

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

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

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro

Antônio Carlos Gasparetto

Uruguaiiana, junho de 2016.

Antônio Carlos Gasparetto

**RELATÓRIO DE 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 obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Fabrício Desconsi Mozzaquatro,
Médico Veterinário, Msc, Dr.

**Uruguaiana
2016**

Antônio Carlos Gasparetto

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 obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Equina

Relatório apresentado e defendido em 28 de junho de 2016.

Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro
Orientador

Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Grad. Natan da Cruz de Carvalho
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico esta conquista aos meus pais, Abilio e Inês, por serem uma fonte inesgotável de apoio, suporte e paciência para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradecer a Deus, por sempre me dar forças, equilíbrio e coragem para continuar nesta jornada.

Aos meus pais, Abílio e Inês, que sempre me apoiaram e nunca interferiram na minha escolha profissional, sem vocês nada disso estaria acontecendo.

A minha irmã Cheila, pelas inúmeras vezes que me amparou em momentos delicados ao longo da graduação, com palavras de apoio e incentivo, fazendo com que esta caminhada chegasse ao seu final, com muita satisfação e alegria, te amo mana.

Ao Professor Orientador Fabrício, pelos ensinamentos em sala de aula e fora dela, pelas oportunidades oferecidas, sempre visando meu aperfeiçoamento profissional.

Ao meu Supervisor Francisco José Gonçalves de Oliveira, pela oportunidade de realizar meu estágio curricular na Central de Reprodução Equina Estábulo. Pelos vários ensinamentos profissionais e pessoais, adotando sempre uma conduta invejável que vou levar sempre comigo na rotina de meu trabalho.

À Médica Veterinária e amiga Carla Coelho, por sempre compartilhar comigo seus aprendizados na área da reprodução equina e me ofertar ao longo de toda a minha graduação espaço de estagiar ao seu lado.

Aos professores do curso, pela constante dedicação e trabalho para uma formação mais capacitada para enfrentar o mercado profissional.

Aos meus amigos que a veterinária me proporcionou, que sempre estiveram ao meu lado, independente da situação.

Aos meus eternos amigos e futuros colegas de profissão que partiram durante esta caminhada, com certeza estarão sempre me guiando e me protegendo.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira cruzaram pelo meu caminho, que me ajudaram de alguma forma ter chegado até aqui.

Obrigado de coração a todos!

O cavalo é a mais bela criatura. O melhor mistério é criá-lo, a melhor ocupação é tratá-lo e o melhor prazer é montá-lo.

Paula Nascimento

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA

O presente relatório descreve as principais atividades acompanhadas e desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV). O objetivo do ECSMV, além do grande interesse pessoal em trabalhar na área, foi de vivenciar e acompanhar a rotina das principais biotécnicas da reprodução equina, abrangendo atividades de manejo reprodutivo, controle folicular, coleta e processamento de sêmen, exames ultrassonográficos diversos e transferência de embriões. Como local de estágio optou-se pela Central de Reprodução Equina Estábulo, localizada na cidade de Sobradinho – DF, sob orientação do professor Doutor Fabrício Desconsi Mozzaquatro e supervisão do Médico Veterinário Francisco José Gonçalves de Oliveira. O estágio foi realizado entre os dias 01 de fevereiro e 27 de abril de 2016, perfazendo um total de 560 horas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Imagem ultrassonográfica (A) característica de edema uterino grau dois na fase de estro, (B) folículo dominante ≥ 25 mm, (C) maior homogeneidade uterina no diestro, (D) presença de um CL característico na fase de diestro ou gestacional.....	16
Figura 2:	Imagem ultrassonográfica de um folículo pré-ovulatório, notar seu formato irregular e as células da Teca.....	18
Figura 3:	Imagem ecográfica de um Corpo lúteo (seta branca) e sua delimitação (setas pretas).....	19
Figura 4:	Esquema mostrando a trajetória da pipeta de inseminação artificial no método intra-cornual.....	20
Figura 5:	Imagem fotográfica da vulva e anus com posicionamento normal, boa coaptação das bordas e sem presença de secreção.....	21
Figura 6:	Imagem didática da palpação retal ilustrando corpo, cornos uterino e os ovários.....	22
Figura 7:	Esquema de coleta de embrião equino não cirúrgico pelo sistema de método fechado.....	24
Figura 8:	Imagem da Placa de Petri descartável com as gotas de meio de cultivo celular e a presença da vesícula embrionária em seu interior.....	25
Figura 9:	Imagem fotográfica da pipeta de inseminação pronta para inovulação do embrião.....	26
Figura 10:	Imagem ultrassonográfica da vesícula embrionária aos 14 dias de gestação realizada durante o ECSMV.....	27
Figura 11:	Imagem ilustrativa da migração do embrião equino no interior da vesícula embrionária. Aos 25 dias, é possível visualizar o alantóide. Aos 30 dias, o saco vitelínico começa a regredir e o alantóide aumenta em tamanho. Aos 40 dias, o saco vitelínico se encontra bastante diminuído e o saco alantoidiano empurra o embrião para a superfície dorsal da vesícula e aos 50 dias o cordão umbilical se encontra formado e o embrião desce novamente na região ventral da vesícula.....	29
Figura 12:	Imagem ultrassonográfica da gônada masculina de um feto de 141 de gestação.....	30
Figura 13:	Imagem ultrassonográfica da gônada feminina de um feto de 140 de gestação.....	31

Figura 14:	Imagem fotográfica da Vagina Artificial pronta para a colheita de sêmen durante o ECSMV.....	32
Figura 15:	Imagem fotográfica do momento da colheita de sêmen realizadas durante o ECSMV.....	32
Figura 16:	Imagem ultrassonográfica da glândula mamária de um feto de 130 dias de gestação observado durante o ECSMV.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas na Central de Reprodução Equina Estábulo, durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	15
Tabela 2:	Inseminações Artificiais desenvolvidas durante o ECSMV.....	17
Tabela 3:	Percentual de embriões e taxa de prenhez referente as coletas e transferência de embriões realizadas durante o ECSMV.....	23
Tabela 4:	Classificação quanto ao grau de qualidade do embrião utilizado durante o ECSMV.....	26
Tabela 5:	Característica do desenvolvimento anatômico fetal.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE	Anemia Infecciosa Equina
Bi	Blastocisto Inicial
Bx	Blastocisto Expandido
CL	Corpo Lúteo
E2	Estrogênios
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
CREE	Central de Reprodução Equina Estábulo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IA	Inseminação Artificial
IM	Intramuscular
LH	Hormônio Luteinizante
mm	Milímetros
P4	Progesterona
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
TE	Transferência de Embrião
TPC	Tempo de Preenchimento Capilar
UI	Unidades Internacionais
VA	Vagina Artificial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	ATIVIDADES ACOMPANHADAS/DESENVOLVIDAS	14
2.1	Ultrassonografia de acompanhamento/Dinâmica folicular.....	15
2.1.1	Hormonioterapia aplicada nas induções de ovulação	16
2.2	Inseminação artificial.....	17
2.4	Manejo das éguas doadora e receptora de embrião	20
2.5	Transferência de embrião (TE)	22
2.6	Diagnóstico de gestação.....	27
2.7	Sexagem fetal.....	29
2.8	Colheita de sêmen.....	31
2.9	Congelamento de sêmen	33
3	DISCUSSÃO	35
3.1	Ultrassonografia de acompanhamento/Controle folicular	35
3.2	Transferência de embriões	36
3.3	Sexagem fetal, Diagnóstico de gestação e Gestação gemelar.....	37
3.3.1	Sexagem fetal	37
3.3.2	Diagnóstico de gestação	39
3.3.3	Gestação gemelar	41
3.4	Inseminação artificial com sêmen refrigerado e congelado.....	42
3.4.1	Inseminação artificial com sêmen refrigerado	42
3.4.2	Inseminação artificial com sêmen congelado.....	43
4	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	ANEXO A – Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária ..	50
	ANEXO B – Modelo da ficha de identificação e de acompanhamento das atividades realizadas, utilizada no ECSMV na Central de Reprodução Equina Estábulo.	51

1 – INTRODUÇÃO

A equideocultura é um importante ramo da agropecuária no Brasil, destacando-se pelo aumento no número de animais quanto aos negócios realizados. O setor envolve mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final que compõe a base do chamado Complexo do Agronegócio do Cavalo, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos.

Na área da reprodução equina há uma busca incansável para maximizar resultados (Lima 2006). Neste contexto, a transferência de embriões (TE) tem um papel fundamental, pois possibilita aos criadores de cavalos a obtenção de vários descendentes da mesma matriz em uma única temporada.

A escolha do local para a realização do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi motivada pela alta demanda na área da reprodução equina nos últimos anos e pelo interesse pessoal na área, além do período mais prolongado da temporada reprodutiva quando comparado ao período reprodutivo que acontece aqui no sul do país. Somados a isso, a oportunidade de vivenciar a rotina de uma Central de Reprodução, acompanhar profissionais diariamente focados na área de interesse, trabalho em equipe e o conhecimento das funções básicas de uma empresa que trata da prestação de serviço a campo como um negócio que pode se transformar em uma empresa de grande retorno financeiro

Assim, o objetivo deste relatório é apresentar as principais atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) na Central de Reprodução Equina Estábulo e o aprimoramento dos conhecimentos adquiridos ao longo da graduação.

2- ATIVIDADES ACOMPANHADAS/DESENVOLVIDAS

O estágio curricular para graduação no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Pampa foi realizado no período de 01 de fevereiro a 27 de abril de 2016, na Central de Reprodução Equina Estábulo (CREE), localizada na Rodovia DF 205, km 24 Fazenda Sete Lagoas, Fercal-Sobradinho/DF, sob supervisão do Médico Veterinário Francisco José Gonçalves de Oliveira e orientação do Professor Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro, totalizando 560 horas.

