acordo com a temporada de monta. Os Médicos Veterinários e Residentes desenvolviam atividades dentro da CER como envio e retirada de sêmen, congelamento de sêmen, inseminação artificial, transferência e congelamento de embriões e também prestavam serviço para outros haras e coudelarias fora das dependências da empresa.

O local foi escolhido devido a sua importância no mercado equino proveniente de sua grande rotina com transferência de embriões e biotecnologias aplicadas a reprodução equina.

2.2 Rotina de atividades durante o estágio

As atividades desenvolvidas se encontram nesta subseção, sendo que o controle folicular, o manejo sanitário e a inovulação de embriões foram as mais frequentes durante o período. Todas as atividades foram quantificadas (Tabela 1) e as mais relevantes foram descritas a seguir.

TABELA 1 - Número (n) e porcentagem (%) de atividades acompanhadas durante a realização do estágio curricular.

Atividades acompanhadas	n	%
Controle folicular	1600	56.477
Manejo sanitário	274	9.671
Inovulação de embriões	224	7.906
Diagnóstico de gestação	215	7.589
Colheita e análise de sêmen	123	4.341
IA com sêmen fresco	105	3.706
Refrigeração e congelamento de sêmen	96	3.388
Colheita de embriões	96	3.388
IA com sêmen congelado	32	1.129
Endometrite	26	0.917
Citologia	10	0.352
Cólica	9	0.317
Sexagem fetal	7	0.247
Vulvoplastia	5	0.176
Implante intravaginal de progesterona	5	0.176
Parto	3	0.105
Laceração de cervix	2	0.070
Manejo de gestação gemelar	1	0.035
Total	2833	100

2.2.1 Controle folicular

O controle folicular foi realizado em éguas doadoras e receptoras, seguindo um procedimento de retiradas das fezes da ampola retal, e posteriormente realizava-se a palpação do corpo do útero, cornos uterinos e ovários com auxílio do Ultrassom (US). Após, avaliava-se a presença de edema uterino, corpo lúteo (CL), folículos e cistos nos ovários e também se realizava o diagnóstico de gestação.

Na CER, éguas receptoras eram mantidas em sistema de pasto, suplementadas duas vezes ao dia com silagem e ração. As fêmeas, identificadas com a marca da CER, com um número e nome, permaneciam em piquetes de acordo com o lote. O controle folicular era realizado de segunda-feira a sábado de acordo com a fase do ciclo estral. Quando éguas encontravam-se acíclicas, estas eram preparadas com protocolo artificial e, posteriormente,

após a confirmação da prenhez, as mesmas recebiam aplicação semanal de Progesterona (P4) até os 120 dias de gestação.

Éguas receptoras prenhes eram mantidas na CER até 60 dias de gestação e em seguida destinadas a propriedade de quem às alugou, permanecendo lá até o desmame do potro, ocasião em que retornavam à CER onde recomeçava o controle folicular. Os principais fatores avaliados na compra de novas receptoras eram tamanho, idade e docilidade da égua, além dos resultados dos exames de palpação retal e palpação com auxílio de US, a fim de se avaliar útero, cérvix e ovários. Já para o descarte eram considerados problemas uterinos, idade avançada e dificuldade na transferência de embriões (TE) mantendo resultados negativos.

Éguas doadoras eram alojadas em baias, recebendo ração duas vezes ao dia e feno três vezes ao dia, além de suplementos quando necessário. Seu tempo de estadia na CER variava de acordo com a meta determinada para cada uma, de acordo com o número de embriões a serem coletados.

2.2.2 Inseminação artificial com sêmen fresco

A partir do controle folicular de doadoras, realizava-se a inseminação artificial com sêmen fresco, preconizando um folículo $\geq 35\text{mm}$ e presença de edema uterino. Para a realização da inseminação a égua era contida em um tronco de palpação e sua cauda era envolta pelo protetor de cauda e fixada na parte superior do tronco para evitar pêlos na região perianal. Após realizava-se a limpeza do reto da égua com água e gaze embebida em solução à base de gluconato de clorexidina a 2%, e posteriormente com auxílio de um lenço absorvível a vulva era seca.

Para a inseminação utilizava-se uma luva estéril inserindo-se a pipeta de IA pela vulva ultrapassando a cérvix, para que assim o sêmen fosse depositado no corpo do útero. A maioria das inseminações era realizada com sêmen proveniente de animais alojados na própria CER e, em alguns casos o sêmen era recebido resfriado de outros estabelecimentos.

2.2.3 Inseminação artificial com sêmen congelado

Para a inseminação artificial com sêmen congelado foi preconizado um maior controle folicular, onde a égua era avaliada mediante palpação a cada 6 horas, a fim de identificar o melhor momento para inseminação, sendo este o mais próximo possível da ovulação da égua.

O sêmen congelado tem menor viabilidade no oviduto da fêmea, com isso o índice de prenhez varia de 25-40% (HOFFMANN et al., 2011). Sendo assim, éguas com folículos \geq 35mm e edema 3 foram induzidas com 1ml de Strelin® (histrelina injetável), um análogo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), a fim de obter um maior controle do momento da ovulação, que acontecia de 36 à 48h após sua aplicação.

Quando observada a ovulação, realizava-se o descongelamento do sêmen em banho-maria a 46°C por 20 segundos. Após o descongelamento, o sêmen era avaliado no microscópio, e caso estivesse abaixo de 40% de motilidade, o mesmo era centrifugado a 600G (constante gravitacional) por 10 min e após a retirada do pellet era adicionada uma solução para separação e purificação do esperma equino, o Equipure®, melhorando assim seus parâmetros para posterior inseminação.

Previamente à inseminação era realizada a limpeza da ampola retal e lavagem da vulva com gaze embebida em solução à base de gluconato de clorexidina a 2%, seguida de secagem com lenços absorvíveis. Um lenço absorvível era dobrado e adicionado gel lubrificante, a fim de se realizar a limpeza interna da vulva.

A deposição do sêmen era realizada utilizando uma luva de palpação descartável, do lado estéril com lubrificante, junto com a pipeta de inseminação. A pipeta era inserida na vagina ultrapassando a cérvix e, após, com a mão pelo reto, a pipeta era direcionada ao ápice do corno uterino direito ou esquerdo, de acordo com a localização da ovulação. Quando a pipeta já estava inserida, o sêmen era depositado palheta a palheta com auxílio de uma haste flexível (Figura 3).



FIGURA 1 - Inseminação artificial com sêmen congelado com auxílio de haste flexível.

Segundo Camargo et al. (2013) não é mais necessário se fazer o controle folicular da doadora a cada 6h se houver a indução da mesma no momento ideal. O mesmo sugere que a indução a ovulação seja realizada às 20h do dia em que se observar presença de um folículo $\geq 35\text{mm}$ de diâmetro, presença de edema uterino (3-4) e cérvix relaxada. Palpando-se a égua na manhã seguinte a indução se checam os sinais pré-ovulatórios para avaliar momento ideal da próxima palpação, geralmente sendo 36h após a indução (8h da manhã) e repetição a cada 4h. Se deve lembrar que cada hormônio possui um tempo específico atuante até a ovulação, sendo que a gonadotrofina coriônica humana (HCG) dura 38 horas e a histrelina dura 42 horas.

2.2.4 Colheita e inovulação de embriões

A colheita de embriões foi realizada oito dias pós-ovulação quando a inseminação foi a partir de sêmen fresco e nove dias pós-ovulação quando a inseminação foi a partir de sêmen congelado. Previamente à colheita, realizava-se a limpeza da ampola retal seguida de limpeza da região vulvar da égua doadora.

Para realização da técnica utilizava-se uma sonda Bivona® de número 28, com intuito de não lesionar a cérvix, sendo inserida no corpo uterino e inflando-se o balão para sua fixação. Juntamente com a sonda, era infundido de três a quatro litros de solução de Ringer-lactato, variando de acordo com o tamanho do útero da égua e, após cada litro infundido, o filtro era cuidadosamente avaliado a procura do embrião (Figura 1).

Após a coleta e procura, se encontrado, classificava-se os embriões e posteriormente estes eram inseridos em meio de manutenção Holding® para posterior envase em palheta de 0,5ml sendo acoplada ao inovulador, seguido de inovulação em uma receptora (Figura 1), na qual caso fosse de protocolo artificial se administrava uma dose de 6ml de P₄ de longa ação com o intuito de ajudar na manutenção da gestação.



FIGURA 2 - À esquerda o filtro após colheita do embrião e a direita, procedimento de inovulação do embrião na receptora.

2.2.5 Diagnóstico de gestação e sexagem fetal

Os diagnósticos foram realizados com auxílio de palpação retal e exame ultrassonográfico. Para programas de TE, o diagnóstico é preconizado 4 dias pós TE, estando o embrião em seu 12º à 13º dia de desenvolvimento. Na CER, realizava-se o diagnóstico com 13 dias de desenvolvimento embrionário e repetia-se com 20, 27, 45, 60 e 90 dias respectivamente, podendo ser visualizada a vesícula embrionária com característica de uma esfera anecoica e, a partir de 22 a 24 dias de desenvolvimento embrionário, eram avaliados os batimentos cardíacos.

Receptoras prenhes eram mantidas nas dependências da CER até os 60 dias de gestação e após eram encaminhadas para o proprietário do embrião, caso permanecessem, eram avaliadas uma vez ao mês, sempre em terças-feiras para checagem de batimentos cardíacos dos fetos.

