

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

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

Orientadora: Daniela dos Santos Brum

Natan da Cruz de Carvalho

Uruguaiana, dezembro de 2015.

NATAN DA CRUZ DE CARVALHO

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

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguiana, 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, Dr^a.

**Uruguiana
2015**

NATAN DA CRUZ DE CARVALHO

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 Equina

Relatório apresentado e defendido em 9 de dezembro de 2015.

Prof^a. Dr^a. Daniela dos Santos Brum
Orientador

Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa -UNIPAMPA

Prof. Dr. Mateus José Sudano
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico esta conquista aos meus pais, Jadir Carvalho e Andreia Carvalho, pois acreditaram, apoiaram, e foram essenciais para a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir acordar a cada dia e ir em busca de meus objetivos, colocando em meu caminho oportunidades e desafios que me fizeram ir além dos limites que eu imaginava.

Aos meus pais, que com muito esforço me educaram, confiaram e forneceram todos os subsídios para que eu realizasse este sonho da melhor maneira possível.

Ao professor Paulo de Souza Junior, personalidade de extrema importância para a minha trajetória, pois foi através de seu trabalho que despertei motivação e passei a encarar desafios em busca de excelência na graduação.

A professora Daniela dos Santos Brum, pela orientação, amizade, apoio e motivação constante, aspectos que foram imprescindíveis para o meu desenvolvimento tanto acadêmico quanto pessoal.

Ao Grupo PET Veterinária, por todas as oportunidades e experiências proporcionadas, possibilitando uma formação completa e diferenciada, especialmente aos petianos Karine Mattos, Marcelo Becker, Daniele Missio e à tutora Daniela.

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa, por proverem ensino de qualidade para uma boa formação profissional.

A todos da FMVZ-UNESP-Botucatu por me receberem e acolherem da melhor forma para realização do estágio curricular, em especial aos amigos Yame Fabres e Edjalma Junior, pela agradável companhia e ensinamentos na rotina diária de trabalho.

Ao meu supervisor de estágio curricular, Marco Antonio Alvarenga, pelos ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram motivação e confiança para atuar na área de reprodução equina.

A todos os profissionais que participaram de forma direta ou indireta na minha formação, em especial a Fernando Velo, Frederico Schimitt, Gian Zacarias, Gilberto Severo, Henrique Löf, Lucas Campara, Luciana Wolle, Márcio Teoro do Carmo e Rodrigo Kaipper por me cederem a oportunidade de acompanhá-los em suas rotinas de trabalho conciliando o conhecimento teórico com a prática.

Aos demais que contribuíram para mais esta etapa vencida, muito obrigado!

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho. ”

(Dalai Lama)

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA - ÁREA DE REPRODUÇÃO EQUINA

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) concentrado na área de Reprodução equina. Durante o ECSMV, foi possível acompanhar as principais biotécnicas reprodutivas utilizadas atualmente em equinos no cenário nacional, tanto no âmbito científico quanto no mercado de trabalho autônomo. Como local de estágio, optou-se pelo Centro de Biotecnologia e Reprodução Equina da Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP, Botucatu-SP), supervisionado pelo professor Phd. Marco Antonio Alvarenga; e Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH, Universidade Federal do Pampa, campus Uruguaiana-RS), supervisionado e orientado pela professora Dra. Daniela dos Santos Brum. O ECSMV foi realizado entre os dias 01 de setembro e 05 de dezembro de 2015, perfazendo um total de 576 horas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Coletas de sêmen de garanhão da raça quarto de milha (A) e “Miniature Horse” (B) utilizando éguas manequins. Fonte: arquivo pessoal. 15
- Figura 2: Figura esquemática de câmara de Neubauer para avaliação de concentração espermática. Fonte: arquivo pessoal. 16
- Figura 3: Inseminação artificial com sêmen refrigerado realizada em égua Crioula durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. 19
- Figura 4: Visualização do lote de éguas selecionadas a serem receptoras de embrião durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. Fonte: arquivo pessoal. 23
- Figura 5: Procedimento de lavagem intrauterina em égua doadora para recuperação de embrião durante o ECSMV. A) Infusão de Ringer com Lactato sob pressão para o lúmen uterino; B) Massagem do útero via palpação retal e refluxo do líquido passando em filtro contido no copo coletor de embrião. Fonte: arquivo pessoal. 26
- Figura 6: Desenho esquemático da morfologia de oócito e estágio de desenvolvimento embrionário. A) oócito; B) Mórula compacta; C) Blastocisto inicial; D) Blastocisto; E) Blastocisto; F) Blastocisto com cápsula formada e zona pelúcida delgada; G) Blastocisto com cápsula e extrusão da zona pelúcida; H) Blastocisto expandido. Fonte: arquivo pessoal. 27
- Figura 7: A) Blastocisto expandido grau 1; B) Blastocistos expandidos grau 1 originados do protocolo de indução de dupla ovulação com baixa dose de deslorelina. Fonte: arquivo pessoal. 27
- Figura 8: Desenho esquemático da disposição das colunas de líquido e de ar com embrião pronto para inovulação em palheta de 0,25 mL. Fonte: arquivo pessoal. 28
- Figura 9: Caixa térmica adaptada para preservação e transporte de embrião equino por curto período de tempo. Fonte: arquivo pessoal. 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades ginecológicas acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária nas regiões de Botucatu-SP e Uruguaiana-RS, de 01 de setembro a 05 de dezembro de 2015	13
Tabela 2: Atividades andrológicas acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária nas regiões de Botucatu-SP e Uruguaiana-RS, de 01 de setembro a 05 de dezembro de 2015	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIOTECH	Laboratório de Biotecnologia da Reprodução
°C	Graus Celsius
CERBEQ	Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina
CID	Microscópio de contraste de interferência diferencial
cm	Centímetros
DIC	Diacetato de carboxifluoresceína
ECMV	Estágio curricular em medicina veterinária
G	Força G
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IP	Iodeto de propídio
N ₂	Nitrogênio líquido
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
P4	Progesterona
Rpm	rotações por minuto
TE	Transferência de embrião
UNESP	Universidade Estadual Julio Mesquita Filho
UNIPAMPA	Universidade Federal do Pampa
VA	Vagina artificial
%	Por cento
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	13
2.1 Coleta de sêmen.....	14
2.2 Avaliação espermática.....	15
2.2.1 Avaliação de concentração espermática.....	16
2.2.2 Integridade e função de membrana.....	16
2.2.3 Morfologia espermática.....	17
2.3 Refrigeração de sêmen.....	17
2.4 Inseminação artificial.....	18
2.5 Congelamento de sêmen.....	19
2.5.1 Inseminação artificial com sêmen congelado.....	21
2.6 Transferência de embriões.....	22
2.6.1 Seleção e controle de receptoras.....	22
2.6.2 Controle do estro e da ovulação de receptoras e doadoras de embrião.....	24
2.6.3 Recuperação embrionária.....	25
2.6.4 Rastreamento e avaliação embrionária.....	26
2.6.5 Inovulação.....	27
2.6.6 Preservação e transporte de embriões por curto período de tempo.....	28
3 DISCUSSÃO.....	30
3.1 Fisiologia reprodutiva do garanhão.....	30
3.2 Coleta de sêmen.....	33
3.3 Congelamento de sêmen.....	35
4 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A.....	44
ANEXO B.....	45

1- INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, é imensurável o número de pessoas que se encantam com a nobreza do cavalo, embora seja um animal arreado, possui grande facilidade em formar laços com o ser humano e extrema capacidade de ser trabalhado como ferramenta em setores de grande importância socioeconômica como agricultura, pecuária e transporte. Além das atividades laborais, o cavalo se destaca por sua importância econômica em outras atividades que o trazem ainda mais próximo do convívio do ser humano, entre estas atividades pode-se citar o hipismo, adestramento, pólo, turfe, vaquejada, rodeio, enduro, campeonatos de conformação, tambor, baliza, entre outros. Estas atividades fazem com que o perfil equestre brasileiro se altere, onde o cavalo deixa de ser um simples indivíduo no rebanho e passe a ser um animal doméstico, por vezes considerado um membro da família, agregando ainda mais valor afetivo associado ao valor zootécnico.

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de cabeças. Entre os animais registrados atualmente, são 300 mil Mangas-Largas Marchadores, 278 mil Quartos-de-Milha, 197 mil Crioulos, 186 mil Mangas-Largas, 88 mil Campolinas, 80 mil Árabes, 30 mil Puros-Sangues Ingleses e 25 mil Appaloosas, entre outros (GUERRA, 2003). De acordo com Lima e colaboradores (2006), o complexo do cavalo-agronegócio movimenta no Brasil cerca de R\$ 8,5 bilhões anuais, proporcionando mais de três milhões de empregos diretos e indiretos. Com o crescimento das associações de raças puras, as exigências por parte dos proprietários em relação a qualidade dos seus animais e serviços técnicos vem aumentando, por esta razão é indispensável a qualificação do médico veterinário atuante na reprodução equina.

As biotécnicas aplicadas à reprodução animal têm contribuído significativamente com a compreensão da fisiologia, diagnóstico e tratamento de causas de subfertilidade ou infertilidade. Ao se tratar de equinos, as biotécnicas assumem uma importância ainda maior na cadeia produtiva, pois trabalha-se com um grande número de animais idosos nos programas de melhoramento genético, justamente pela forma tardia em que se tem a comprovação de mérito genético destes animais em relação a outras espécies (ALVARENGA; PAPA, 2009). Diferentes biotécnicas de reprodução assistida como ultrassonografia, inseminação artificial, congelamento de sêmen e embriões, transferência de embriões, aspiração folicular e transferência de oócitos, produção *in vitro* de embriões e injeção

intracitoplasmática de espermatozoides são algumas das possibilidades que têm despertado interesse entre criadores e associações de criadores de cavalos para acelerar e facilitar o melhoramento genético de raças puras no mundo inteiro.

O Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu (São Paulo) está entre os principais centros de produção e difusão de conhecimento em biotecnologia aplicada a reprodução equina no Brasil, agrupando pesquisadores considerados referência nesta área e reconhecidos internacionalmente. O Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), estabelecido na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana (Rio Grande do Sul), foi implantado juntamente com o curso de Medicina Veterinária no ano de 2009, e através da dedicação e comprometimento de profissionais que nele atuam, conta com equipamentos modernos e excepcionais para o desenvolvimento de pesquisas avançadas na área de biotecnologia da reprodução, tornando-se assim um potencial centro de referência nacional em produção científica. Devido aos fatos apresentados, oportunidades e estrutura oferecida, o CERBEQ da UNESP e BIOTECH da UNIPAMPA foram escolhidos para a realização deste estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), que da melhor forma disponibilizaram as ferramentas necessárias para a complementação da graduação em Medicina Veterinária. Assim, o objetivo deste relatório é apresentar as atividades desenvolvidas durante o ECSMV com ênfase em tecnologias do sêmen e transferência de embriões equinos sob supervisão do professor Phd. Marco Antonio Alvarenga e supervisão/orientação da Dra. Daniela Brum no período de 01 de setembro a 05 de dezembro de 2015, totalizando uma carga horária de 576 horas.

2- ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de ECSMV pode-se acompanhar as principais biotécnicas reprodutivas aplicadas a equinos no Brasil, destacando-se tecnologias do sêmen como coleta, avaliações e criopreservação de espermatozoides; e também manejos reprodutivos em éguas, desde o controle da dinâmica folicular até transferência de embriões. Devido à parceria, parte das atividades vinculadas ao CERBEQ foram desenvolvidas na LUB Breeding – Centro de Reprodução Equina, acompanhando a rotina do Dr. Márcio Teoro do Carmo. Todas as atividades vinculadas ao BIOTECH foram desenvolvidas na LÖF – Central de Reprodução Equina, acompanhando a rotina do Dr. Henrique Kurtz Löff (TABELAS 1 e 2).

TABELA 1 - Atividades ginecológicas acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária nas regiões de Botucatu-SP e Uruguaiana-RS, de 01 de setembro a 05 de dezembro de 2015.

Atividades	A	D	Total	
	n	n	n	%
Ginecologia				
Éguas em controle de dinâmica folicular	75	125	200	45,8
Ultrassonografia do sistema reprodutor	63	0	63	14,4
Avaliação de receptoras de embrião	32	0	32	7,3
Inseminação artificial com sêmen refrigerado	11	14	25	5,7
Lavado uterino para coleta de embrião	21	0	21	4,8
Diagnóstico de gestação precoce	18	1	19	4,3
Lavagem uterina terapêutica	13	0	13	3,0
Transferência de embrião	11	0	11	2,5
Exame do sistema reprodutor por palpação retal	10	0	10	2,3
Citologia endometrial	5	5	10	2,3
Implante intravaginal de progesterona	8	0	8	1,8
Biopsia endometrial	4	0	4	0,9
Estrogenização de manequim	0	4	4	0,9
Controle folicular para para sêmen congelado	3	0	3	0,7
Inseminação artificial com sêmen descongelado	3	0	3	0,7
Diagnóstico de gestação tardia	1	1	2	0,5
Infusão intrauterina terapêutica	2	0	2	0,5
Laceração retovaginal	2	0	2	0,5
Transporte de embrião refrigerado	2	0	2	0,5
Ultrassonografia doppler do sistema reprodutor	1	1	2	0,5
Manejo de gestação gemelar	1	0	1	0,2
Total	286	151	437	100

TABELA 2 – Atividades andrológicas acompanhadas (A) e desenvolvidas (D) durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária nas regiões de Botucatu-SP e Uruguaiana-RS, de 01 de setembro a 05 de dezembro de 2015.

Atividades	A	D	Total	
Andrologia	N	n	n	%
Coleta de sêmen	232	39	271	43,4
Avaliação de concentração espermática	0	133	133	21,3
Avaliação espermática em sistema computadorizado	30	18	48	7,7
Avaliação de morfologia espermática	0	36	36	5,8
Avaliação de integridade e função de membrana	0	33	33	5,3
Termografia testicular	30	0	30	4,8
Avaliação testicular por ultrassonografia doppler	25	0	25	4,0
Monta dirigida	21	0	21	3,4
Indução de degeneração testicular por insulação	0	10	10	1,6
Congelamento de sêmen	7	0	7	1,1
Coleta fracionada de sêmen	5	0	5	0,8
Vesiculite	1	0	1	0,2
Fístula uretral	1	0	1	0,2
Congelamento direto de sêmen	1	0	1	0,2
Degeneração testicular	1	0	1	0,2
Punção testicular com agulha fina	1	0	1	0,2
Avaliação testicular por ultrassonografia	1	0	1	0,2
Total	356	269	625	100

2.1 Coleta de sêmen

As coletas de sêmen de garanhões foram realizadas com auxílio de vagina artificial (VA) fechada, modelo Botucatu ou Hannover, sendo previamente condicionados a montar em éguas em cio ou manequins artificiais. A VA modelo Botucatu consiste em um tubo rígido, uma mucosa de látex, um copo térmico coletor que protege o ejaculado contra a luz e uma mucosa plástica descartável, a modelo hannover contém os mesmos componentes, porém seu tubo é levemente flexível. A VA foi preenchida com água quente a uma temperatura variável de 50° a 60° C, buscando estabilidade da temperatura interna entre 42° a 45° C, sendo que a temperatura e pressão variavam de acordo com o garanhão. Apesar da discordância entre alguns dos profissionais acompanhados, a vaselina sólida foi utilizada para lubrificar a mucosa plástica interna da VA nas coletas realizadas em Uruguaiana-RS.