A equipe de Médicos Veterinários da empresa é composta pelo Coordenador geral Médico Veterinário Msc. Francisco José Gonçalves de Oliveira, Graduado pela Universidade de Brasília (UnB), Mestre em Reprodução Animal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Alan Nicolletti Duarte, Médico Veterinário, Graduado pela Universidade Federal do Pampa (Unipampa) – Campus Uruguaiana RS, e Médica Veterinária Mariane Leão, Graduada pela Universidade de Brasília (UnB), Mestre e Doutoranda em Ciências Animais na UnB.

A equipe presta assistência reprodutiva a mais de 40 Haras localizados no Distrito Federal e no Estado de Goiás, oferecendo serviços como inseminação artificial com sêmen fresco e congelado, coleta de sêmen, congelamento de sêmen, transferência de embriões e acompanhamento ultrassonográfico de dinâmica folicular e diagnóstico de gestação.

Durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), realizado na Central de Reprodução Equina Estábulo, foram acompanhadas e desenvolvidas as seguintes atividades na área de atuação do médico veterinário, conforme demonstrado na TABELA 1.

TABELA 1-Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas na Central de Reprodução Equina Estábulo, durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Atividades	Número	%
US de Acompanhamento/Dinâmica folicular	642	70,6
Diagnóstico de Gestação aos 14 dias	83	9,1
Sexagem Fetal por Gônada (aos 120 dias)	32	3,5
Manejo com égua Doadora/Receptora	8	0,88
Lavagem Uterina pós IA (congelado)	9	1
Redução manual embrionária (gestação gemelar)	2	0,22
Colheita de Sêmen	22	2,6
Monta Dirigida	9	1
Inseminação Artificial	67	7,3
Transferência de Embrião	26	2,9
Congelamento de Sêmen (caixa)	8	0,88
Total	908	100,0

2.1 Ultrassonografia de acompanhamento/Dinâmica folicular

A ultrassonografia de acompanhamento é uma técnica exploratória não invasiva que avalia aspectos como tamanho, forma, localização e consistência dos órgãos reprodutivos da égua. Permite identificar o momento ideal para realização do procedimento da Inseminação Artificial (IA).

Durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foram realizados 642 exames de acompanhamento ultrassonográfico. Os exames eram realizados em atendimentos externos nas propriedades e nos animais hospedados na Central.

Os procedimentos eram anotados em fichas de exames (ANEXO B), onde cada propriedade possuía a sua ficha, na qual continha os seguintes dados: data do exame, cliente, nome do animal, tônus uterino (variação de 1 a 4 onde 1 extremamente flácido, 2 flácido, 3 túrgico e 4 extremamente túrgico), edema uterino (0 a 3, onde 0 era um útero sem edema, 0,5 pouco edema, 1,5 razoável e acima de 2 era o que se esperava em uma égua ciclando bem), presença e mensuração dos dois maiores folículos encontrados nos ovários (formato,

flutuação), presença de CL (homogêneos e hipoecóicos), homogeneidade uterina (miométrio e endométrio), presença ou não da linha de colabamento (0 a 1 onde 0 não estava presente, 0,5 pouco visível e 1 linha bem evidente caracterizando um útero firme e contraído), realização de tratamento hormonal e data de retorno.

Algumas características importantes entre o estro e o diestro estarão representadas a seguir (FIGURA 1).

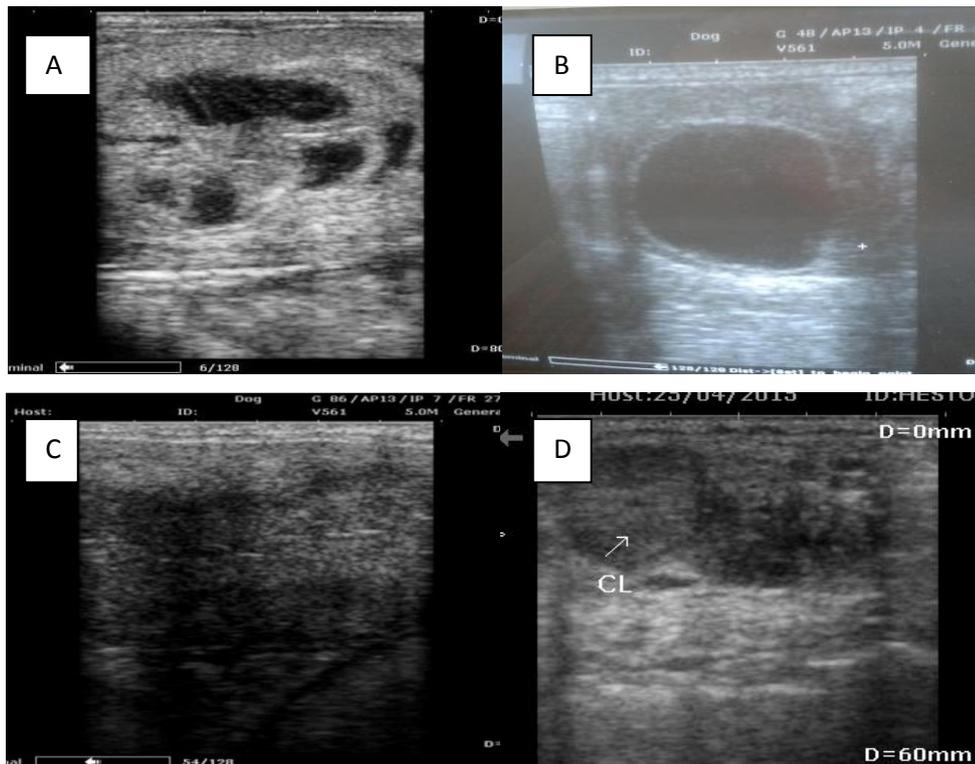


FIGURA 1- Imagem ultrassonográfica (A) característica de edema uterino grau dois na fase de estro, (B) folículo dominante ≥ 25 mm, (C) maior homogeneidade uterina no diestro, (D) presença de um CL característico na fase de diestro ou gestacional. Fonte: Arquivo pessoal.

2.1.1 Hormonioterapia aplicada nas induções de ovulação

Após o controle folicular das éguas efetuados no EC SMV, era realizada a indução da ovulação. Para iniciar este processo, era preciso que ao realizar o exame ultrassonográfico, se detectasse um folículo pré-ovulatório maior ou igual que 35 mm de diâmetro, ausência de CL funcional e presença de edema uterino grau dois.

Para a indução da ovulação era utilizado Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) (Chorulon®) na dose de 1500 UI endovenosa, (que atua como LH nas células da Teca do

folículo pré-ovulatório, promovendo a maturação e a ovulação entre 12 e 48 horas após a aplicação). Outro fármaco também utilizado foi a Deslorelina (Sincrorelina®, Ouro Fino), um análogo sintético do GnRH, utilizado na dose de 1 ml IM. Em média, as ovulações ocorriam entre 36 a 48 horas após a sua aplicação. Esta por sua vez era usada em todas as éguas durante o período de temporada reprodutiva acompanhada.

2.2 Inseminação artificial

Durante o ECSMV foram realizadas 67 Inseminações Artificiais, 40 delas com sêmen congelado e 27 com sêmen refrigerado, conforme na TABELA 2.

TABELA 2-Inseminações Artificiais desenvolvidas durante o ECSMV.

Inseminações	Quantidade de IA	% de prenhez	Nº de éguas prenhe
Sêmen congelado	40	70	28
Sêmen refrigerado	27	85	23
Total	67	76	51

As inseminações com sêmen refrigerado eram realizadas 24 horas após a indução da ovulação, aumentando assim o número de espermatozoides viáveis no trato reprodutivo da fêmea à espera do ovócito.

Nas inseminações com sêmen congelado, o controle folicular era mais rigoroso, sendo que passadas 24 horas da indução da ovulação a égua era acompanhada a cada seis horas através de exame ultrassonográfico e palpação retal. Na palpação retal, quando detectado alterações de sensibilidade (a égua responde ficando inquieta à manipulação no ovário), flutuação aumentada somadas as características do exame ultrassonográfico, como diminuição do edema uterino, células da Granulosa hipercólicas e formato irregular do folículo pré-

ovulatório, o exame de acompanhamento passava a ser de quatro em quatro horas (FIGURA 2).

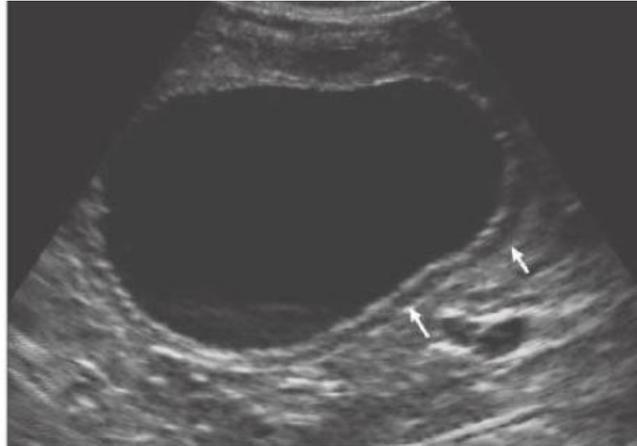


FIGURA 2: Imagem ultrassonográfica de um folículo pré-ovulatório, notar seu formato irregular e as células da Teca (setas brancas). Fonte: Arquivo Pessoal.

Durante o ECSMV se preconizava que o procedimento de IA fosse realizado momentos antes da ovulação quando possível. A égua retornava para o exame 3 horas depois de realizado o procedimento, para confirmar se ocorreu a ovulação, caso não tivesse ovulado, o procedimento de IA era repetido após detectar a ovulação.

A ovulação é detectada quando há formação de uma massa isoecoica (Corpo Lúteo) no lugar do folículo pré-ovulatório (FIGURA 3).

Para qualquer procedimento de IA, era realizada a higienização do períneo da égua com água corrente, sabão neutro, secagem com papel toalha e antissepsia com álcool 70%. A cauda era enfaixada e suspensa para a lateral.