Aos 120 dias de gestação, era realizada a sexagem fetal por meio de identificação de gônadas e genitália. Para a realização da sexagem todo abdômen era avaliado a fim de se identificar os órgãos sexuais de forma que o transdutor é posicionado paralelo à coluna vertebral onde a gônada é identificada caudal ao abdômen fetal. As gônadas possuem de dois a sete

centímetros de comprimento tendo estrutura circular. Sua ecogenicidade é semelhante à ecogenicidade do fígado, os machos possuem uma linha central longitudinal mais ecoica (mediastino) e as fêmeas uma estrutura circular com um halo hipocogênico central (região cortical e medular) (OLIVEIRA et al, 2014). A inexperiência do avaliador, o posicionamento do feto e/ou um feto muito ativo podem dificultar o diagnóstico.

2.2.6 Colheita de sêmen

Os garanhões coletados eram alojados em baias de alvenaria com camas de serragem. A coleta foi realizada utilizando uma vagina artificial modelo Botucatu, onde no seu interior foi inserida uma mucosa plástica descartável, um tubo coletor de sêmen contendo um filtro para separação de uma fração gel, água aquecida a 55°C com temperatura interna variando de 42-46°C (mimetizando temperatura vaginal da égua), e ar para mimetizar a pressão da mesma.

Para colheita, uma égua demonstrando sinais de estro foi utilizada com o intuito de excitar o garanhão até subsequente exposição do pênis, realizando-se assim a higienização do pênis com água morna. Ao primeiro sinal de salto no manequim o pênis foi desviado lateralmente e inserido na vagina artificial até sua base e após a ejaculação, a água da vagina foi desprezada facilitando a retirada do pênis por alívio de pressão interna. Em casos de coleta de sêmen fora da CER o mesmo fora realizado com salto em uma égua devidamente contida (Figura 2).



FIGURA 3 -À esquerda coleta de sêmen utilizando manequim e a direita coleta utilizando égua contida.

Depois de realizada a coleta, o sêmen foi analisado através de parâmetros como volume, aspecto, coloração e odor. Posteriormente se diluiu com Botusêmen®, na proporção 1:1, e uma

alíquota foi pipetada em uma lâmina e recoberta com uma lamínula, para que avaliação de parâmetros como motilidade total e vigor em microscópio óptico. Posteriormente à essa avaliação, preparava-se em um criotubo uma diluição de 1:20 (sêmen/água), para avaliação da concentração total de espermatozoides na câmara de Neubauer. Parâmetros ideais consistem em volume do ejaculado de 60-100 ml com motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (PAPA et al, 2014).

2.2.7 Refrigeração e criopreservação do sêmen

Com base nos resultados da análise de sêmen, uma nova diluição era realizada a fim de se manter parâmetros pré-estipulados como concentração de 50×10^6 espermatozoides por ml e após, o sêmen era depositado em um recipiente plástico (BotuIA®) próprio para transporte com um reservatório (BotuFlex®/MaxFlex®) exclusivo para curtas distâncias e tempo inferior a 48 horas.

Este reservatório consiste em uma caixa de isopor que permite um transporte seguro mantendo a refrigeração adequada até seu destino final. A caixa possui compartimentos para posicionar até dois gelos recicláveis (devendo estar congelados por no mínimo 24h de antecedência) (Figura 4). De acordo com o tempo e a distância a ser percorrida se opta por uma curva de refrigeração a 15°C utilizando-se um gelo que dura por 24h ou uma curva a 5°C com dois gelos com duração de até 48h (PAPA et al. 2014).



FIGURA 4 - Caixa térmica compartimentada.

Havendo o pedido ou necessidade de se fazer o congelamento do sêmen, utilizavam-se parâmetros previamente analisados como volume do ejaculado e motilidade, após calculava-se

a concentração total e número de espermatozoides viáveis totais para que assim se chegasse ao número de palhetas a serem congeladas e o volume de crioprotetor (BotuCrio®) a ser adicionado.

O sêmen diluído era centrifugado (600G por 10 min) a fim de se remover o plasma seminal, depois de centrifugado o sobrenadante era desprezado e o pellet ressuspendido com diluidor de concentração para que assim fosse envasado nas palhetas e posteriormente congelado.

Para amostras de sêmen com baixa qualidade era utilizado o Equipure® (gradiente para seleção espermática) com o objetivo de melhorar os parâmetros. O meio atua como um gradiente de densidade, onde um pellet de espermatozoides vivos se forma no fundo do tubo Falcon, e os mortos ficam no sobrenadante acima da barreira formada pelo produto. A técnica consiste em colocar 5ml do meio em um tubo Falcon de 15ml, adicionando gradativamente e com cuidado o sêmen concentrado, para que assim seja centrifugado por 20 minutos a 600G. Garantindo a separação de espermatozoides vivos e mortos. Após o descarte do sobrenadante se adicionava o crioprotetor ao pellet para ressuspensão e posterior envasamento.

O envase do sêmen era realizado em palhetas previamente identificadas com o nome do ganhão, partida do sêmen, data e registro. Após eram fechadas com álcool polivinílico, e refrigeradas à temperatura de 5° C na geladeira por 20 minutos. A segunda etapa consistia em congelamento a -30°C por mais 20 minutos a uma distância de 6cm do nitrogênio líquido (segunda curva de congelamento). Decorrido esse tempo, as palhetas foram imersas no nitrogênio para última curva de congelamento, onde permanecem armazenadas a -196°C.

Uma palheta era escolhida para o teste de descongelamento, onde eram avaliados todos os parâmetros com suas características finais (Tabela 2).

TABELA 2 - Quantidade de palhetas, motilidade pré e pós-congelamento, descartes de partidas e utilização de Equipure® para cada ganhão.

Ganhões	Nº de palhetas	Mot pré cong.(%)	Mot pós cong.(%)	Nº descartes (mot<20%)	Utilização de Equipure®
Lanzarote (PSA)	482	60%	50%	-	>80%
Heros Morab (PSA)	154	75%	55%	4 partidas	<20%
Baloarte do Vouga (PSL)	34	50%	45%	-	>80%
Hp Ali(PSA)	286	80%	65%	1 partida	>80%
El Shakhyr(PSA)	613	85%	75%	1 partida	<20%

2.2.8 Citologia

Para o exame de compra de receptoras, realizavam-se avaliações do ciclo estral, alterações uterinas por meio de US, idade, tamanho e avaliação uterina por meio da citologia, sendo esta, decisiva para a compra. Foram realizadas oito citologias em éguas receptoras avaliando-se principalmente a presença de células inflamatórias no útero. Após a coleta da amostra era realizado o esfregaço em uma lâmina e posteriormente corado com corante Panótico Rápido para ser avaliado (Figura 5).

A avaliação das amostras se dá pelo tipo celular encontrado nas lâminas. A interpretação se baseia na avaliação dos PMNs (principalmente neutrófilos) em relação às células endometriais ou número por campo (SOUZA, 2014). De acordo com Falomo et al. (2006) a porcentagem pode ser avaliada como negativa ($\leq 0,5\%$), leve (entre 0,5 a 5%), moderada (entre 5 a 30%) e grave ($\geq 30\%$). Na CER, a avaliação se dava por meio da porcentagem em relação às células endometriais, sendo assim, duas éguas das oito foram recusadas no exame de compra por apresentarem mais de 5% de neutrófilos nos esfregaços.

Também foi realizada a citologia em duas éguas doadoras que apresentavam persistência de líquido, indicando uma possível endometrite persistente. Em ambos os casos também foi realizada a cultura como exame complementar.



FIGURA 5 - À esquerda a coleta de amostras para citologia e a direita, confecção de esfregaço após coleta

3 DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidos temas de maior interesse que foram acompanhados durante o período de estágio como aspectos envolvidos na transferência de embriões, o manejo das receptoras de embriões e o diagnóstico de gestação das éguas.

3.1 Transferência de embrião

A técnica de transferência de embriões tem como objetivo acelerar o melhoramento genético através da produção de vários embriões que serão gestados por várias éguas receptoras em uma única estação de monta. Para a realização da técnica é necessária a seleção de doadoras de alto valor zootécnico, nas quais se realiza o controle da dinâmica folicular, sincronização da ovulação e IA. Cerca de sete dias após a inseminação, faz-se o lavado uterino na doadora com o intuito de se recuperar um embrião e inovulá-lo em uma égua receptora que conduzirá o período remanescente da gestação (HARTMAN, 2011).

De acordo com a tabela apresentada na seção 2, subseção 2.2, durante a realização do ECSMV, foram realizadas 96 colheitas de embriões e 224 inovulações, sendo destas, nove embriões produzidos por ICSI, que resultaram em quatro gestações. O emprego desta biotecnologia vem crescendo anualmente na espécie equina, mesmo considerando o fato que, na atualidade, o cavalo não é mais um meio de transporte ou de tração animal, mas sim está cada vez mais frequente na prática esportiva e no lazer, onde devido a este grande crescimento, a técnica de TE possibilita o aprimoramento de raças e cruzamentos (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009).

Esta biotécnicas tem sido utilizada como uma gestão de procedimentos para a produção de múltiplos potros por égua durante o ano, o melhor aproveitamento de éguas que possuam alto valor zootécnico e sejam idosas ou que estejam em atividade esportiva [...] Além disso, esta biotecnica favorece o maior controle de doenças quando da transferência de material genético entre estados ou países, bem como

obtenção de divisas através de exportações de embriões congelados (Lira, Peixoto, Silva 2009).