Primeiramente os garanhões foram conduzidos até éguas com sinais evidentes de estro para estimulação e exposição do pênis, que então foram lavados desde a glândula até a base utilizando-se apenas água morna. Após a higienização do pênis, os garanhões foram

conduzidos até a égua em cio devidamente contida ou manequim artificial. Após o gesto de salto, o pênis foi desviado lateralmente para que fosse introduzido dentro da VA até que o animal completasse as fases de propulsão e ejaculação (FIGURA 1).

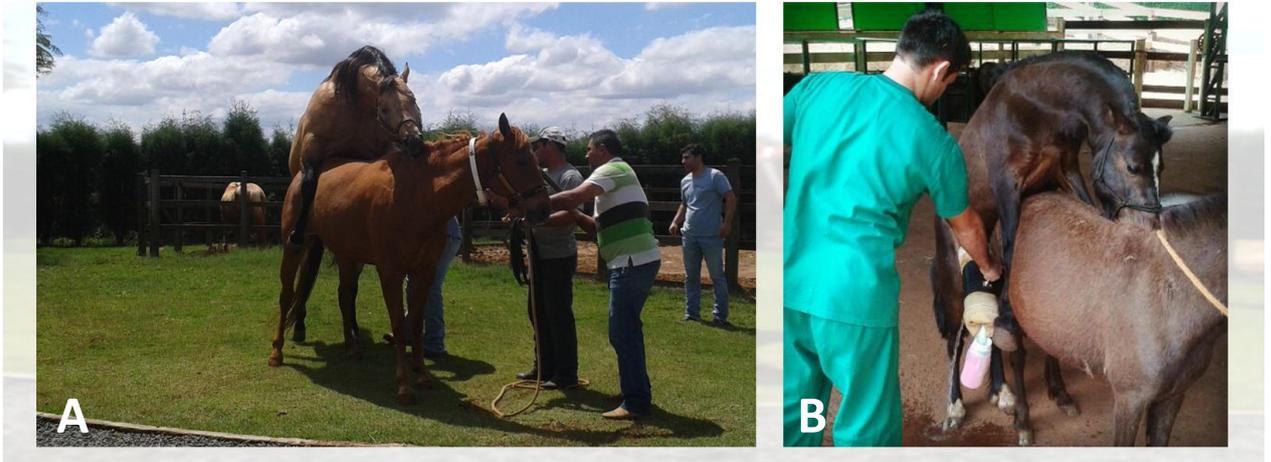


FIGURA 1 - Coletas de sêmen de garanhão da raça quarto de milha (A) e “Miniature Horse” (B) utilizando éguas manequins. Fonte: arquivo pessoal.

2.2 Avaliação espermática

Os exames imediatos do sêmen foram avaliados logo após a coleta do ejaculado baseando-se em suas características macro e microscópicas: cor, volume, densidade, odor, motilidade e vigor. Nas atividades realizadas no CERBEQ, os parâmetros de cinética espermática foram avaliados através de sistema computadorizado de avaliação espermática, modelo Hamilton-Thorne Research, registrando percentagens de espermatozoides com motilidade total, motilidade progressiva e de espermatozoides rápidos, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, velocidade de trajeto, deslocamento lateral de cabeça, frequência de batimento flagelar, linearidade e retilinearidade. Nas atividades realizadas em haras, cabanhas ou centrais de reprodução, apenas motilidade total, motilidade progressiva e vigor foram registrados através de avaliação subjetiva.

Dentre os exames mediatos, foram realizados exames de concentração espermática utilizando-se câmara hematimétrica de Neubauer; avaliação de integridade e função de membrana através de sondas fluorescentes; e morfologia espermática em microscópio de contraste de interferência diferencial (CID).

2.2.1 Avaliação de concentração espermática

Para avaliação de concentração em câmara hematómica de Neubauer, uma alíquota de 10 μL de sêmen foi diluída em 190 μL de formol salina ou água destilada, ou ainda uma gota de sêmen para 19 gotas de água destilada, resultando em uma proporção de 1:20 (sêmen: solução). Após homogeneização, foram utilizados 5 μL de amostra para preencher cada retículo da câmara de Neubauer (FIGURA 2) e então levá-la para avaliação em microscópio óptico, contando-se 5 quadrados de cada retículo e calculando a média aritmética entre os dois lados, desde que não houvesse mais que 10% de variação entre cada um dos lados. O resultado obtido foi expresso em mm^3 , bastando multiplicá-lo por 10^3 para conversão dos dados para mililitros (mL). Este valor também foi reajustado caso o sêmen fosse previamente diluído.