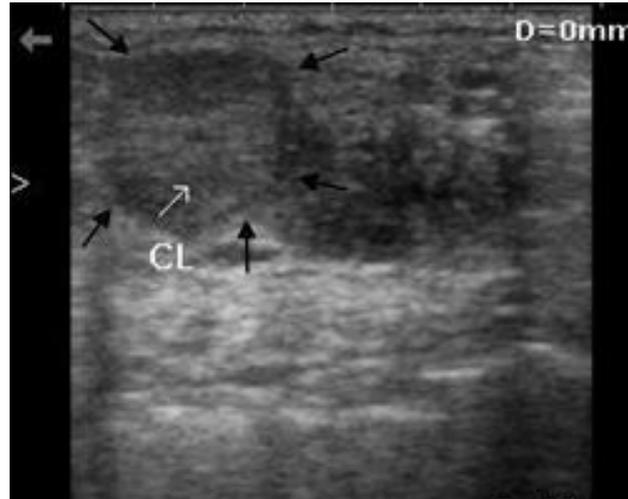


FIGURA 3: Imagem ultrassonográfica de um Corpo Lúteo (seta branca) e sua delimitação (setas pretas).
Fonte: Arquivo Pessoal.

A técnica utilizada para ambos os processos de IA, era a técnica Intra-cornual (FIGURA 4), que consiste em direcionar a pipeta flexível de inseminação (Minetub, Alemanha), pelo corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, depositando o sêmen o mais próximo possível do final do corno uterino, próximo a papila (orifício que dá acesso a trompa uterina). Após depositar o sêmen no lugar pretendido, era rotina do veterinário confirmar com o exame ultrassonográfico o acúmulo de líquido na ponta do corno.

Nas IA com sêmen congelado, o processo de descongelamento do sêmen era realizado em banho-maria a uma temperatura de 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento, o sêmen era avaliado e seus parâmetros anotados na ficha de acompanhamento da égua. A concentração mínima por procedimento era de 150 milhões de espermatozóides viáveis, 30% de motilidade progressiva e vigor 2.

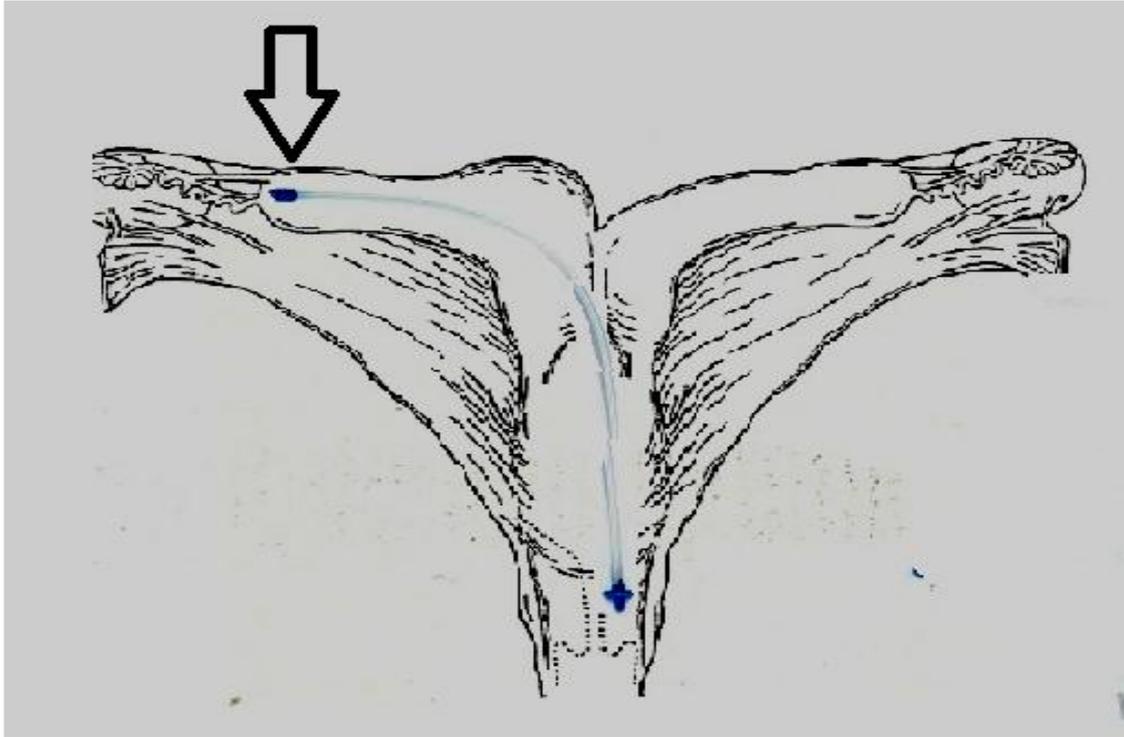


FIGURA 4- Esquema mostrando a trajetória da pipeta de inseminação artificial no método intra-cornal. Fonte: adaptado de Samper, (2007).

2.4 Manejo das éguas doadora e receptora de embrião

Durante o ECSMV os cuidados com as doadoras e receptoras eram efetuados em duas etapas. Primeiramente eram coletadas amostras de sangue para a realização de exames laboratoriais de Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo. No segundo momento, era realizado o exame clínico do animal, onde se observava os seguintes parâmetros: escore corporal, frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração das mucosas, avaliação geral da dentição e presença de ectoparasitas.

Sempre se buscava orientar os proprietários a escolherem éguas receptoras com boa habilidade materna, temperamento dócil, altura mínima de 1,40 m (cernelha), escore corporal 3 na escala de 1-5, livres de doenças infectocontagiosas e com bom histórico reprodutivo.

No exame ginecológico externo da égua receptora, eram avaliados os seguintes parâmetros: Integridade da glândula mamária, realizada a palpação local do úbere e dos tetos, verificando sua consistência e alguma deformidade. Também era avaliada a conformação vulvar, seu posicionamento, coaptação das bordas e presença de secreção (FIGURA 5).



FIGURA 5: Imagem fotográfica da vulva e anus com posicionamento normal, boa coaptação das bordas e sem presença de secreção. Fonte: Arquivo Pessoal.

O exame interno era iniciado com a limpeza do reto, palpação minuciosa do colo, corpo e cornos uterinos e dos ovários (FIGURA 6). O exame ultrassonográfico sempre era realizado de maneira complementar, na qual possibilitava ter uma visão interna de tamanho, forma, localização e consistência de todo aparelho reprodutor.

Após, era realizado o exame interno do aparelho reprodutor da égua, com o auxílio do espéculo vaginal. Era realizada a higienização da região vulvar e com detergente neutro e água corrente, secagem da região perineal com papel toalha e a desinfecção com álcool 70%. Uma lanterna era utilizada para avaliar a coloração da mucosa vaginal, hímen persistentes, vaginites, grau de umidade da mucosa, abertura do canal cervical e a presença de líquido.

Por último, era realizada a palpação interna da vagina, com o principal objetivo de avaliar a integridade do canal cervical, buscando alterações como tortuosidade na cérvix e fibrose da musculatura cervical.

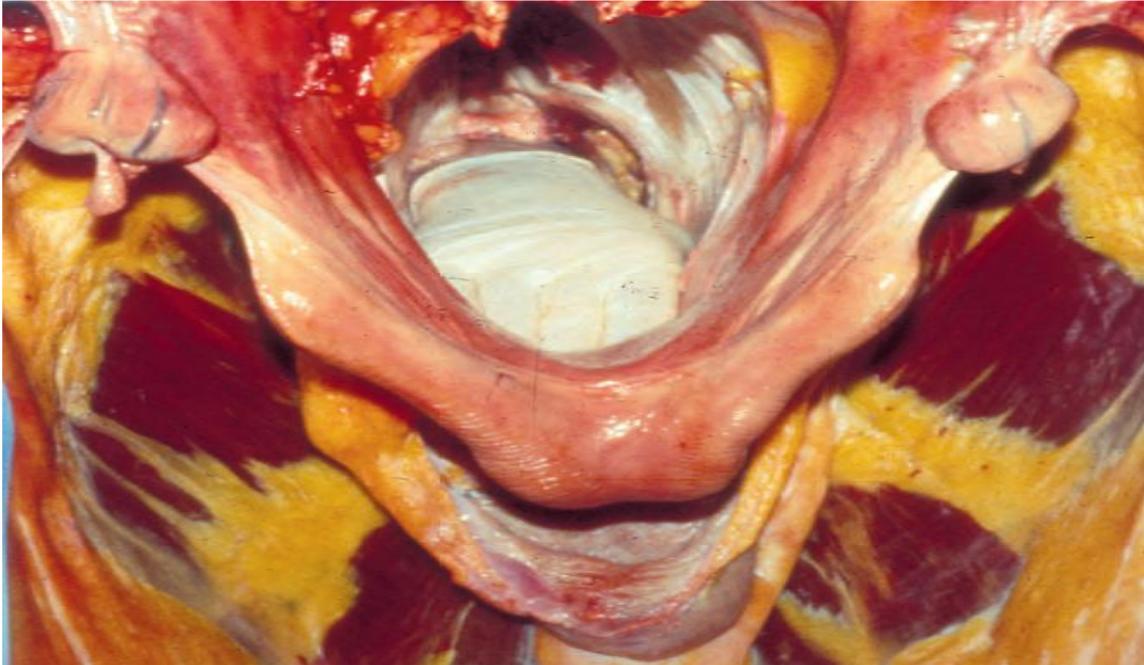


FIGURA 6: Imagem didática da palpação retal ilustrando corpo, cornos uterino e os ovários. Fonte: Mckinnon A. C, et al., and Equine Reproduction.

A Central de Reprodução Equina Estábulo tem um calendário de vacinações para as principais doenças infectocontagiosas: Raiva, Rinopneumonite Equina (Vírus 1 e 4), Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Tétano e Influenza Equina.

- Raiva (RaivacelMulti®, Vallée) é aplicada duas doses com intervalo de 30 dias, as duas de 2 ml/IM profunda, após isso vacinação anual.

- Rinopneumonite (1 e 4), (Herpeshorse®, Vencofarma) é administrada no 5º, 7º e 9º mês de gestação.

- Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Influenza equina e Tétano (Tri-equi®, HertapeCalier) é realizada anualmente no mês de agosto.