Segundo Alvarenga; Tongu (2017) o Brasil lidera a produção de embriões equinos, representando 50% dos transferidos no mundo. Contudo, seu custo ainda permanece alto em virtude de fatores que limitam a técnica reduzindo assim a eficiência dos programas. Dentre os fatores limitantes, os três principais são: dificuldade na superovulação de éguas, alto número de doadoras idosas ou éguas com problemas e manipulação inadequada do sêmen.

Losinno; Alvarenga (2006) já mencionava sobre as principais características a serem observadas antes da técnica de TE: dificuldade de superovular as doadoras, fertilidade do garanhão a ser escolhido, idade da doadora, correta detecção da ovulação, condição reprodutiva/nutricional e sanitária da receptora, treinamento do manipulador e qualidade do embrião. Destaca-se ainda, que através da técnica de transferência de embrião, é possível obter em média quatro ou mais potros por ano de uma mesma égua doadora.

3.1.1 Fisiologia reprodutiva da égua

O ciclo reprodutivo da égua é influenciado pela alta luminosidade, sendo assim consideradas como poliesticas estacionais de dias longos, onde o grande estímulo da luz solar influencia na produção de melatonina através da glândula pineal. Este hormônio age diretamente na secreção de GnRH, produzido pelo hipotálamo, tendo como consequência a liberação de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo-estimulante) pela hipófise que atuam diretamente sobre os ovários. O ciclo da égua dura em média 21 dias, sendo caracterizado por duas fases predominantes, o estro e o diestro com respectivamente 7 a 10 dias e 14 a 15 dias (ARBOITTE; MENEZES, 2006).

Segundo Ginther (1992) o sistema reprodutor da égua é dividido em dois grupos, o da hipófise e hipotálamo que atuam no controle hormonal e o grupo intrínseco que seriam os órgãos que compõe o trato reprodutivo propriamente dito (ovários, ovidutos, útero, cérvix, vagina e vulva).

A partir da liberação de FSH haverá a maturação e desenvolvimentos de folículos ovarianos, os quais secretarão estrógeno (E_2) a partir das células da granulosa. Seu pico indica desenvolvimento máximo do folículo dominante, estando em torno de 35mm e a égua demonstrará os primeiros sinais de cio, indicando a proximidade da ovulação. O LH tem seu

crescimento dois dias antes da ovulação (D0), porém seu pico é dois dias após a mesma, atuando diretamente no corpo hemorrágico, estimulando, por conseguinte o aumento de progesterona (LEY, 2006).

O desenvolvimento folicular em éguas pode ser dividido em três fases, são elas: início do crescimento do folículo primordial, recrutamento e crescimento de outros folículos e seleção do folículo dominante e subsequente atresia dos demais. Após o crescimento do folículo primordial, há o recrutamento folicular onde folículos tornam-se dependentes de FSH e LH para seu desenvolvimento, dando origem a chamada “onda folicular”. Estas são definidas como ondas maiores e menores, onde cada onda maior é subdividida em primária (crescimento de um folículo dominante na fase inicial do diestro, regredindo ou raramente ovulando) e secundária (crescimento de um folículo na metade do diestro, com o mesmo ovulando na fase de estro). Ondas menores são descritas como crescimento de folículos sem a presença de um dominante (PERES, 2004).

Os níveis de FSH aumentam de acordo com o crescimento folicular, tendo seu pico quando o folículo dominante atinge em torno de 13mm de diâmetro, dando início a fase de divergência folicular. Esta se caracteriza pela secreção de inibina através do folículo dominante, reduzindo assim os níveis de FSH. Esse mecanismo de feedback negativo, proporciona a seleção de apenas um folículo dominante e regressão dos demais. Com o aumento do folículo há também um grande edema uterino (gerado através da hiperplasia e hipertrofia de células endometriais) que reduzirá gradativamente próximo a ovulação (BERTOLDI, 2018).

Durante o ECSMV na CER, com auxílio da rotina de controle folicular conseguimos prever o momento da ovulação através de parâmetros avaliados a partir da imagem ultrassonográfica, nas quais podemos identificar diminuição do edema uterino (representando a diminuição dos níveis de E_2) conjuntamente com a deformidade da forma circular do folículo e espessamento de sua parede. A ovulação ocorre ao final do estro (24-48h), caracterizada por aumento nos níveis de LH.

Após a ovulação temos a formação do corpo hemorrágico e posteriormente ao corpo lúteo (CL) que secretará progesterona (P_4) através das células da teca e células da granulosa em torno de 24 à 36h após a ovulação, preparando o endométrio para uma possível gestação. Do 35º ao 70º dia de gestação, cálices endometriais farão a secreção da gonadotrofina coriônica equina (eCG), dando origem a corpos lúteos acessórios liberando por sua vez maiores níveis de progesterona, porém a placenta aos 120 dias de gestação é a maior fonte de P_4 . Caso não ocorra a fertilização, o endométrio secretará prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) a partir do 13º dia do ciclo,

fazendo a lise do CL, reduzindo os níveis de P₄ circulantes iniciando assim um novo ciclo (SÁ, 2017).

3.1.2 Manejo da doadora

A seleção da égua doadora vem acompanhada de diversos fatores a serem avaliados, tais como seu histórico reprodutivo, característica da raça, condição uterina, conformação vulvar e valor do potro desejado (MARTINS; LEAL, 2017). Boas candidatas ao processo da TE tem sido éguas idosas férteis, porém tem grandes perdas de morte embrionária precoce (MEP), devido a patologias decorrentes da idade, falhas na maturação oocitária e processos inflamatórios crônicos (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Segundo Vanderwall; Woods (2007) deve-se avaliar o comportamento reprodutivo da égua por meio de manejo diário com auxílio de palpação retal e ultrassonografia a fim de se identificar ciclicidade, atividade folicular e ovulação. Estes parâmetros permitem constatar o melhor momento para inseminação com sêmen fresco e congelado, garantindo assim melhores resultados finais.

Na CER, éguas doadoras eram mantidas em baias (Figura 6) e em sistema de pasto (Figura 7), sua alimentação era baseada em ração duas vezes ao dia e feno três vezes ao dia, eram identificadas pelo nome nas baias e também com utilização de coleiras quando permaneciam no sistema de pasto. A rotina de controle folicular era realizada diariamente por volta de 8h, a partir de uma planilha de controle atualizada de acordo com o parecer de cada doadora. No momento da avaliação de cada égua, realizava-se a palpação retal, exame ultrassonográfico a fim de se identificar crescimento folicular, presença de edema uterino, fluido intrauterino e ovulação.



FIGURA 5 - Éguas doadoras mantidas em baias.



FIGURA 6 - Éguas doadoras a campo.

3.1.3 Uso de Implante Intravaginal de Progesterona em Doadoras

Segundo Cuervo-Arango; Clark (2010), a égua entra em um período de transição no início da primavera, denominado o período entre o anestro e sua primeira ovulação na temporada de monta. Nessa fase, há a regressão de folículos dominantes e um ciclo irregular. Acredita-se que os índices de prenhez nesta fase sejam menores do que nas ovulações seguintes, em contrapartida, utilizam-se métodos como o uso de progestágenos a fim de se melhorar a eficiência da ovulação e auxiliar na regulação do ciclo.

Um estudo realizado comprovou a eficácia do uso do implante intravaginal CIDR-B® em combinação a uma injeção de PGF2 α (prostaglandina), onde 86,6% (13/15) das éguas em período de transição responderam ao tratamento de indução de estro observando a eficácia do seu uso (KUMAR et al., 2011).

Várias alternativas com intuito de se antecipar a primeira ovulação estão sendo utilizadas atualmente. Segundo Botelho (2012) um dos entraves do uso do dispositivo é a de que podemos ter aumento no índice de vaginite nas éguas, tendo como alternativas extras o uso de P₄ injetável em combinação com injeção de PGF2 α no momento de retirada do implante, mostrando-se eficaz. Outro estudo comparou a utilização de norgestomet, acetato de melengestrol e Altrenogest® em três grupos de controle diferentes, com nove dias de duração do tratamento. Como resultado final, o implante de norgestomet e a suspensão oral de Altrenogest® apresentaram os melhores índices, sendo considerado o implante de preferência devido a melhor praticidade e maior sincronização. Já o acetato de Melengestrol não se mostrou eficaz (ALMEIDA et al., 2001).

Durante o ECSMV na CER, foi utilizado o dispositivo intravaginal de progestágeno (CIDR®) em cinco éguas (Tabela 3), as quais ainda se apresentavam no período de transição. O intuito foi estimular a regulação do ciclo para melhor aproveitamento da mesma durante a temporada. O dispositivo era inserido na vulva chegando ao fundo de vagina e retirado após 10 dias (simulando presença de um CL), no 6º dia de uso, aplicava-se 1ml de PGF2 α (com função mimetizar a luteólise), reproduzindo assim um ciclo natural. A partir de seu uso foi possível observar a eficácia de 80%, onde quatro éguas saíram do período de transição apresentando maior desenvolvimento folicular e em apenas 20% (1/5) observou-se sua inaplicabilidade bem como desenvolvimento de vaginite.

TABELA 3 - Relação entre o uso de CIDR®, eficácia e vaginite.