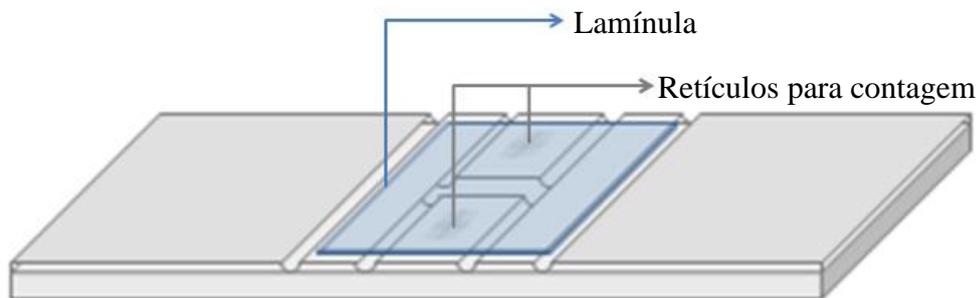


FIGURA 2 - Figura esquemática de câmara de Neubauer para avaliação de concentração espermática. Fonte: arquivo pessoal.

2.2.2 Integridade e função de membrana

A avaliação de integridade e função de membrana foi realizada utilizando-se solução de iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC). A solução trabalho foi feita utilizando-se 1 ml de citrato, 10 μL de formaldeído, 80 μL de IP e 20 μL de DIC. Após homogeneização e pré-aquecimento a 37°C, 20 μL da solução trabalho foram diluídos em 20

μL de sêmen em um ependorf que ficou cerca de 10 minutos em repouso dentro de uma caixa de isopor protegida contra a interferência da luz.

O IP é uma substância polar que não consegue penetrar em membrana íntegra, somente quando ela está lesada, ele se liga ao núcleo do espermatozoide emitindo coloração vermelha. O DIC é uma substância apolar que penetra em membrana íntegra e é metabolizado no citoplasma do espermatozoide, convertendo-se em fluoresceína e emitindo uma coloração verde na célula (PAPA et al., 2015).

Uma gota da solução final foi submetida a avaliação entre lâmina e lamínula em microscópio de epifluorescência, sob aumento de 1000 x com óleo de imersão, onde contou-se 100 células para obtenção de um resultado percentual de espermatozoides com membrana íntegra.

2.2.3 Morfologia espermática

O microscópio de contraste de interferência diferencial (CID) é um equipamento sofisticado, ideal para visualizar espermatozoides não corados. Esse instrumento permite obter informações sobre a densidade óptica exata das amostras, além de ser capaz de observar detalhes que são invisíveis a olho nu. A análise em CID foi realizada colocando-se 10 μL de sêmen diluída em 10 μL de formol salina em lâmina sob lamínula, que foi levada ao microscópio em aumento de 100 x. Cem células foram avaliadas quanto a morfologia de cabeça, peça intermediária e cauda, resultando em uma porcentagem dos defeitos encontrados. Os defeitos de células espermáticas de cada amostra foram registrados e classificados em defeitos maiores - relacionados com a infertilidade, ou defeitos menores.

2.3 Refrigeração de sêmen

Devido a seleção de cavalos ser orientada através do desempenho atlético de garanhões e/ou de sua prole, muitos criadores têm o interesse em produzir animais com qualidade genética de campeões. Normalmente os garanhões de maior valor zootécnico apresentam vários proprietários, o que pode-se chamar de propriedade em condomínio, e estão situados

em grandes centrais de reprodução. Para o cruzamento destes garanhões com éguas estabuladas a grandes distâncias, é necessário que se faça a refrigeração do sêmen para prolongar sua viabilidade. Para isso, o sêmen deve ser diluído e condicionado de forma adequada.

Logo após a coleta, o sêmen foi diluído em meio à base de leite desnatado (Botusêmen®) em uma proporção mínima de duas partes de meio para uma parte de sêmen (2:1; diluente: sêmen), com dose inseminante de 1×10^9 espermatozoides móveis, de forma que a concentração foi de 50×10^6 de espermatozoides por mL. A diluição foi realizada em recipiente plástico próprio para inseminação artificial (Botu-IA®) retirando-se a maior quantidade de ar possível para fechá-lo e transportá-lo.

Para envio da dose inseminante, o frasco de Botu-IA® foi condicionado em uma caixa térmica de isopor chamada Botuflex® contendo um ou dois gelos recicláveis congelados a pelo menos 24 horas de antecedência, havendo a possibilidade de manter o sêmen refrigerado a 15°C por um período de 24 horas (1 gelo) ou a 5°C por um período de 48 horas (2 gelos). O diluente Botusêmen Special® foi utilizado para garanhões que não apresentaram bons resultados de refrigeração do sêmen com diluente Botusêmen®, e Botuturbo® utilizado para elevar os parâmetros de motilidade e vigor 5 minutos antes do ato da inseminação.