2.5 Transferência de embrião (TE)

As transferências de embriões realizadas durante o ECSMV na central e nos haras atendidos seguem o protocolo de coleta do embrião ao oitavo dia pós-ovulação (D8) da égua doadora, e inovulado em seguida na égua receptora. Durante o período de estágio (TABELA

3), foram realizados 26 TE, com uma taxa de prenhez de 35% (9/26), obtendo apenas 9 produtos confirmados até ao diagnóstico de gestação aos 50 dias.

TABELA 3-Percentual de embriões e taxa de prenhez referente as coletas e transferência de embriões realizadas durante o ECSMV.

Éguas coletadas	Embriões recuperados	% da taxa de recuperação	% da TE	Total de produtos
40	26	65	35	9

Antes de iniciar o procedimento de coleta do embrião, era realizado o exame ultrassonográfico nas receptoras, observando parâmetros essenciais para o sucesso da TE, tais como presença de CL, tônus uterino, edema uterino, homogeneidade uterina e presença ou não da linha de colabamento. Estas informações eram passadas para as fichas de acompanhamento dos animais.

Após coletadas as informações das receptoras, os equipamentos de laboratório, material de coleta e de inovulação eram devidamente organizados, sendo que, todos os materiais utilizados eram esterilizados para prevenir contaminações via ascendentes para doadora e receptora assim como para o embrião coletado.

O procedimento de colheita do embrião tinha início com a limpeza do reto, a cauda era enfaixada e presa ou apenas levantada pelo ajudante, a região perineal higienizada com detergente neutro e água corrente, secada com papel toalha e a antisepsia realizada com álcool 70%.

Logo após a higienização, era aplicado 2 ml endovenosa de Ocitocina. O procedimento de lavagem uterina iniciava quando o veterinário introduzia a mão enluvada, devidamente lubrificada com gel estéril, segurando o cateter de silicone (BivonaMinitube, Alemanha) na vulva. Com a ajuda do dedo indicador, o cateter passava o colo cervical, sendo posicionado no corpo do útero, onde era inflado um balão com 40 ml de ar, fixando assim o cateter no corpo do útero.

Para as lavagens uterinas era utilizado o meio de Ringer com Lactato. O aquecimento do mesmo só era realizado quando a temperatura ambiente estivesse abaixo dos 18°C, nesses casos se elevava a temperatura da solução para os 35°C.

A colheita do embrião era realizada pelo método fechado (FIGURA 7). Este método evita com que o líquido coletado entre em contato com contaminantes presentes no meio ambiente. A infusão de 1 litro de Ringer Lactato geralmente era suficiente para cada lavado, preenchendo o útero e os cornos uterinos.



FIGURA 7- Esquema de coleta de embrião equino pelo método não cirúrgico e sistema fechado. Fonte: Arquivo pessoal.

Se o embrião não fosse visualizado no primeiro lavado, o procedimento de lavagem seguia por no máximo quatro lavados. Quando o embrião era visualizado no copo coletor, o processo era finalizado. Se o embrião não fosse visualizado no copo coletor após os quatro lavados, ele era rastreado em uma Placa de Petri na Lupa.

O conteúdo do copo coletor era derramado para uma Placa de Petri previamente riscada para facilitar o rastreamento do embrião com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica, em um aumento de 10X. Quando encontrado, o embrião era recuperado através de uma palheta de sêmen de 0,5 ml acoplada em uma seringa de insulina e transferido para outra Placa de Petri para a realização das lavagens e sua classificação.

O embrião era lavado em dez gotas de meio de cultivo celular (Holding Plus, Vitrocel Embriolife) (FIGURA 8). A cada três gotas, o material de captura do embrião era trocado e um novo material esterilizado apanhado para prosseguir a lavagem.

Após a lavagem e classificação embrionária (TABELA 4), o embrião era coletado em uma pipeta de inseminação na ordem meio/ar/meio/embrião/ar/meio (FIGURA 9). No momento da inovulação, o uso de camisa sanitária na pipeta era imprescindível. Tal procedimento era utilizado para diminuir a possibilidade de contaminação uterina garantindo boas taxas de prenhez.

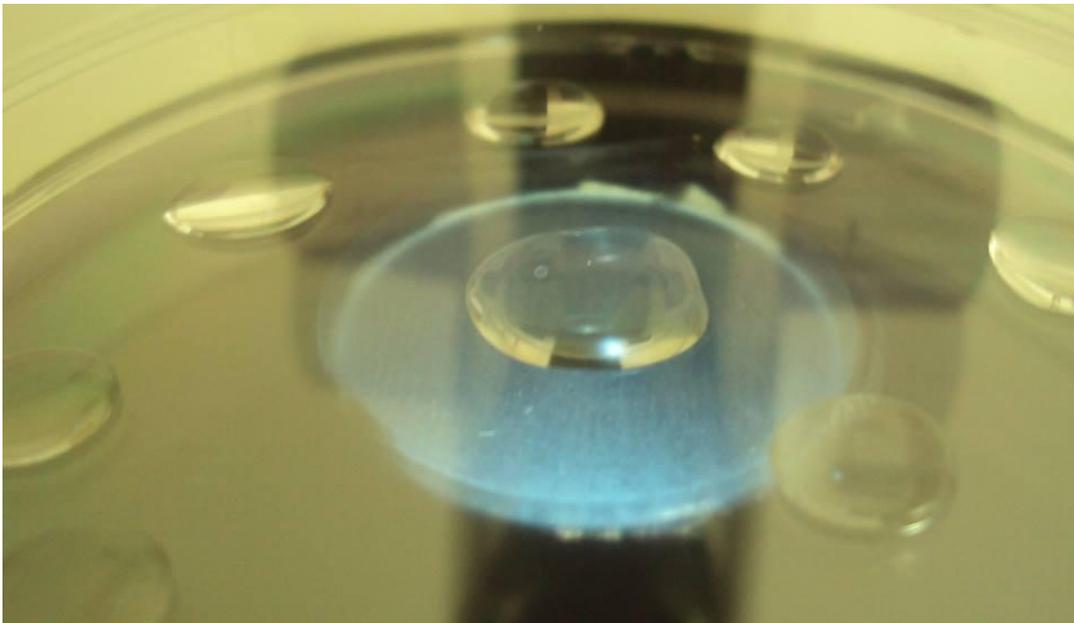


FIGURA 8- Imagem da Placa de Petri descartável com as gotas de meio de cultivo celular e a presença da vesícula embrionária em seu interior. Fonte: Arquivo pessoal.



FIGURA 9- Imagem fotográfica da pipeta de inseminação pronta para inovulação do embrião. Fonte: Arquivo pessoal.

O procedimento de higienização realizado na receptora era idêntico ao realizado na doadora, efetuava-se, porém a aplicação de 10 ml endovenosa de flunixin meglumine instantes antes da inovulação na égua receptora. O processo de inovulação iniciava-se com a introdução da mão intravaginal, transpassava-se a pipeta de inseminação pelo colo cervical, momento em que se rompia a camisa sanitária, e depositava-se o embrião na base do corno uterino ipsilateral ao CL ou no corpo do útero.

TABELA 4- Classificação quanto ao grau de qualidade do embrião utilizado durante o ECSMV.

Escala	Comentário	Qualidade Embrionária
1	Excelente	Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação
2	Bom	Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula.
3	Ruim	Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial de blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou capsula.
4	Degenerado ou Morto	Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blâstomeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião
UFO	UFO	Ovócito não fertilizado

Fonte: McCue (2011).

2.6 Diagnóstico de gestação

Durante o ECSMV o diagnóstico de gestação era realizado aos 12 dias pós ovulação (FIGURA 10) e nos casos de TE eram realizados 5 dias após a inovulação na égua receptora. Este método de diagnóstico precoce traz como principais vantagens a prevenção da fixação de gestação gemelar, e nos casos de diagnóstico negativo, a égua encontra-se em tempo hábil para uma nova tentativa para ficar gestante, o mais rápido possível.



FIGURA 10: Imagem ultrassonográfica da vesícula embrionária aos 14 dias de gestação realizada durante o ECSMV. Fonte: Arquivo pessoal.

Primeiramente na palpação retal, buscava-se um útero rígido, firme, cilíndrico e o colo do útero fechado. Depois de realizada a palpação, fazia-se o uso do ultrassom para dar continuidade e confirmação ao diagnóstico de gestação. O exame ultrassonográfico, tinha como objetivo primordial encontrar uma vesícula embrionária com tamanho entre 14 e 18 mm de diâmetro, realizando uma varredura em ambos os cornos uterinos e pelo corpo do útero, se fosse preciso mais de uma vez até a visualização da vesícula.

Após a visualização da vesícula embrionária, é de suma importância a detecção do CL no respectivo ovário ovulado para levar a gestação a termo. Todas essas informações eram passadas para a ficha de acompanhamento para um maior controle da idade gestacional.

As éguas eram re-examinadas aos 25 dias de gestação, onde era possível detectar o formato irregular da vesícula embrionária. Nesta fase o embrião pode ser localizado em diferentes posições no interior da vesícula. Neste período, o diagnóstico busca por base detectar os batimentos cardíacos do embrião e o corpo lúteo gravídico.

Por volta dos 30 dias, o embrião se encontra no centro da vesícula embrionária. Em D40, o concepto alcança a porção dorsal da vesícula e passa a ser chamado de feto, em seguida, inicia seu processo de descida em direção à porção ventral da vesícula, que é concluída próximo ao D50 de gestação. Neste momento, o feto está totalmente envolto pelo alantóide e suspenso pelo cordão umbilical, podendo ser visualizado os membros, cabeça, globo ocular, caixa craniana, mobilidade fetal e também avaliação morfológica do feto em busca de deformidades.

Para fazer o diagnóstico de gestação sem o uso do ultrassom, era possível apenas por volta dos trinta dias, onde se observava um útero túrgido, presença de um abaulamento (inicialmente do tamanho de uma *bola de pingue-pongue*) onde o concepto inicia seu desenvolvimento.

Nos ovários é importante detectar a presença do CL gravídico e corpos lúteos acessórios, devido a ação do eCG.

Abaixo (FIGURA 11) algumas destas características visualizadas em seus respectivos períodos de gestação.