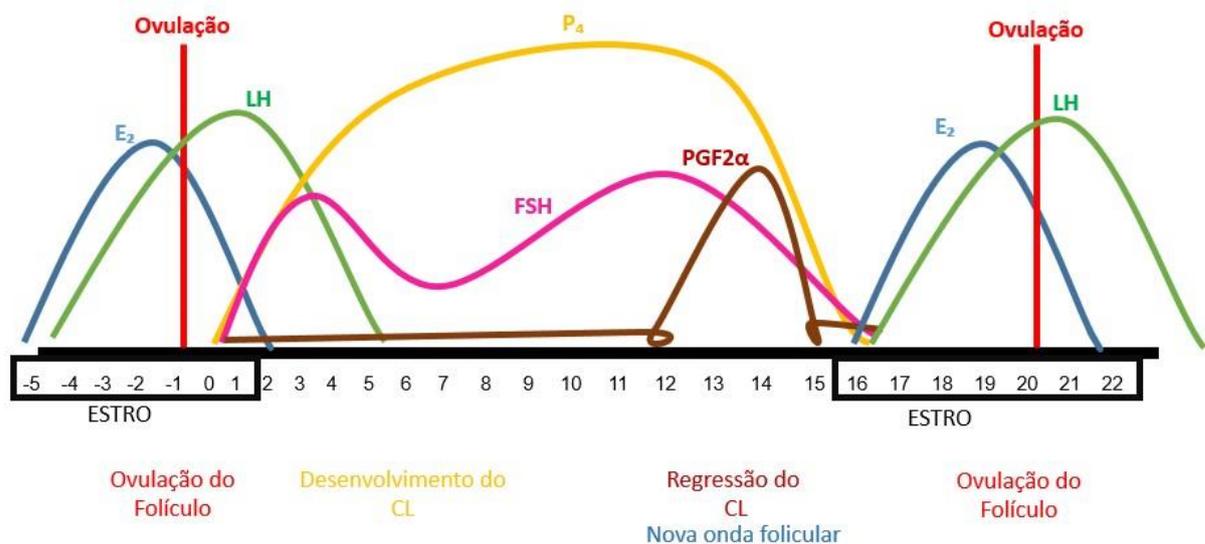
Égua com implante de CIDR®	Eficácia	Vaginite
A (PSL)	+	-
B (QM)*	-	+
C (QM)	+	-
D (QM)	+	-
E (QM)	+	-

* Égua com conformação vulvar irregular.

Nos meses de outono e inverno as éguas têm mínima ou nenhuma atividade reprodutiva, sendo então caracterizadas em período de transição ou anestro, justificando sua irregularidade de ciclos e ovulações. De acordo com a figura 8, podemos analisar o momento da ovulação, bem como os níveis de cada hormônio atuando sobre a fase do ciclo em que se encontra, onde o estro é caracterizado pelo aumento de E_2 e LH que promovem a ovulação, bem como na fase de diestro onde ocorre a diminuição destes com consequente aumento de P_4 que preparará o útero para uma possível gestação ou então sofrerá diminuição dos seus níveis cerca de 12 dias pós ovulação, através da secreção endometrial de $PGF2\alpha$ atuando na regressão do CL, iniciando assim um novo ciclo.

FIGURA 7 - Esquema do ciclo estral da égua.

Fonte: Adaptado de Equine-Reproduction.com LLC [2015].



3.1.4 Tratamento para superovulação

Segundo Lira; Peixoto; Silva (2009), os custos de um programa de TE reduziram significativamente com o uso de tratamento de superovulação efetivos, porém, alguns entraves na espécie equina acabam retardando e limitando o processo, quando comparado a outras

espécies. Ainda não há um produto eficaz para que a superovulação se torne um tratamento de rotina em equinos, sendo considerado este o principal entrave encontrado, porém trabalhos e tentativas estão sendo realizadas com diversos hormônios, onde os principais são: liberadores de gonadotrofinas (GnRH), FSH suíno (FSH-p) e equino (FSH-e), gonadotrofina coriônica equina (ECG) e extrato de pituitária equina (EPE).

Na CER foi realizado há um ano um estudo associando o uso de sulpirida e deslorrelina. Segundo Bertoldi (2018), foram avaliados dois grupos de animais, onde no primeiro grupo os animais recebiam aplicações de 150µg de deslorrelina IM a cada 12h até que o maior folículo atingisse 33mm de diâmetro e então era realizada a indução com hCG. O segundo grupo recebeu o mesmo tratamento, porém, com adição da administração de 1g de sulpirida VO uma vez ao dia até o momento da indução de ovulação. Contudo, ao fim do estudo não se evidenciou aumento nas taxas de duplas ovulações. Desta forma, atualmente, não se busca mais pela superovulação, mas sim um estímulo para ovulação dupla. O protocolo utilizado para dupla ovulação conforme ilustrado na FIG. 9, é de administração de 0,8–1 ml de desloreline a cada 12h de 3-5 dias, iniciando com folículos de 20 e 23mm. Quando o menor folículo atinge em torno de 35mm então é induzida a ovulação com 1 ml de hCG IV.

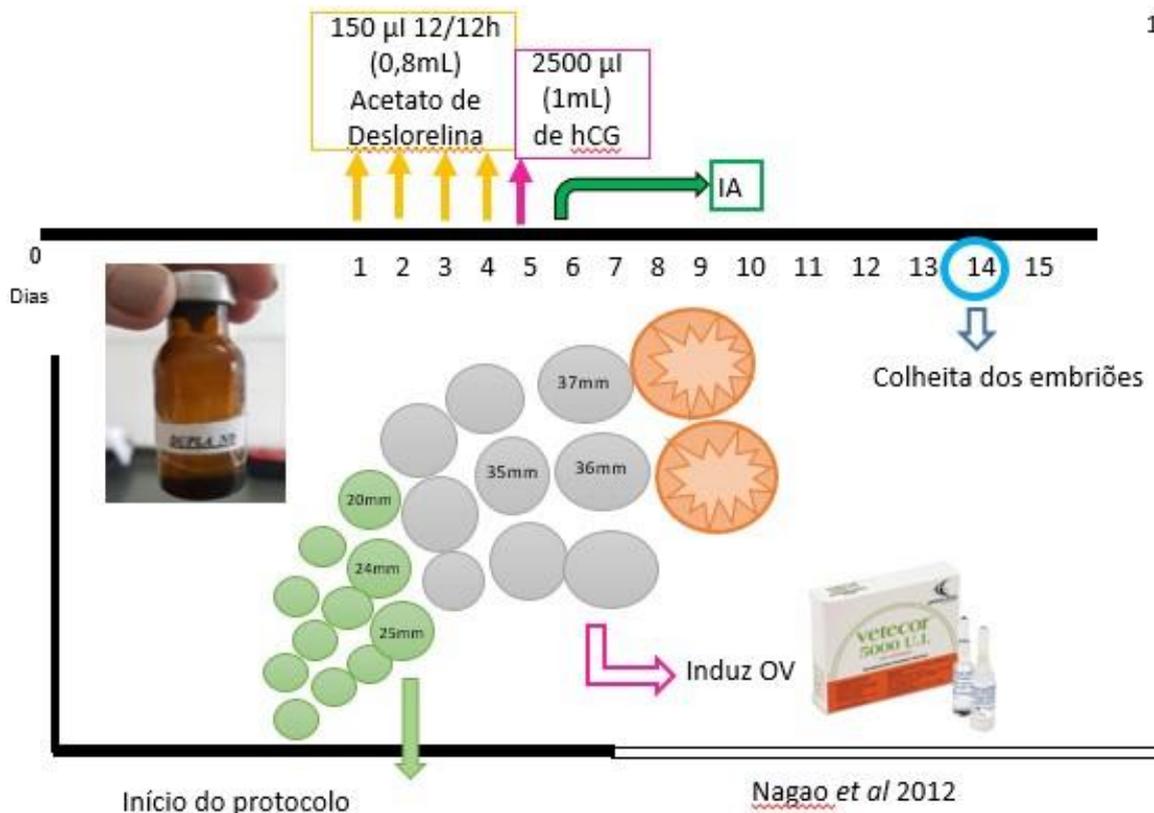


FIGURA 8 - Esquema representando o protocolo para dupla ovulação na CER.

3.1.5 Colheita de embrião

Segundo Lira; Peixoto; Silva (2009), os embriões são transportados para o útero entre o dia cinco e seis após fertilização estando em estágio de mórula compacta, após entrar no lúmen uterino se desenvolvem chegando ao estágio de blastocisto. A colheita é indicada entre o 7º e 8º dia pós-fertilização. A mesma consiste em uma lavagem transcervical com introdução de um cateter de silicone com balão tendo diâmetro de 8mm. Após sua introdução no corpo do útero, o balão é inflado com cerca 40ml de ar, fazendo uma “vedação” e, em seguida, é infundida uma solução salina/ringer lactato (1-2L) previamente aquecida (30-35°C) lavando o órgão. O corpo do útero é massageado e a solução é drenada para um filtro, esse processo se repete de 3 a 4 vezes e o volume infundido varia de acordo com o tamanho do útero de cada doadora. Durante o último lavado é indicado a administração de ocitocina associando a massagem uterina transretal, processo esse que aumenta a taxa de recuperação embrionária em 10%.