2.4 Inseminação artificial

As éguas a serem inseminadas passaram por um controle constante de dinâmica folicular. Os exames foram realizados através de palpação retal para verificação de tônus uterino e estruturas ovarianas; sendo o recurso de ultrassonografia utilizado para classificação de edema endometrial, mensuração de folículos dominantes e identificação de corpo lúteo. A frequência dos exames variou de acordo com a condição de cada égua, considerando-se um crescimento folicular médio de 2 a 3 mm ao dia, o controle foi realizado com o objetivo de induzir ovulação com aplicação de Chorulon® (hCG, Gonadotrofina Coriônica Humana) ou Sincrorrelin® (Deslorelina) no momento em que o folículo atingisse 38 mm de diâmetro médio folicular em éguas Quarto de Milha ou 35 mm de diâmetro máximo em Crioulas, e edema 3. O fenômeno de ovulação ocorreu, geralmente, entre 36 a 48 horas após a indução. Para se antecipar o ciclo estral de éguas em período de transição no início da estação de monta, foram utilizados implantes intravaginais de progesterona (Cronipres®) em oito éguas,

a quais sete tiveram ovulação induzida com Chorulon® e foram inseminadas treze dias após o implante.

Considerando uma viabilidade média dos espermatozoides de 48 horas no trato reprodutivo da fêmea, a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco ou refrigerado foi realizada no momento ou 24 horas após da indução. A IA com sêmen a fresco (FIGURA 3) foi realizada com dose inseminante de 0,5 a 1×10^9 espermatozoides móveis, enquanto a IA com sêmen resfriado foi realizada com no mínimo 1×10^9 de espermatozoides móveis.



FIGURA 3 - Inseminação artificial com sêmen refrigerado realizada em égua Crioula durante o Estágio Curricular Supervisionado em Mecedina Veterinária.

2.5 Congelamento de sêmen

A coleta do sêmen foi realizada com auxílio de VA com filtro acoplado ao copo coletor para separação da porção gelatinosa do ejaculado. Imediatamente após a coleta, eram documentados os parâmetros como peso ou volume (1g de ejaculado corresponde ao volume de 1 mL), concentração espermática através da avaliação com espermiocounter® e motilidade avaliada em lâmina sobre lamínula aquecidas. O número total de espermatozoides (NTE) foi calculado multiplicando-se o peso do ejaculado total pela concentração espermática por mililitro de amostra. O número total de espermatozoides móveis (NTM) foi calculado pela multiplicação entre o NTE e a motilidade.

O primeiro passo do congelamento foi a diluição do sêmem em diluente a base de leite desnatado (Botu-sêmen®) na relação 1:1. Após a primeira diluição, o sêmen foi concentrado através da remoção do plasma seminal utilizando-se mais comumente uma centrífuga. A centrifugação da amostra foi feita em tubos falcon de 50 mL ajustando-se velocidade e tempo em 600 G ou 2200 rpm por 10 minutos. Alguns garanhões apresentaram sêmen mais sensíveis aos efeitos deletérios do processo de centrifugação convencional, nestes casos utilizou-se 1 mL de solução de amortecimento CushionFluid® ao fundo do tubo, ou ainda um filtro de membrana sintética porosa (SpermFilter®) que permitia a passagem do plasma seminal concentrando espermatozoides que seriam ressuspensos em diluente Botucurio®.

Após a concentração por centrifugação, o sobrenadante foi descartado de forma cautelosa e rápida até que restasse somente o pellet de células espermáticas e o mínimo de plasma seminal no fundo do tubo, então acrescentou-se o diluente (Botucurio®) previamente aquecido (37°C) no volume previamente calculado.

Para o cálculo de diluição em meio de congelamento a base de gema de ovo e amido (Botucurio®), estimou-se um padrão de 200×10^6 de células móveis por mL ou 100×10^6 de células móveis por palheta. Portanto, o NTM foi dividido por 100 para se obter o número de palhetas a serem congeladas. Multiplicando-se o número de palhetas por 0,5 (volume da palheta) obteve-se o volume de diluente Botucurio® em mililitros necessários para a diluição.

O sêmem foi envasado nas palhetas e vedado com álcool polivinílico, fazendo-se dois a três movimentos bruscos para deslocar a bolha para a extremidade do algodão da palheta e um movimento mais suave para a extremidade oposta para que a bolha ficasse centralizada.

As palhetas foram estabilizadas por 20 minutos a 5° C em geladeira Minitube®, caixa térmica Botuflex®, Botutainer® ou Equitainer®. Após realizada a curva positiva do congelamento, iniciou-se a curva negativa, onde uma coluna de 6 cm de nitrogênio líquido (N₂) foi depositada em uma caixa térmica de isopor (capacidade de 37 a 45 L) e as palhetas repousaram em uma bandeja de aço inox a uma distância de 3 cm da sua superfície por 20 minutos, sendo a temperatura estimada a essa distância de -30°C. A última etapa do procedimento foi o congelamento propriamente dito, que consistiu na imersão das palhetas na coluna de N₂ (-196°C).

Após o congelamento, uma palheta foi descongelada e analisada para confirmação da eficiência da técnica executada e certificação da qualidade do sêmem para laudo técnico. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, em seguida foram avaliados os parâmetros de motilidade e vigor em lâmina sobre lamínula ou sistema de avaliação espermática computadorizada.