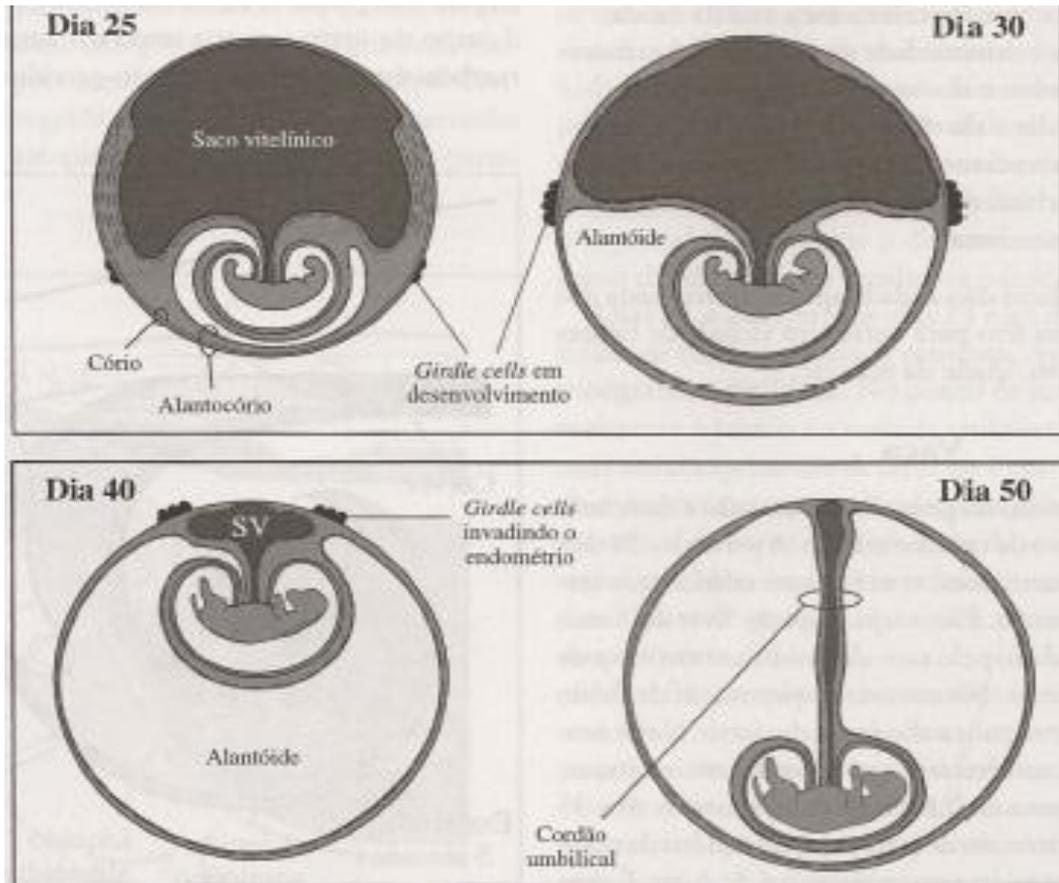


FIGURA 11: Imagem ilustrativa da migração do embrião equino no interior da vesícula embrionária. Aos 25 dias, é possível visualizar o alantóide. Aos 30 dias, o saco vitelínico começa a regredir e o alantóide aumenta em tamanho. Aos 40 dias, o saco vitelínico se encontra bastante diminuído e o saco alantoidiano empurra o embrião para a superfície dorsal da vesícula e aos 50 dias o cordão umbilical se encontra formado e o embrião desce novamente na região ventral da vesícula. Fonte: Landim – Alvarenga, 2006, Obstetrícia Veterinária.

2.7 Sexagem fetal

O procedimento de sexagem fetal consiste em, através da utilização da ultrassonografia, detectar a presença de estruturas anatômicas que identifiquem o sexo do feto.

Este procedimento era realizado com os animais da própria central e ou a pedido dos proprietários atendidos em seus haras.

Durante o ECSMV foram realizados 32 procedimentos de sexagem fetal a partir da visualização das gônadas fetais e genitália externa. Este procedimento era realizado entre os dias 90 a 150 de gestação, (120 dias o ideal) devido ao feto estar bem acessível e a genitália estar bem desenvolvida.

A gônada masculina é oval, medindo de 2 a 7 cm de diâmetro, sendo sua camada medular homogênea. Apresenta uma fina linha ecogênica (mediastino central) longitudinalmente em relação a camada medular (FIGURA 12).

A gônada feminina tem o mesmo formato e tamanho, mas apresenta uma estrutura circular ecogênica rodeada por uma linha circular hipocogênica, conforme abaixo (FIGURA 13).

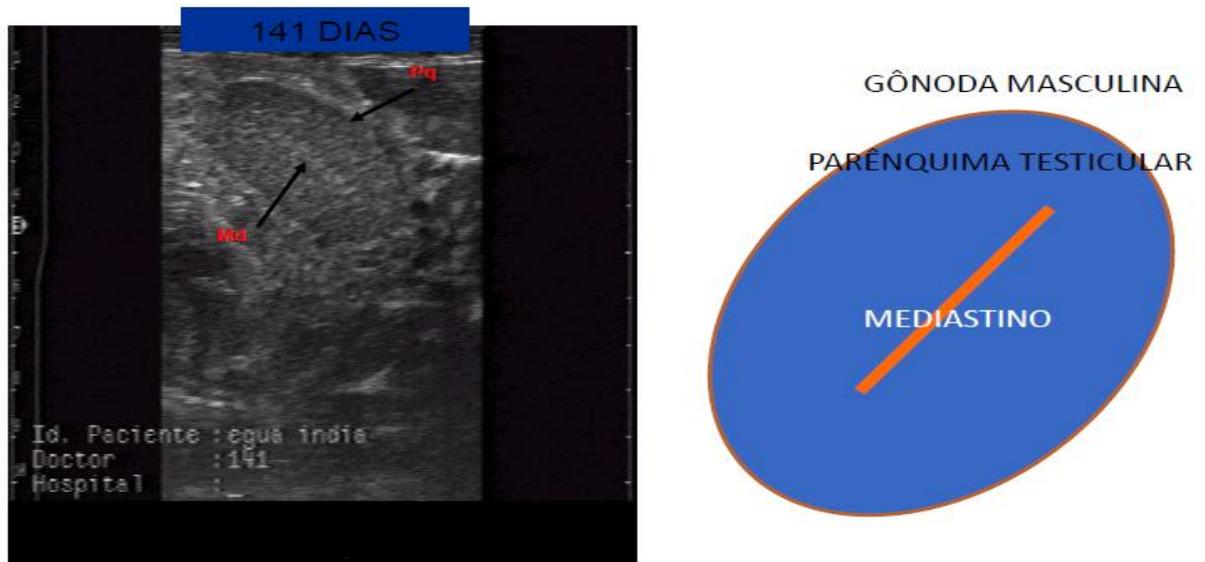


FIGURA 12: Imagem ultrassonográfica da gônada masculina de um feto de 141 de gestação. Fonte: Arquivo pessoal.

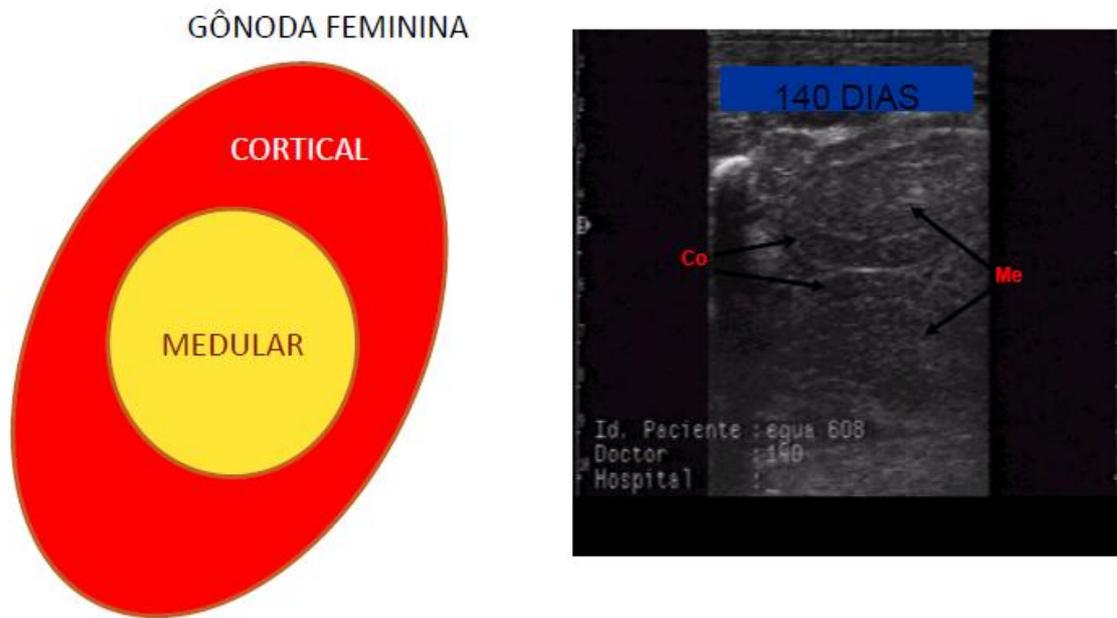


FIGURA 13: Imagem ultrassonográfica da gônada feminina de um feto de 140 dias de gestação. Fonte: Arquivo pessoal.

2.8 Colheita de sêmen

Durante as atividades desenvolvidas no ECSMV, foram realizadas 22 colheitas de sêmen, destas, 8 foram submetidas ao processo de congelamento, 11 para inseminação artificial com sêmen fresco e 3 apenas para o treinamento e aperfeiçoamento da técnica.

A colheita era realizada com o uso da Vagina Artificial do modelo Botucatu (FIGURA 14), sendo seu interior aquecido a uma temperatura de 44°C, para isso era colocada a água previamente aquecida à uma temperatura de 49°C. A pressão interna da VA era regulada colocando ar após a água. Seu interior era revestido com uma mucosa plástica esterilizada, que era trocada a cada colheita, alcançando uma ótima função sanitária.