As colheitas de embriões na CER foram realizadas entre os dias oito (D8) e nove (D9) após ovulação nos casos em que a inseminação foi realizada com sêmen fresco e nove dias (D9) após ovulação nos casos em que se utilizou sêmen congelado. As éguas, após contidas no tronco apropriado (Figura 12), eram sedadas com cloridrato de detomidina (com a dose variando de acordo com o peso e temperamento do animal) a fim de proporcionar maior segurança ao veterinário no momento da colheita. Após o procedimento e avaliação do flushing, aplicava-se 1ml de PGF2 α na doadora induzindo a luteólise e retorno prévio ao desenvolvimento folicular. A CER preconizava um planejamento dos lavados para colheita de embrião, onde através da planilha conseguia-se ter maior organização quanto ao momento ideal para realizar a lavagem.

FIGURA 9 - Preparo da égua doadora para coleta de embriões, à esquerda contenção e à direita, limpeza da vulva e vestibulo.

Uma teoria que explica um pouco sobre a escolha da colheita de embrião ao 9º dia, quando inseminadas com sêmen congelado, é a de que como a inseminação ocorre após a ovulação, o embrião tende a demorar mais para entrar no útero além de também serem menores



devido a um crescimento mais lento comparado a inseminação a fresco (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009; CUERVO-ARANGO; CLAES; STOUT, 2018). Já Marinone et al, (2015) cita que em éguas com mais de 15 anos, as melhores taxas de recuperação embrionária são

encontradas em lavados mais tardios (8,5-9,5-10 dias) devido a uma maturação ovocitária mais lenta e desenvolvimento embrionário na tuba uterina, mais tardio.

Na CER previamente a colheita do embrião realizava-se a sedação da égua para melhor manipulação durante o processo, limpava-se o reto e posteriormente higienizava-se a vulva e região perineal com solução à base de gluconato de clorexidina a 2%. Utilizava-se um cateter de silicone de 28mm (Bivona®) e acoplava-o em um filtro (sistema aberto). Para a colheita se utilizava solução de ringer lactato pré-aquecido a 30°C, onde o volume a ser infundido variava de acordo com tamanho do útero e idade da égua. Introduzia-se o cateter passando pela cérvix chegando ao corpo do útero e inflando o balão com cerca de 40ml de ar, tracionava-se a sonda delicadamente para checagem de que o mesmo estava inflado. Por conseguinte, o primeiro litro de ringer lactato era infundido e realizava-se a massagem transretal no útero. O processo era repetido no máximo quatro vezes, previamente ao último litro de ringer lactato a ser infundido administrava-se 2ml de ocitocina IV com intuito de promover contrações uterinas facilitando a drenagem do líquido e aumentando a taxa de recuperação embrionária. Após, finalizado o processo, o filtro era encaminhado para o laboratório para a realização da busca do embrião.

Vanderwall (2003) dá ênfase ao procedimento de coleta indicando a correta higienização da região perineal, utilização de luva estéril pelo operador. Além disso, ressalta o procedimento de introdução do cateter com auxílio do dedo indicador do operador introduzindo o cateter até o corpo do útero e inflado o balão com 50ml de ar selando a abertura da cérvix. Afirma ainda que o melhor sistema é o fechado, utilizando o cateter em Y, estando uma extremidade acoplada ao recipiente com líquido e outra extremidade ao filtro de embrião.

Lavados considerados positivos, com presença do embrião, eram transferidos para receptoras previamente preparadas e selecionadas e o diagnóstico de gestação realizado quatro a cinco dias após a TE, completando então 12 a 13 dias de desenvolvimento embrionário. Na CER, utilizava-se a administração de 1ml de PGF2 α sintética (Lutalyse®) em éguas doadoras, com intuito de adiantar o retorno de desenvolvimento folicular, podendo assim ter maior aproveitamento de ciclos durante a estação de monta.

Diferente da raça Crioula no Rio Grande do Sul, doadoras da raça PSA, QM e PSL mantidas na CER ciclavam o ano inteiro, fator este devido a sua rica dieta energética e localização (São Paulo está mais próxima da linha do Equador). De acordo com Aristizábal et al. (2017) se éguas criadas no mesmo sistema da CER (próximo à linha do Equador e com boa condição corporal) fossem transferidas para outras latitudes mais distantes (como no caso do Rio Grande do Sul), estas mesmas doadoras apresentariam comportamento poliéstrico estacional devido à variação de luminosidade.

3.1.6 Manipulação, avaliação e inovulação de embriões

Após o procedimento de colheita o conteúdo do filtro era depositado em uma placa de Petri riscada no fundo, onde era realizada a busca do embrião com auxílio de uma lupa no aumento de 10x inicialmente e depois 40x, sendo a seguir realizada a avaliação e classificação.

Lira; Peixoto; Silva (2009) indica que o embrião seja lavado em 10 gotas consecutivas em meio de manutenção a fim de se retirar as impurezas presentes na zona pelúcida. No ECSMV o embrião era lavado, exclusivamente, em casos de alta descamação ou lavado turvo. Se o lavado viesse límpido, o embrião não passava por esse processo.

A avaliação do embrião é realizada de forma subjetiva, levando em consideração o estágio de desenvolvimento e características morfológicas. A classificação do estágio de desenvolvimento e qualidade é realizada conforme recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society), geralmente em colheitas se identificam embriões classificados como mórula, blastocisto inicial e blastocisto expandido, e sua avaliação de qualidade varia de 1 a 5, onde parâmetros como simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida são avaliados (Tabela 4) (LIRA; PEIXOTO; SILVA 2009). Além destas recomendações, a CER utilizava como referência uma tabela do Laboratório de Reprodução Equina da Universidade do Colorado (Anexo A).

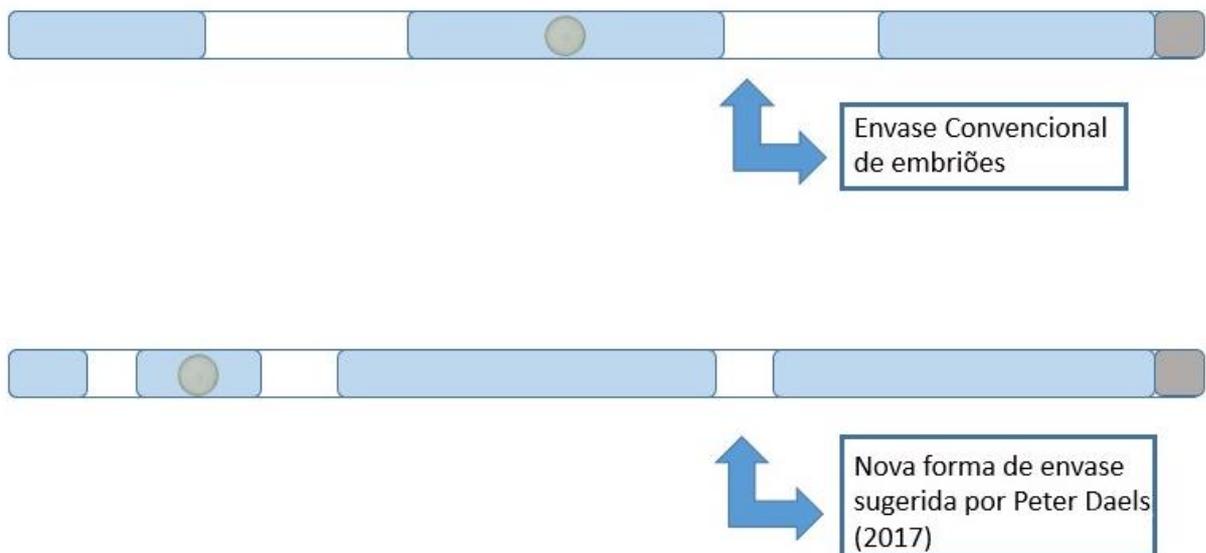
TABELA 4 - Classificação de embriões conforme aparência e características.

Grau	Categoria	Aparência	Característica
1	Excelente	Esférico	Tamanho, cor e textura uniforme.
2	Bom	Poucas Imperfeições	Alguns blastômeros deslocados, forma irregular, separação do trofoblasto.
3	Regular	Problemas óbvios	Blastômeros deslocados, células degeneradas, blastocele colapsada.
4	Ruim	Problemas severos/imperfeições	Blastocele colapsada, muitos blastômeros deslocados, células degeneradas.

Após a avaliação, os embriões eram envasados para a realização da inovulação de acordo com sua classificação, onde os estádios de mórula a blastocisto seriam aspirados em palhetas de 0,5 ml acopladas a uma seringa de insulina e quando considerado como blastocisto expandido aspirava-se com pipeta de inseminação acoplada a uma seringa de 5 ml. A disposição era a mesma nas diferentes formas, mantendo a sequência de meio (evitando aderência do embrião ao algodão da palheta); ar; meio com o embrião; ar e uma última coluna de meio.

Bertoldi (informação verbal)¹ cita um trabalho de Peter Daels (2017) sugerindo uma nova forma de envase de embriões, baseada em uma sequência de uma coluna grande de meio; uma coluna de ar; uma coluna grande de meio; outra coluna de ar; uma pequena coluna de meio contendo o embrião; outra coluna de ar e uma última coluna de meio. Esta disposição facilitaria a saída do embrião pelo maior volume de meio e reduziria o índice de embriões que permanecem acoplados nas pipetas (1-2%) (Figura 13).

FIGURA 10 - – Figura esquemática representando o envase de embriões no método convencional e no método



sugerido por Peter Daels.

Fonte: Adaptado de Daniela dos Santos Brum [2017].