2.5.1 Inseminação artificial com sêmen congelado

Entre os principais benefícios do uso de sêmen congelado utilizado durante o ECSMV, pode-se citar a importação de material genético de outros países e a utilização de sêmen de garanhões mortos recentemente ou a dezenas de anos.

Para IA com sêmen congelado, o controle da dinâmica folicular foi mais rigoroso, pois considera-se que as células espermáticas submetidas a esse processo apresentem uma viabilidade média entre 8 a 12 horas no trato reprodutivo da fêmea, enquanto a viabilidade do oócito apresenta resultados satisfatórios somente entre 6 a 8 horas após ovulação. Os exames foram realizados com intervalo máximo de 6 horas para que as éguas fossem inseminadas logo após a ovulação.

Visando um maior controle do momento da ovulação, a indução foi realizada em todos os casos, utilizando-se Chorulon® ou Sincrorrelin® quando o folículo atingisse um diâmetro médio de 35 mm e um bom edema endometrial, avaliando-se a égua pelo menos duas vezes ao dia a partir da indução. Procurou-se induzir a ovulação o mais próximo das 19 horas, assim o período de ovulação seria entre 7 e 19 horas do terceiro dia a partir da indução, descartando a necessidade de examinar a égua durante a noite ou madrugada.

O descongelamento das palhetas a serem inseminadas foi realizado em banho-maria a uma temperatura de 37°C por 30 segundos. O número de palhetas variou conforme a concentração de espermatozoides na palheta e o histórico de fertilidade da partida de sêmen do garanhão, variando em média de 3 a 5 palhetas. Após o descongelamento, as palhetas foram acopladas em um aplicador de aço inoxidável e uma bainha flexível para inseminação, sendo este inserido na ponta de corno uterino, o mais próximo possível da papila uterotubárica.

Antes do procedimento da IA, a égua foi devidamente contida em tronco de contenção adequado, as fezes foram removidas da ampola retal e seu períneo e vulva foram higienizados com água corrente e clorexidine. Após a higienização, a vulva foi seca com toalha de papel descartável e levemente lubrificada com gel lubrificante íntimo KY® ou mucilagem. A mão do inseminador foi introduzida com a bainha flexível por via vaginal, a cérvix foi localizada com auxílio do dedo indicador para que a bainha flexível fosse introduzida no útero e desviada para o corno ipsilateral ao ovário com folículo pré ovulatório. A outra mão do

inseminador foi introduzida no reto para se certificar de que a bainha estava localizada no local adequado para a deposição do sêmen, em seguida a mão foi retirada do reto e a dose de sêmen depositada. A cada palheta utilizada, retirou-se apenas o aplicador de dentro da bainha flexível para repetição do processo.

2.6 Transferência de embriões

A técnica de transferência de embriões visa acelerar o melhoramento genético, sendo necessário a seleção de doadoras de alto valor zootécnico e possíveis éguas receptoras, nas quais se realiza o controle da dinâmica folicular e sincronização da ovulação. 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. Dessa forma, uma égua pode produzir vários embriões que serão gestados por várias éguas receptoras em uma única estação de monta, aumentando assim disseminação de material genético da doadora sem submetê-la aos riscos e limitações de uma gestação.

A principal limitação da técnica é o fato de a égua ser um animal monovulatório, com capacidade de produzir fisiologicamente apenas um embrião por ciclo estral. Para resolver este problema, diversos estudos já foram realizados com o intuito de se induzir múltiplas ovulações em éguas, contudo a taxa de recuperação embrionária ainda é relativamente baixa quando comparada à espécie bovina.

Durante o ECSMV, as doadoras foram éguas da raça Quarto de Milha selecionadas de acordo com o interesse do proprietário, em sua maioria foram éguas ou matrizes de produtos que conquistaram títulos em provas de conformação, tiro de laço ou corridas de grande importância econômica.

2.6.1 Seleção e controle de receptoras

A seleção de éguas receptoras é um dos pontos cruciais para o sucesso da transferência de embriões, pois estas são as responsáveis por manter um longo período de gestação e parir o

produto tão desejado. Foram utilizadas éguas das raças Crioula e Quarto de Milha (FIGURA 4).



FIGURA 4 - Visualização do lote de éguas selecionadas a serem receptoras de embrião durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária. Fonte: arquivo pessoal.

Após avaliação através de exame físico geral (garupa ampla, boa estatura, conformação de membros, coluna, úbere, tetos, inclinação de vulva), buscou-se preparar pelo menos três éguas receptoras jovens (4 a 5 anos de idade) para cada doadora. Optou-se primeiramente por éguas cujo o histórico reprodutivo era conhecido, embora também tenham sido utilizadas éguas virgens.