FIGURA 14: imagem fotográfica da Vagina Artificial pronta para a colheita de sêmen durante o ECSMV. Fonte: Arquivo pessoal.

Na região oposta da entrada do pênis, era conectado a um copo coletor que em seu interior continha um filtro, com a finalidade de separar a fração gel do restante do ejaculado.

As colheitas foram todas realizadas com éguas em cio, devidamente contida para não oferecer riscos ao garanhão e à equipe (FIGURA 15).

Após a VA estar pronta, o procedimento tinha início, com a aproximação do garanhão até a exposição do pênis, se este se apresentava muito sujo (esmegma e restos celulares), se afastava o garanhão e o pênis era lavado com água corrente e secado com papel toalha. Se não fosse preciso a lavagem, o procedimento seguia com a monta do garanhão. O pênis era desviado para a VA e a colheita realizada.



FIGURA 15: Imagem fotográfica do momento da colheita de sêmen realizada durante o ECSMV. Fonte: Arquivo pessoal.

Depois da colheita, o sêmen era levado para o laboratório para as etapas de avaliações. O primeiro passo, era a retirada do filtro com a porção gel e seu descarte efetuado. Após, uma gota de sêmen com 20 μL , era colocada sobre uma lâmina e coberta por uma lamínula, ambas pré-aquecidas a 37°C, para a avaliação da motilidade, motilidade progressiva e vigor da amostra, com o uso de microscópio (200X).

A motilidade era realizada a partir da média de no mínimo três campos da lâmina, sendo essa uma avaliação subjetiva da percentagem de células móveis presentes, a motilidade progressiva era realizada com a visualização da percentagem das células com movimento progressivo dentre as móveis.

O vigor é realizado em uma escala de 1 a 5, onde 1 é o vigor mínimo (indesejado) e 5 é o vigor máximo (desejado), é a velocidade na qual as células vivas se deslocam entre o campo avaliado.

A concentração espermática era realizada com diluição de 1/20 (20 μL de sêmen e 380 μL de formol-salina) em Câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio (400X). Em seguida era realizada a diluição da amostra com BotuSêmen (Botupharma).

2.9 Congelamento de sêmen

Após a colheita do sêmen, é importante a visualização prévia da amostra, ao passo que congelar e descongelar o sêmen equino reduz a viabilidade porque induz à reação precoce do acrossoma dos espermatozóides. O sêmen de baixa motilidade e vigor (30% de motilidade e vigor 2) não era criopreservado, uma vez que o custo do procedimento é alto resultando em poucas palhetas, poucas inseminações e também pelo fracasso da técnica quando fosse efetuar o descongelamento do mesmo.

O procedimento de congelamento do sêmen equino na central, iniciava com a separação do volume de sêmen em tubos Falcon de 50 ml cada, em seguida era realizada a centrifugação a 600 $\times g$ /10 minutos, previamente diluído com (Botucurio, Botupharma). Após a centrifugação, retirava-se o sobrenadante, e verificava a concentração espermática em Câmara de Neubauer.

Em seguida, o volume era ajustado para 300 $\times 10^6$ /ml, para que assim, cada palheta de sêmen de 0,5 ml contivesse 150 milhões de espermatozóides viáveis.

Dando continuidade ao processo de congelamento, era realizada a refrigeração lenta das palhetas, passando-as da temperatura ambiente para 5°C, processo que era realizado em uma geladeira previamente ajustada a 5°C onde as palhetas ficam por 20 minutos, este procedimento é chamado de curva positiva de congelamento.

Após esta curva positiva, as palhetas foram colocadas em uma caixa de isopor contendo cerca de 5 litros de Nitrogênio líquido, expostas em uma altura de 6 cm acima do Nitrogênio, para que a temperatura passasse de 5°C para -140°C, este procedimento leva 20 minutos e é chamado de curva negativa de congelamento.

Depois desta curva negativa, as palhetas eram imediatamente submersas no Nitrogênio líquido para a sua temperatura cair rapidamente para -196°C.

3- DISCUSSÃO

3.1 Ultrassonografia de acompanhamento/Controle folicular

Segundo Allen (2005), o ciclo estral refere-se ao fenômeno rítmico observado em todos os mamíferos (exceto primatas), nos quais há períodos regulares, mas limitados, de receptividade sexual (estro), que ocorrem a intervalos característicos para cada espécie. Um intervalo de ciclo é definido como o tempo entre dois períodos de receptividade sexual, com consequentes ovulações.

Durante o ECSMV, assim como cita Allen (2005), as éguas eram acompanhadas até o momento ideal para se realizar a IA, requerendo conhecimento da fisiologia do ciclo estral.

Morel (2003), relata que o estro ou cio é caracterizado pelo período de aceitabilidade ao garanhão. Durante o estágio, observou-se esta aceitação da égua, além da presença de um folículo com mais de 25 mm, chamado de folículo dominante, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa, induzindo mudanças comportamentais e morfológicas no trato reprodutor da égua, tais características comportamentais foram confirmadas durante o período de estágio, como micção frequente, eversão da vulva e do clitóris, cauda levantada, urina amarelada brilhante com odor característico.

Sobre as características morfológicas em um ambiente estrogênico, Evans, Constantinescu e Ganjam (2007), relatam as principais características observadas ao exame ultrassonográfico por palpação retal: presença de edema uterino, presença de folículo dominante, ausência de CL funcional, contratilidade miometrial aumentada, sendo que todas estas características foram observadas durante o período de acompanhamento ultrassonográfico durante a realização do ECSMV.

Evans, Constantinescu e Ganjam (2007), descreveram que o diestro inicia quando as manifestações de cio acaba, esse fato ocorre entre 24 a 48 horas após a ovulação, resultando na formação do corpo lúteo e termina com a luteólise do mesmo. Nessa fase, a égua torna-se agressiva na presença do garanhão. Tais características foram facilmente evidenciadas nas éguas trabalhadas na Central Estábulo, evidenciando o final do cio em média, um dia pós-ovulação, sendo que as variações de agressividade foram bastante variadas.

Durante o ECSMV, ainda se observou durante o diestro, o colo do útero seco, firme, com coloração rósea pálida e fechado, formando uma espécie de vedação contra a entrada de contaminantes no útero, tais características vão de encontro à tese dos autores para que haja o estabelecimento de uma gestação.

Segundo Nie et al. (2007), o anestro fisiológico acontece nos meses onde há menor luminosidade diária, que resulta nos altos níveis de melatonina e seu efeito inibitório no hipotálamo, quando é caracterizada por pouca ou nenhuma atividade ovariana.

3.2 Transferência de embriões

A primeira TE não cirúrgica realizada com sucesso foi no ano de 1972, por Oguri e Tsutsumi no Japão. A partir deste primeiro relato, esta técnica foi aprimorada e adaptada às mais variadas raças. Nos dias atuais é facilmente realizada nas propriedades, com boas taxas de prenhes. Na Central de Reprodução Equina Estábulo, durante o ano de 2014/2015, foi o local onde mais se coletou embriões no Brasil com diagnóstico de prenhes confirmatória.

Segundo Pimentel e Carneiro (2008), a TE visa colher uma estrutura fertilizada de uma égua chamada de “doadora” e este é inovulado no útero de outra égua chamada de “receptora”, a qual levará a gestação à termo.

No 5º dia após fecundação, o embrião começa a secretar PGE2. Este hormônio atua localmente nas ampolas do oviduto proporcionando um relaxamento das fibras musculares da parede permitindo assim a entrada do embrião no útero (Allen, 2001). A partir deste momento o embrião inicia um processo de migração embrionária e sinalização dos fatores de reconhecimento materno da gestação (Landim - Alvarenga, 2006).

Embora embriões possam ser recuperados nos dias 6 (congelamento) a 9, o período ideal para sua colheita é nos dias 7 ou 8 após a fertilização (Squires & Seidel, 1995).

Na Central Estábulo, durante o ECSMV, prezava-se a coleta de embrião em éguas novas (até 13 anos) no D8, em éguas consideradas velhas (14 anos ou mais), a coleta era normalmente no D9. Essa espera de um dia, acredita-se que se deve ao fato dessas éguas idosas não responderem hormonalmente do mesmo modo que éguas mais jovens.

Estudos apresentam que éguas inseminadas pós-ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada que o esperado, observando um retardo em seu crescimento,

equivalente a 1 dia de atraso quando comparado com éguas inseminadas pré-ovulação (Lisa & Meadows, 2008). Já na Central os procedimentos de IA quando possível não eram realizados pós-ovulação, mas este atraso de 1 dia era observado em éguas mais velhas normalmente.

Segundo Ginther (1998), entre os dias 7 e 8, momento em que o embrião está no estágio de Blastocisto inicial (Bi) ou Blastocisto expandido (Bx), com tamanho variando de 300 a 1500 μm , ocorre a formação de uma cápsula externamente à zona pelúcida, e após a formação desta, a zona pelúcida se degenera e ela se torna a estrutura mais externa do embrião. Esta cápsula embrionária desempenha várias funções até sua degeneração por volta do dia 21, dentre as funções destacam-se: ser uma camada de glicoproteínas que possibilita resistência e elasticidade às contrações uterinas, previne aderência do embrião contribuindo para sua mobilidade.

A qualidade do embrião apresenta o principal efeito sobre as taxas de prenhes. Embriões com escores de qualidade pobres (≥ 3) resultam em baixa taxa de prenhes (Squires & Seidel, 1995). Essa característica foi evidenciada durante o ECSMV, foram coletados 3 embriões com baixa qualidade e 1 com defeitos na cápsula (degenerada) e não foi registrado nenhum diagnóstico de prenhes positiva nas éguas inovuladas.

Após avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção, conforme Fleury (2001), com o objetivo de eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida. Após este processo, o embrião está pronto para ser transferido para a égua receptora ou ser condicionado ao resfriamento para transporte. Este é um ponto bem debatido na central, pois o manejo com o embrião é feito da seguinte forma: o embrião era lavado até estar “limpo”, independente de quantas vezes, na maioria dos casos em seis lavados já era suficiente, o que se respeitava era a troca do material a cada três lavagens se necessária.