¹ Informação fornecida por Ariel Cunhasque Bertoldi em 20/10/2018, no 3º EMBRACRIO – Encontro Minitube sobre Biotecnologia da Reprodução Aplicada à Raça Crioula. Porto Alegre (ANEXO B).

Taxas de prenhez pelo método de TE de forma não cirúrgica ultrapassaram as taxas pelo método cirúrgico. O primeiro, além de ser menos invasivo à receptora, também demanda menos tempo e facilita o processo. O procedimento convencional, mais utilizado atualmente, é o de deposição do embrião na luz no útero da receptora (VANDERWALL, 2003). Pesquisas compararam a técnica convencional com a técnica de Wilsher, esta consiste em, com a ajuda de um espécuro vaginal, utilizar uma pinça (fórceps-grasp) para “segurar” a cérvix introduzindo então a pipeta e inovulando o embrião, reduzindo assim a manipulação da cérvix quando comparada com o processo convencional, neste o operador insere o dedo na cérvix para então introduzir a pipeta. A técnica de Wilsher aumentou em 10% os índices de prenhez e o estudo ainda afirma não necessitar de treinamento ou experiência para a sua aplicação pelo fato da visualização da cérvix facilitar o procedimento de inovulação (WILSHER & ALLEN, 2004).

Durante o ECSMV para a técnica de TE foi utilizado o método convencional, onde previamente a inovulação realizava-se a limpeza da ampola retal com posterior higienização da região perineal. No momento da Inovulação era utilizada uma luva de palpação invertida, sendo então introduzida a pipeta pela cérvix até o ápice do corno uterino, fazendo assim a deposição do embrião.

3.2 Manejo de receptoras

Grande parte do sucesso da TE se deve a escolha correta da receptora, que se inicia no processo de compra até seu controle folicular. No CER preconizavam-se éguas que fossem jovens, dóceis, de boa conformação vulvar, bom escore de condição corporal e de porte grande. Segundo Losinno; Alvarenga (2006), a idade da égua receptora influencia, pois há maior chance de perda embrionária e o custo benefício não se aplicará de forma positiva, afinal, quanto mais idosa, menos estações reprodutivas poderão ser aproveitadas. Por conseguinte, era realizada palpação retal, exame de ultrassom para checar condições uterinas, presença de cistos e avaliar ovários e também se realizava a citologia uterina. Caso a receptora estivesse apta, realizavam-se coleta de sangue e envio para laboratório para exames de Anemia Infecciosa Equina, Influenza Equina e Mormo. Receptoras adquiridas ficavam em um piquete de quarentena e após eram remanejadas para o pasto entrando assim para a rotina do controle folicular.

A escolha da receptora é de suma importância, tendo influência direta nos índices de fertilidade como taxa de prenhez pós TE e MEP, deve-se sempre atentar a sincronização de

receptoras e doadoras antes do momento da transferência avaliando os detalhes como tônus uterino, cérvix fechada e um CL homogêneo (ARISTIZÁBAL, 2017). Na CER, doadoras ciclavam o ano inteiro por ser uma região localizada no Sudeste do País com maiores índices de luminosidade e também por terem uma dieta altamente energética, o que acarretava em dificuldade de sincronizar receptoras que ciclavam mais tarde, tendo então como alternativa de suporte o protocolo artificial em receptoras.

Em casos de receptoras já cíclicas, estas foram avaliadas diariamente a fim de se checar presença e tamanho de folículos, tônus uterino e presença de CL. Caso houvesse acúmulo de líquido era administrado o uso de ocitocina e em casos de suspeita de endometrite fazia-se cultura uterina bem como lavados uterinos tanto com Ringer-lactato isolado ou associado com DMSO.

Com aumento da demanda por receptoras devido ao número de embriões recebidos na CER, optava-se pelo protocolo artificial. O mesmo se baseia em administração de 2ml de E₂ IM, e reavaliação da égua no dia seguinte para avaliação de edema. Caso o edema fosse ideal, bloqueava-se a égua com P₄ para utilizar na rotina de TE. As aplicações de E₂ baseavam-se no tamanho do edema, podendo se repetir a dose por até cinco dias, caso não precisasse mais bloquear a mesma, essa era afastada da rotina de palpções por uma semana até reduzir os níveis de estrógeno. Em situações onde a égua fosse bloqueada e não precisasse mais utilizá-la ou ultrapassasse o D7, a mesma era encaminhada para um arrendamento e afastada de 30-60 dias devido aos altos níveis de P₄. Sendo confirmada a prenhez em receptora de protocolo artificial a mesma seguia com aplicações semanais de P₄ longa ação (LA) até os 120 dias para manter assim, a gestação.

Silva; Meira (2014) afirma que ainda não há trabalhos que comprovem a eficácia de determinadas doses e hormônios específicos, alegando que a utilização destes protocolos é de fundamento empírico pelo fato de não saber o efeito da sua utilização sobre receptores de estradiol e progesterona no útero de receptoras acíclicas.

Conforme a figura 14, o protocolo utilizado na CER consiste em éguas acíclicas, tratadas com 2,5mg de E₂ por cerca de três dias, e após o último dia de aplicação de E₂ a mesma inicia seu tratamento com P₄ LA perdurando até os 120 dias. Alvarenga; Tongu (2017) cita que se podem utilizar receptoras cíclicas no protocolo artificial com boas taxas de prenhez, onde o tratamento consiste em uma receptora na fase de diestro (cinco-14 dias pós-ovulação), com uma aplicação de PGF₂α lisando o CL, quebrando o ciclo normal da égua e seguintes aplicações de E₂ e P₄ LA.

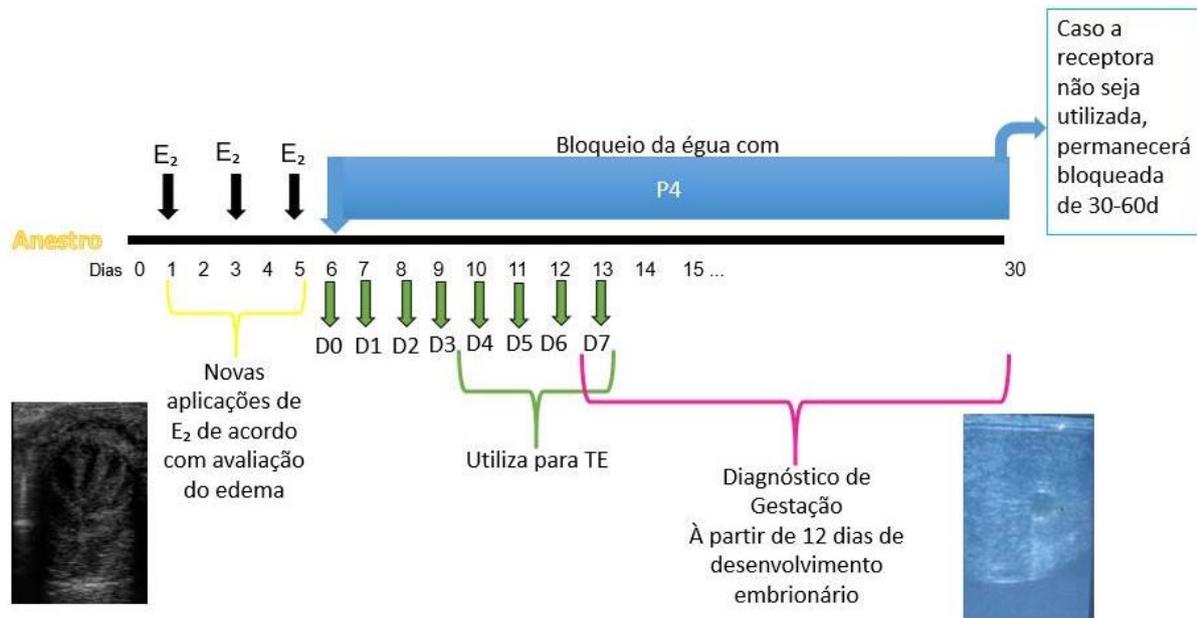


FIGURA 11 - – Esquema representando o protocolo utilizado na CER em casos de receptoras acíclicas.
Fonte: Adaptado de Daniela dos Santos Brum [2017].

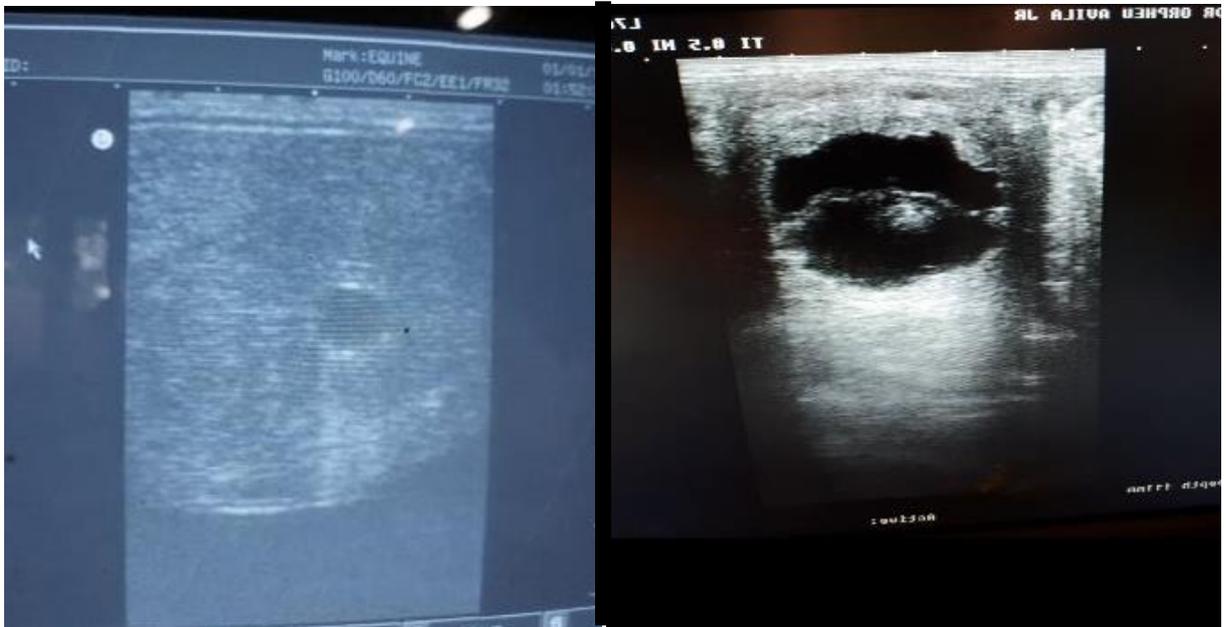
Outro fator que favorece o uso de receptoras acíclicas é a pressão econômica devido ao ano hípico (1º julho), momento em que os proprietários desejam que o potro nasça o quanto antes possível tendo assim maior tempo de preparação e vantagem sobre outros que nasçam mais tarde. Sendo assim, um grande número de veterinários tenta antecipar ao máximo a ciclicidade de receptoras, conseguindo sincronizar assim com doadoras, afim de que se tenha o quanto antes o diagnóstico da prenhez e posterior nascimento no melhor período (SILVA; MEIRA, 2014).

3.3 Diagnóstico de gestação

Taxas de prenhez após a TE variam de acordo com inúmeros fatores, desde o manejo correto com o garanhão, utilização do diluente correto e manejo adequado do sêmen, uso de materiais estéreis no momento da coleta bem como na manipulação do embrião, além da escolha correta da receptora. Segundo Riera (2009) as taxas de prenhez são maiores durante a primavera devido ao fato de que as melhores receptoras são utilizadas no início da estação de monta, onde clima e alimentação são geralmente melhores. Acredita-se também que outro fator ligado ao índice de prenhez é o estresse térmico passado por receptoras nos meses de verão, influenciando positivamente nos índices de MEP.

O diagnóstico de gestação na CER se dava aos 13 dias de desenvolvimento embrionário (Figura 16) e posteriormente aos 20, 27,45 e 60 dias. Aos 60 dias as receptoras são encaminhadas para as propriedades do dono do embrião, sendo realizado nesse momento a vacina (Lexington®). Caso alguma doadora permaneça por mais tempo, é cobrada uma tarifa e ela é reavaliada uma vez ao mês para checagem dos batimentos cardíacos (Figura 15), aos 120 dias é realizada a sexagem fetal para os proprietários que assim solicitarem. Os índices de MEP na CER variaram entre 10-15%, a taxa de recuperação embrionária no período de estágio foi de 60% e a taxa de prenhez pós TE foi de 76%.

FIGURA 12 - À esquerda, diagnóstico de gestação aos 13 dias de desenvolvimento embrionário e, à direita, avaliação de batimentos cardíacos após 30 dias.



CONCLUSÃO

A TE é uma técnica amplamente utilizada, porém vem ano a ano sendo aprimorada em busca de melhores resultados, com intuito de aumentar os índices de recuperação embrionária e conseqüente maior taxa de prenhez pós TE. Durante a realização do ECSMV foi possível acompanhar todo manejo reprodutivo e rotina diária, observando a importância de cada etapa até o momento do diagnóstico de gestação pós TE, proporcionando assim um grande aprendizado e experiência.

Além do manejo reprodutivo diário e acompanhamento de técnicas específicas, houve também a vivência de morar em uma central, onde se pode acompanhar desde o treinamento e alimentação dos animais alojados, manejo de pastagem, casos clínicos e também parte administrativa de gerenciamento. Acompanhar um Médico Veterinário foi de grande valia para a carreira profissional, agregando com certeza não só em aspectos científicos, mas também éticos e morais.

Vivenciar a rotina equina fora do estado do Rio Grande do Sul também foi muito importante devido à diversidade de raças, clima e manejo, ampliando assim a atuação prática nesta área. Além de todos os conhecimentos teóricos e práticos abordados, o fato de conviver com outros estagiários, Médicos Veterinários e residentes, podendo trocar experiências e informação foi de extrema valia tanto para vida profissional como também formação de caráter pessoal e enriquecimento de valores. Em conclusão, o ECSMV foi muito oportuno, proporcionando a certeza da área escolhida para vida profissional.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H.B. et al. **Sincronização de estro e dinâmica folicular de éguas Crioulas submetidas a tratamentos com norgestomet, acetato de melengestrol e altrenogest.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 38(6), 267-272, 2001. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5924>. Acesso em: 19 out.2018.
- ALVARENGA, M. A. TONGU, E.A.O. **Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.41, n.1, p.19-24, 2017. Disponível em [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p019-024%20\(RB656\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p019-024%20(RB656).pdf). Acesso em 19 out.2018.
- ARBOITE, M.Z.; MENEZES, L.F.G. **Equideocultura.** Santa Maria, 2006. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/2730955/poligrafo-equideo>. Acesso em: 18 jul. 2018.
- ARISTIZÁBAL, V.H.V. et al. **Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias.** Rev. Med. Vet., (33):137-47, Bogotá, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/313851310_Transferencia_de_embrioes_em_eguas_receptoras_anovulatorias. Acesso em: 23 out. 2018.
- BOTELHO, J.H.V. **Indução hormonal de estro regular em éguas Manga-larga Marchador em transição primaveril.** Lavras: UFLA, Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012. Disponível em: <repositorio.ufla.br/.../DISSERTAÇÃO%20Indução%20hormonal%20de%20estro%20r...> Acesso em: 17 out.2018.
- CAMARGO, E.C.; et al. **Some Factors Affecting the Rate of Pregnancy after Embryo Transfer Derived from the Brazilian Jumper Horse Breed.** Journal of Equine Veterinary Science , v. 33, p. 924-929, 2013. Disponível em: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-c0c022e9-47d4-3eeb-8f12-6cfe8dbb383c>. Acesso em: 23 out.2018.
- CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.N.; STOUT, T.A. **Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's fórceps-assisted transfer).** Veterinary Record 183, 323, 2018. Disponível em: <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/183/10/323.info>. Acesso em 17 out. 2018.

CUERVO-ARANGO, J.; CLARK, A. **The first ovulation of the breeding season in the mare: the effect of progesterone priming on pregnancy rate and breeding management (hCG response rate and number of services per cycle and mare)**. Anim Reprod Sci., Apr;118(2-4):265-9, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875255>. Acesso em: 19 out. 2018.

DAELS, P. **Development of an efficient freezing technique for embryos in the context of embryo transfer in the horse**. Department of Obstetrics, reproduction and herd health, Ghent University, Belgium, 2017. Disponível em: <https://researchportal.be/en/project/development-efficient-freezing-technique-embryos-context-embryo-transfer-horse>. Acesso em: 17 out. 2018.

DELL'AQUA Jr. et al. F.S. **Effect os packing systems and thawing temperature on spermatic parameters and fertility rate of frozen equine sêmen**. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.25 n.1, p.458-460, 2001. Disponível em: www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000075&pid=S1516...lng.... Acesso em: 17 out. 2018.

Equine-Reproduction.com LLC. **Ciclo estral da égua**. [2015]. Desenho.

FALOMO M. E. et al. **Interpretazione degli esami batteriologico, citologico e bioptico uterino nella fattrice**. Ippologia, 4:27-32, 2006. Disponível em: https://www.vetjournal.it/images/archive/pdf_riviste/3981.pdf. Acesso em 15 out. 2018.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare**. 2ªed. Cross, Plains, Wisconsin: Equiservices, 642p, 1992.

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

HEREDIA, B.; PALMEIRA, M.; LEITE, S.P. **Sociedade e Economia do "Agronegócio" no Brasil**. Rev. bras. Ci. Soc. [online], v.25, n.74, pp.159-176, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-69092010000300010&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 27 jul. 2018.

HOFFMANN, H. et al. **Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing**. Animal Reproduction Science, v.125, p.112-118, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470802>. Acesso em: 12 out. 2018.

KUMAR, R. et al. **Estrus induction and fertility response in anestrus mares with exogenous progesterone releasing device (CIDR-B) during late breeding season.** *Biology and Medicine*, 3 (2) Special Issue: 359-364, 2011. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/e3f2/66526599d71436cfe0cff9f41acec23671c6.pdf>. Acesso em: 19 out. 2018.

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

LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo.** Ministério da Cultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>. Acesso em: 27 jul. 2018.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. **Transferência de embrião em equinos: Revisão.** *Acta Veterinaria Brasilica*. Mossoró, v.3, n.4, p. 132- 140., 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/1421>. Acesso em: 20 out. 2018

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. **Frozen semen management in equine breeding programs.** *Theriogenology*, v.64, p.480-491, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000128&pid=S1516-3598201000130001400013&lng=es. Acesso em 28 jul. 2018.

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M.A. **Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina.** *Acta Scientiae Veterinariae*. V.34 (Supl 1) p. 39-29; 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000093&pid=S1516-3598201200030001900015&lng=pt. Acesso em: 25 jul. 2018.