3.3 Sexagem fetal, Diagnóstico de gestação e Gestação gemelar

3.3.1 Sexagem fetal

Segundo Carmo (2007), o conhecimento do sexo do feto pode proporcionar valorização na venda da égua gestante, ou a não comercialização desta por ter um produto desejado. A dificuldade em localizar o tubérculo genital entre os 55-70 dias de gestação na espécie equina favorece a não utilização deste procedimento na rotina de trabalho (TABELA 5), segundo o autor, as principais dificuldades desta técnica são devido à grande quantidade de líquido alantoidiano na vesícula embrionária, pelo comprimento do cordão umbilical e mobilidade fetal.

TABELA 5: Característica do desenvolvimento anatômico fetal.

IDADE	VISUALIZAÇÃO
90 - 100 dias	O feto é geralmente acessível, a genitália não completou o seu desenvolvimento.
100 – 110 dias	A genitália torna-se mais evidente.
110 – 120 dias	O feto é bem acessível e a genitália está bem desenvolvida (momento ideal para desenvolver a técnica de avaliação da gônada).
120 – 140 dias	O feto está bem desenvolvido, porém a parte posterior do feto pode ser dificilmente acessada neste momento.
140 – 150 dias	Neste momento o feto tem apresentação anterior, com posterior fora do alcance.
150 dias ou mais	Neste momento o feto tem apresentação anterior, com posterior fora do alcance e baixa porcentagem de diagnóstico de 5 a 25%.
Mais de 150 dias	Ultrassom transabdominal, baixa porcentagem de diagnóstico, gasto de maior tempo e necessidade de tricotomia abdominal.

Fonte: Samper, et al., (2007).

Samper (2007), relata que o tubérculo genital é a estrutura que dará origem ao pênis no macho e ao clitóris na fêmea. A diferenciação dos dois sexos se dá pela distância que o tubérculo está localizado em relação ao ânus, no caso da imagem ultrassonográfica da cauda do feto. A posição inicial do tubérculo genital é próximo aos membros posteriores, nos machos ocorre a migração próximo a região da inserção do cordão umbilical ao abdômen, já

nas fêmeas não muda muito da localização inicial, pois migra até a região do períneo, na imagem ultrassonográfica a cauda é apresentada como referência.

A prática de sexagem através do tubérculo é pouco realizada para equinos, pois apresenta pouca probabilidade de acerto. No entanto, a visualização das gônadas fetais e da genitália externa no período de 90-150 dias de gestação apresentam bons resultados. Este procedimento é relativamente mais fácil de ser executado, entretanto a prática do médico veterinário e um bom aparelho de ultrassom facilitam a visualização das estruturas.

Renaudin (2000), relata que a gônada masculina é oval, medindo de 2 a 7 cm de diâmetro, sua camada medular é homogênea e apresentam uma fina linha ecogênica (mediastino) longitudinal central em relação a camada medular. Estas imagens, foram visualizadas nas sexagens realizadas durante o ECSMV.

Holder (2007), relata que o prepúcio tem forma de cone no corte transversal ao exame ultrassonográfico, com uma área hiperecogênica no interior (Pênis). A glândula Mamária é visualizada como uma estrutura triangular com duas extremidades hiperecogênicas (Tetos), assim como pode ser visualizado (FIGURA 16) nos procedimentos realizados na Central.

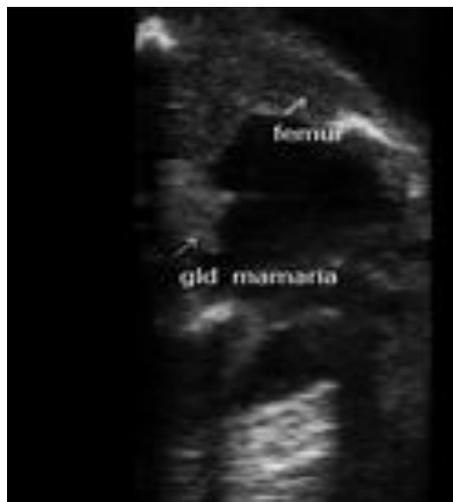


FIGURA 16: Imagem ultrassonográfica da glândula mamária de um feto de 130 dias de gestação observado durante o ECSMV. Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.2 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação na égua pode ser realizado precocemente (11° a 12° dias), desde que o avaliador tenha em mãos um bom equipamento e larga experiência. Apesar disso, o diagnóstico está sujeito a erros. O diagnóstico mais preciso é ao redor dos 14 – 15 dias de gestação, onde podemos observar uma vesícula bem formada e móvel dentro do lúmen uterino.

Apesar do diagnóstico de gestação ser bastante confiável, erros podem acontecer devido a inexperiência no técnico e confusões com cistos endometriais (Reunandin, 2001).

Apesar de ser um sistema de diagnóstico precoce de prenhes deve-se considerar que as éguas apresentem altas taxas de mortalidade embrionária e por consequência, os animais devem ser re-examinados mais vezes após o diagnóstico inicial.

Os procedimentos realizados de diagnóstico de gestação durante o ECSMV eram feitos ao 12° dia pós-ovulação, com elevados índices de acertos, que ficavam entre 80 e 90%.

Conforme Lira et. al. (2009), o diâmetro da vesícula embrionária entre D11-12 é de aproximadamente 5-6 mm. Entre os dias 9 e 16 da gestação, a vesícula embrionária apresenta formato esférico e taxa de crescimento de aproximadamente 3,5 mm/dia. O platô de crescimento embrionário está relacionado com o aumento do tônus uterino observados entre D16 e D18, mesmo momento em que se observa a perda do formato esférico da vesícula.

Leith e Ginther (1984), falam que o embrião equino se move constantemente de uma extremidade à outra do útero levado por fortes contrações peristálticas do miométrio, nos dias 9 a 17 após a ovulação.

Este processo de mobilidade do conceito na égua persiste até o dia 16 ou 17 após ovulação, quando ocorre um rápido aumento no diâmetro do embrião e um súbito espasmo que aumenta o tônus miometrial e fixa o conceito no eventual local de implantação, na base de um dos cornos uterinos.

Foi possível observar claramente esta intensa movimentação durante o ECSMV da vesícula embrionária durante os dias D12 até D16, podendo transcorrer até 12 vezes toda a extensão do útero ao dia.

Ainda na Central, os exames de DG eram feitos aos 25 dias de gestação. Nesse momento estas éguas eram soltas em piquetes separados, e voltavam para um novo exame aos 50 dias de gestação, se fosse égua receptora, o proprietário era informado e a égua era levada da Central. A saída de éguas da Central só era realizada após este exame de 50 dias de gestação positiva assinada pelo responsável do animal.

3.3.3 Gestação gemelar

Segundo Merk e Jochle (1993), a presença de gestação gemelar frequentemente resulta em aborto no final da gestação ou no nascimento de potros com alta taxa de mortalidade neonatal. A gestação gemelar apresenta uma taxa de reabsorção embrionária de 1,72% quando o diagnóstico por palpação retal é realizado entre o 20º e o 40º dia após a IA ou monta direcionada.

McKinnom (2007), relata que a presença de duas vesículas embrionárias pode ser facilmente detectada no momento da avaliação por ultrassonografia, porém, caso elas ainda não estejam fixadas, uma dessas vesículas pode ser esmagada manualmente.

Durante o ECSTMV foram diagnosticadas 2 gestações gemelares ao 14º dia pós inseminação. Indo ao encontro do que relatam a maioria dos autores, as vesículas foram facilmente diagnosticadas. A conduta adotada pelo veterinário foi pela administração de 10 ml endovenosa de flunixin meglumine antes de iniciar o processo de redução manual da menor vesícula embrionária. As vesículas eram separadas, guiadas pelo ultrassom, e a menor esmagada manualmente contra a parede do útero.

Veronesi et al. (2005), cita que a vesícula embrionária é rompida utilizando o dedo polegar e o indicador no local onde ela é detectada, por meio da técnica da ultrassonografia, posicionando o transdutor no local onde se encontram as vesículas.

Nos dois casos acompanhados durante o estágio, ao exame de US aos 25 dias de gestação, o embrião remanescente não sofreu alterações e manteve a gestação a termo até o acompanhamento aos 50 dias gestacionais.

McKinnom e Rantanem (1998), relatam que a melhor forma de eliminação da vesícula embrionária antes dos 31 dias de gestação é através do esmagamento manual. Citam ainda, que entre os dias 35 e 45 de gestação, ocorre 60% de reabsorção de ambos os conceptos, 20% de vesículas unilaterais e 20% de sobrevivência de ambos quando realizado o procedimento de redução por aspiração transvaginal.

Durante os procedimentos de diagnóstico precoce de gestação, sempre se prezava pelo esmagamento de uma das vesículas antes da fixação embrionária ocorrer. Embora exista como interromper a gestação após este período, sempre era aconselhável a realização deste processo ara evitar danos maiores para a égua quanto para os futuros potros.

Macpherson e Reimer (2000), relataram o nascimento de nove potros normais de 24 éguas submetidas ao procedimento em gestações maiores do que 120 dias. A técnica utilizada

foi através da injeção intracardíaca de cloreto de potássio e no abdômen fetal de 10 a 20 ml de penicilina, resultou em morte fetal rápida.

3.4 Inseminação artificial com sêmen refrigerado e congelado

3.4.1 Inseminação artificial com sêmen refrigerado

A técnica de Inseminação Artificial em equinos requer a manipulação vaginal e por isso, só pode ser executada por médicos veterinários. Apesar disso, é um procedimento simples, com objetivo de injetar o sêmen coletado no interior do útero da égua, por meio de uma pipeta.

Pimentel e Carneiro (2008), relatam que apesar de simples, o procedimento requer certos cuidados. O primeiro deles é o acompanhamento do ciclo estral da égua, a fim de se definir o melhor momento para a execução da inseminação. Durante o ECSMV, as éguas eram inseminadas quando apresentassem um folículo maior ou igual a 35 mm (ou 40 mm para animais de salto), com presença de edema uterino e abertura de cérvix.