MARINONE, A.I. et al. **The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina.** *Animal Reproduction Science*, v 158, Pages 53-59, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015001037>. Acesso em: 17 out. 2018.

MARTINS, G.N.; LEAL, D.R. **Transferência de embrião em equinos: Revisão.** *Simp.TCC/Sem.IC*, (12);2160-2165, 2017. Disponível em:

http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/1d604044d827ab47df595e01589b2f65.pdf. Acesso em: 12 out.2018.

OLIVEIRA, R.A. et al. **Sexagem fetal em equinos**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.38, n.1, p.37-42, 2014. Disponível em:
[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n1/pag37-42\(RB479%20Oliveira\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n1/pag37-42(RB479%20Oliveira).pdf). Acesso em: 27 jul. 2018.

PAPA, F.O. et al. **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP, 2014. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/6658021/manual-de-andrologia-papa-2014/6>. Acesso em: 10 out. 2018.

PERES, K. R. **Avaliação do uso do Hormônio Folículo Estimulante eqüino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a superovulação de éguas na fase de transição de primavera**. 131 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/98225>>. Acesso em 10 out.2018.

RIERA F.L. **General techniques and organization of large commercial embryo transfer programs**. Clinical Theriogenology, Philadelphia, v. 3,p. 318-324, 2011.

SÁ, M.A.F. **Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução em Éguas**. Barra Mansa (RJ): s.e., 2017. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/316237396_Fisiologia_e_Biotecnologia_da_Reproducao_em_Eguas. Acesso em 25 out. 2018.

SILVA, E.S.M; MEIRA, C. **Expressão endometrial de receptores de estradiol e progesterona em éguas cíclicas, gestantes e acíclicas tratadas com hormônios esteroidais**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v. 12, n. 22, p. 1-18, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/141291>>. Acesso em 23 out.2018.

SOUZA, R.T.R. **Sincronização de receptoras no diestro para utilização em programa de transferência de embriões em equinos**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2014. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/110623>. Acesso em: 14 out. 2018.

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

VANDERWALL, D. K. **Embryo collection, storage and transfer.**In: RONBINSON, N. E. (Ed.). Current therapy in equine medicine 5. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 280-285. Acesso em: 18 nov. 2018.

WILSHER S., ALLEN, W.R. **An improved method for nonsurgical embryo transfer in the mare.** Equine Veterinary Education, 2004. 16 (1), pg 39-44. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2042-3292.2004.tb00265.x>. Acesso em: 18 nov 2018.

ANEXO A – Referência para análise e classificação de embriões.

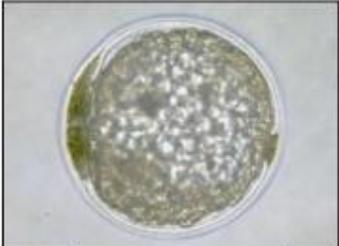
EVALUATION OF EQUINE EMBRYOS

EMBRYO QUALITY or GRADE (4-Point Scale)

Grade	Comment	Description
1	Excellent	No abnormalities observed; spherical in shape; cells of uniform size, color and texture; size and developmental stage appropriate for age post-ovulation
2	Good	Minor imperfections, such as a few extruded blastomeres or debris; slight irregularities in shape, size, color, or texture; limited separation between trophoblast layer and zona pellucida or capsule
3	Fair to Poor	Moderate level of imperfections, such as a larger percentage of extruded or degenerated blastomeres or debris; partial collapse of blastocoele; or moderate shrinkage of trophoblast from zona pellucida or capsule
4	Degenerate or Dead	Severe problems easily identified, such as a high percentage of extruded blastomeres, complete collapse of blastocoele, rupture of zona pellucida and/or capsule, or complete degeneration and embryonic death
UFO	UFO	Unfertilized oocyte



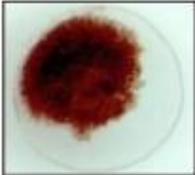
Grade 1 Blastocyst



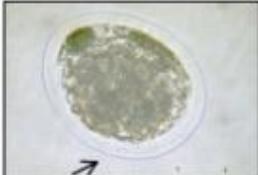
Grade 2 Blastocyst



Grade 3 Morula



Grade 4



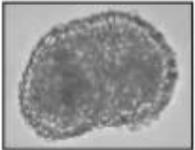
Grade 2 Morula (sperm in zona pellucida)



Grade 1 Early Blastocyst (cells attached)



Blastocyst (debris attached)



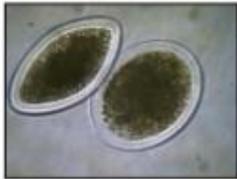
Non-Embryo (cell mass)



Non-Embryo (urine crystal and debris)



Size Determination (µm)



Unfertilized Oocyte

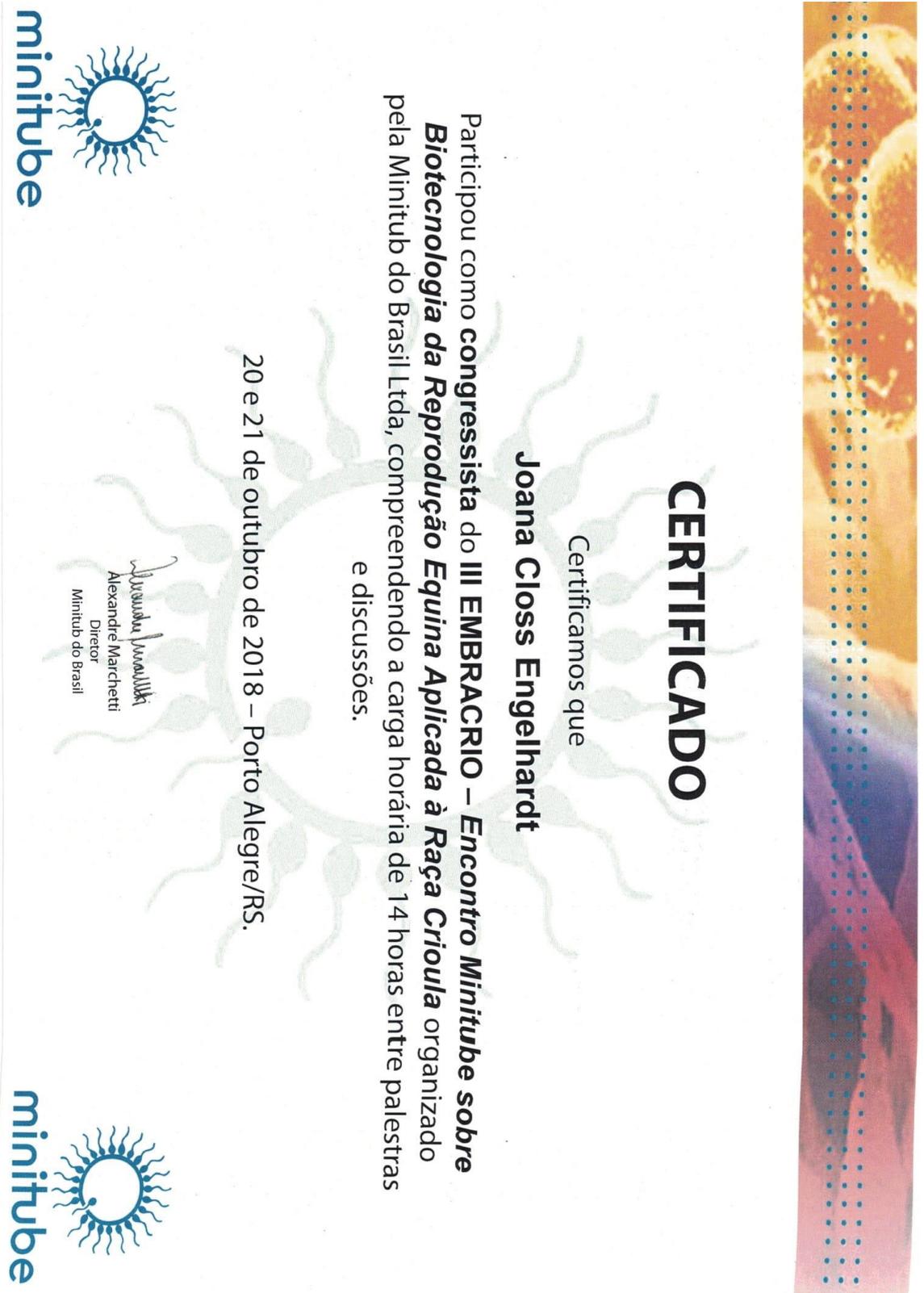


© 2012

Equine Reproduction Laboratory
Colorado State University



ANEXO B – Certificado de congressista no III Encontro Minitube sobre Biotecnologia da Reprodução Equina Aplicada à Raça Crioula.



ANEXO C – Certificado do Estágio Curricular em Medicina Veterinária

**CERTIFICADO**

Certifico que **JOANA CLOSS ENGELHARDI** realizou estágio curricular supervisionado nas dependências da CER – CENTRAL EQUINA DE REPRODUÇÃO Ltda. no período entre 27/07/2018 a 20/10/2018, totalizando a carga horária de 480 horas.


ARIEL CUNHASQUE BERTOLDI
MÉDICO VETERINÁRIO
CRMV/SP 27833
SUPERVISOR DE ESTÁGIOS - CER

BOITUVA/SP, 20 de Outubro de 2018