Aurich & Aurich (2006), nos falam que este edema uterino indica que o folículo dominante está produzindo quantidades adequadas de estrógeno e que a imunidade do útero esta ativada pelo aumento da vascularização. A cérvix aberta propicia uma melhor drenagem de muco, de diluentes e de plasma seminal após a inseminação.

Sobre a antissepsia da região perineal, Samper (2007), relata que pode ser feita com a bandagem da cauda e a limpeza com água e detergente neutro, sempre manipulando no sentido vulva – regiões adjacentes, assim como era realizada na Central de Reprodução Equina Estábulo. Após a secagem com papel toalha, a desinfecção deverá ser feita com álcool 70%, assim como era realizado.

Ao receber o sêmen que iria ser utilizado nas éguas da Central, era feita a avaliação do mesmo, observando sua motilidade progressiva e vigor. O sêmen era recebido em caixas térmicas (Botuflex), a uma temperatura de 5°C por no máximo 24 horas de envio.

O armazenamento por períodos superiores a 24 horas, podem desencadear processos bioquímicos que comprometem a fertilidade dos gametas, como a capacitação espermática

prematura que resultará na diminuição da capacidade de penetrar e fertilizar o ovócito (Pommer et al., 2002).

As IA realizadas eram feitas pelo método Intra-cornual, ipsilateral ao folículo pré-ovulatório, e um volume que normalmente ficava entre 20 e 40 ml de sêmen.

Já Morris e Allen (2002), quando depositado o sêmen próximo à junção úterotubárica, utiliza-se normalmente volumes menores de sêmen sem decréscimo na fertilidade.

Em síntese, Morris e Allen (2002), relatam que, para obter sucesso na IA com sêmen equino refrigerado, deve ser utilizada uma concentração média de 500×10^6 espermatozoides viáveis. No que diz respeito ao volume da dose inseminante, os resultados com valores de 10 até 75 ml garantem bons índices de prenhez.

3.4.2 Inseminação artificial com sêmen congelado

Basicamente a inseminação artificial com sêmen congelado possui o mesmo princípio da inseminação comum. Trata-se da introdução do sêmen no interior do útero da égua. No entanto algumas observações são importantíssimas para o sucesso da técnica.

Neves et al. (2008), relatam que o primeiro cuidado refere-se ao momento da inseminação, que deve ocorrer 6 horas antes ou até 6 horas depois da ovulação. Isso porque a viabilidade do sêmen congelado e a do oócito após a ovulação são de 6 horas.

Em nossa rotina durante o ECSMV foi observado que 2 a 3 horas antes ou após a ovulação garantem uma maior taxa de prenhes dos animais em questão. As éguas eram induzidas à ovulação às 22 horas da antevéspera do dia da inseminação. No dia da inseminação iniciávamos o monitoramento por ultrassom as 7 horas da manhã e mantínhamos uma frequência de 3 horas até o início dos sinais da ovulação. Nesse momento era iniciado o processo de inseminação.

O preparo da égua é idêntico ao que foi relatado para inseminação comum. Quanto ao descongelamento das palhetas Miller (2008), idealiza para descongelarmos em banho-maria a 37°C por 30 segundos, assim como era realizado durante o ECSMV.

Quanto ao local de deposição do sêmen, na Central preconizava-se a deposição intra-cornual no corno ipsilateral ao ovário que iria ovular, assim como Pimentel e Carneiro (2008) relatam.

4 - CONCLUSÕES

A reprodução animal apesar de uma área específica do conhecimento mostra-se bastante ampla e com uma importância fundamental para o melhoramento da manada.

Dentro do manejo adotado em todas as atividades discutidas durante o estágio, nota-se a harmonia entre a literatura e a experiência profissional, nos mostrando que é de suma importância adotar os protocolos estudados pelos autores e que em determinada situação podem ser mesclados com a filosofia e experiência de cada profissional.

A realização do estágio supervisionado na Central de Reprodução Equina Estábulo foi de grande valia, tanto no crescimento profissional como no crescimento pessoal. As perspectivas de realização das atividades do estágio foram superadas positivamente, conhecendo e adquirindo um campo de trabalho bastante amplo na área.

5 - REFERÊNCIAS

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, 2001, v.121, p.513-527.

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horsebreeding. **Reproduction in Domestic Animals**, 4° Ed, Berlin, 2005, v. 40, p. 310-329.

AURICH, J; AURICH, C. Developments in European Horse Breeding and Consequences for Veterinarians in Equine Reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, 4° Ed, Vienna, Austria. 2006, vol. 41, p. 275-279.

CARMO, M. T. Sexagem em equinos através da avaliação ultra-sonográfica da gônada fetal. In: 21th Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Annual Meeting, **Revista Acta Scientia e Veterinariae**, UFRGS/POA, 2007, v. 35(Supl.3), p.891-894.

EVANS, T. J; CONSTANTINESCU, G. M; GANJAM, V. K. Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Mare, In: YOUNGQUIST R. S; THRELFALL W. R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2° Ed. Philadelphia, USA: Editora Saunders Elsevier, 2007, Cap. 7, p. 47-67.

FLEURY, J. J. 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.** 2001, v.38, p.29-33.

GINTHER, O. J. Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus, **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, Baltimore USA, v. 44, 1998, p. 73-104.

HOLDER, R. D. Fetal sex determination. In: SAMPER, J. C; PYCOCK, J. F; MCKINNON, A. O. **Current Therapy in Equine Reproduction**, Philadelphia, USA: Ed: Saunders Elsevier, 2007, Cap.53 p.343-356.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Crescimento e Desenvolvimento do Concepto. In: PRESTES, N. C; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Veterinária: Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro, Ed: Guanabara Koogan. 2006, Cap. 4, p. 52-69.

LANDIM-ALVARENGA, F. C. Fecundação e Clivagem. In: PRESTES, N. C; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Veterinária: Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro, Ed: Guanabara Koogan. 2006, Cap. 1, p. 1-21.

LEITH G. S; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, 1984, Cap. 22, p. 401- 408.

LIRA, R. A; PEIXOTO, G. C. X; SILVA, A. R. Transferência de Embriões em Equinos: Revisão. **Revista Acta Veterinária Brasileira**, Mossoró RN, vol. 3, n.4, 2009, p. 132-140.

LISA, H. M. & MEADOWS, S. **Essential management practices in commercial equine embryo transfer**. Proceedings 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge, UK. 2008, p.101-102.

MACPHERSON, M. L.; REIMER, J. M. Twin reduction in the mare: current options. **Animal Reproduction Sci**, v.60, 2000, p.233-244.

MCKINNOM, A. O. Twin reduction techniques. In: SAMPER, J. C.; et al. **Current Therapy in Equine Reproduction**. St. Louis: Saunders, 2007. p.357-373.

MCKINNOM, A. O.; RANTANEM, N. W. Twins. In: RANTANEM, N. W, MCKINNOM, A. O. **Equine Diagnostic Ultrasonography**. Baltimore: Williams&Wilkins, 1998. p.141-156.

MERKT, H; JOCHLE, W. Abortions and twin pregnancies in Thoroughbreds: Rate of occurrence, treatments and prevention. **Journal Equine Vet Sci**, 1993, v.13, p.690-694.

MILLER, C. D. Optimizing the use frozen-thawed equine sêmen. Ocala-EUA, **Science Direct Theriogenology**, vol. 70, 2008, p. 463-468.

MOREL, D. M. C. G. Endocrine Control of Reproduction in the Mare. **Equine Reproductive Physiology Breeding and Stud Management**. 2º Edição. New York, USA: Editora Cabi Publishing, 2003, cap. 3, p. 28-39.

MCCUE, P. M. Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião. **XII Conferência anual da associação Brasileira de Médicos Veterinários de equídeos (abreveq)**, Campinas, SP. 2011.

MORRIS, L. H. A. ALLEN, W. R. An overview of low dose insemination in the mare. **Reprodução Animal**, 2002, v.37, p.206- 210.

NEVES, J. P. et al. Diagnóstico de prenhez em ruminantes, In: Gonçalves D. B. P; Figueiredo R. J.; Freitas F. J. V. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo, SP: Editora Roca, 2008, cap. 2, p. 17-32.

NIE, G. et al. Clinical aspects of seasonality in mares. In: YOUNGQUIST R. S; THRELFALL W. R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2º Edição. Philadelphia, USA: Editora Saunders Elsevier, 2007, cap. 8, p. 68-73.

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

PIMENTEL, C. A; CARNEIRO G. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução de Equinos. In: GONÇALVES D. B. P; FIGUEIREDO R. J; FREITAS F. J. V. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo, SP: Editora Roca, 2008, cap. 8, p. 145-457.

POMMER, A. C.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, 2002, v.57, p.1493-1501.

RENAUDIN, C. D. **Determination del sexo fetal em equinos mediante ultrassonografia, Recent Advances in Equine Reproduction** B. A. Ball(ed.), International veterinary information service, Ithaca, New York, USA, 2000.

RENAUDIN, C. D. **Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender**. In: Recent Advances in Equine Reproduction, B.A. Ball. Ithaca, 2001, New York, USA.

SAMPER, J. C. Techniques for artificial insemination. In: YOUNGQUIST R. S; THRELFALL W. R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. 2º Edição. Philadelphia, USA: Editora Saunders Elsevier, 2007, Cap.5, p.37-42.

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

VERONESI, M. C; et al. Plasma concentrations of 15 ketodihydro PGF 2α , cortisol and progesterone during manual twin reduction in Thoroughbred mares. **J. Vet Med**, 2005, v.52, p.411-415.

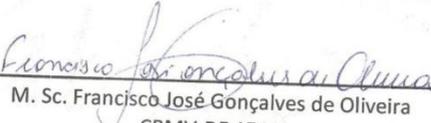
ANEXO A – Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Período de Estágio

CERTIFICADO

Certifico que, ANTÔNIO CARLOS GASPARETTO executou estágio junto à ESTÁBULO SERVIÇOS VETERINÁRIOS Ltda., no período de 01 de fevereiro a 27 de abril de 2016, totalizando 560 horas, na área de Reprodução assistida equina.

Brasília, 30 de abril de 2016.


M. Sc. Francisco José Gonçalves de Oliveira
CRMV-DF 1540