Uma vez selecionadas pelo exame físico, as éguas foram examinadas por via retal para identificação de tônus muscular uterino, e exame ultrassonográfico de útero e ovários. No exame ultrassonográfico uterino, optou-se por selecionar éguas sem presença de fluido uterino, reduzindo-se assim a possibilidade de escolher éguas com contaminação uterina que compromettesse a sua fertilidade e eficiência da técnica. A prioridade da seleção foi de animais que tivessem apresentado pelo menos um a dois ciclos estrais na estação, pois no mês de setembro (início da estação de monta), os primeiros ciclos apresentaram-se irregulares. Por essa razão utilizou-se Chorulon® como indutor de ovulação em éguas no período de transição, excluindo-se do programa éguas com ciclos estrais anormais.

O dia da ovulação das receptoras foi listado para que fossem utilizadas éguas que tivessem ovulado no mesmo dia ou até três dias depois da doadora. Assim as receptoras receberam os embriões entre o quarto e sétimo dia após a sua ovulação, ou seja, D4 a D7.

No dia da inovulação, foram selecionadas éguas com maior tonicidade uterina, cérvix firme e fechada avaliadas através de palpação retal; miométrio e endométrio homogêneos, sem edema ou fluido uterino, e identificação de corpo lúteo através de exame ultrassonográfico. Éguas que não apresentavam boas condições uterinas por mais de um ciclo

através do exame de ultrassonografia foram tratadas com P4 (progesterona) três dias antes da inovulação, mantendo o tratamento até os 120 dias de gestação.

O diagnóstico de prenhez foi realizado cerca de cinco a sete dias após a inovulação, sendo as receptoras que apresentaram diagnóstico negativo por dois ciclos consecutivos evitadas nos próximos ciclos do programa.

2.6.2 Controle do estro e da ovulação de receptoras e doadoras de embrião

A utilização de terapia hormonal para sincronização de doadoras e receptoras foi amplamente utilizada, principalmente no início da estação de monta, onde é comum a irregularidade do estro das receptoras. No mês de setembro, o ciclo das éguas se caracterizou por longos períodos de estro, ciclos irregulares e ciclos anovulatórios devido às baixas concentrações de LH (Hormônio luteinizante), e por esta razão utilizou-se o hCG como primeira opção de agente indutor de ovulação.

A sincronização do ciclo estral entre doadoras e receptoras foi realizada através da administração de PGF2 α (Prostaglandina) para indução da luteólise e encurtamento da fase de diestro. A administração de 1 mL de Placentex® (PGF2 α) foi realizada em receptoras que tivessem ovulado a pelo menos quatro dias ou ainda no dia de cada tentativa de recuperação embrionária, além de receptoras escolhidas no meio do diestro (sexto ao décimo dia após ovulação), de acordo com a necessidade. Para doadoras inseminadas com sêmen congelado, a aplicação de PGF2 α nas receptoras foi realizada no mesmo dia, visto que os lavados uterinos foram feitos em D9. A indução da ovulação foi realizada com Chorulon®, Sincrorrelin® ou extrato de pituitária equina, onde o fenômeno ocorreu entre 36 a 48 horas após a administração. Com o intuito de se duplicar a chance de recuperação de um embrião, e por vezes recuperar dois, foi utilizado o protocolo de indução de dupla ovulação com baixa dose de deslorelina. O protocolo proposto por Nagao e colaboradores (2012) consistiu na aplicação de 100 μ g de acetato de deslorelina a cada 12 horas quando se encontrou um folículo de no máximo 25 mm e outro com no mínimo 20 mm até que ambos atingissem 33 mm ou o maior deles 38 mm, nesta condição a ovulação foi induzida com hCG e após 24 horas da indução as éguas foram inseminadas.

2.6.3 Recuperação embrionária

Considerando a passagem do embrião do oviduto até o útero entre os dias cinco e seis após a ovulação, os lavados uterinos para tentativa de coleta de embrião foram realizados no dia sete. Nos casos de éguas inseminadas com sêmen congelado ou éguas idosas, o lavado foi realizado no dia nove. Todo o material utilizado no procedimento que entrava em contato com embriões foi previamente esterilizado em autoclave.

Foram acompanhados 21 procedimentos de lavados uterinos para coleta de embriões. Em todos os casos, a doadora foi contida em tronco de contenção adequado, as fezes foram removidas da ampola retal, a cauda foi enfaixada e amarrada e o períneo lavado com água corrente e detergente. As coletas foram realizadas pelo método não cirúrgico por via transvaginal, em sistema fechado de única via.

Após calçar a mão com luva de palpação estéril, o veterinário segurou a sonda na extremidade do balonete e com a outra mão a extremidade externa. Primeiramente a sonda foi preenchida com solução de ringer com lactato para que não fosse introduzido ar no útero da doadora. Após a passagem da sonda pela cérvix e enchimento do balonete com 40 mL de ar com seringa descartável, cerca de 1 a 1,5 L de solução foi infundido sob pressão para o interior do útero (FIGURA 5A). Neste momento, a sonda foi fechada com uma pinça hemostática o copo coletor com filtro foi acoplado na sua extremidade externa. O copo coletor com filtro foi acoplado com o suspiro ainda aberto, o fluxo da sonda liberado através da abertura da pinça hemostática, e assim que o nível de solução de lavado atingiu cerca de 60% da capacidade do copo coletor, o suspiro foi fechado para manter um sistema de vácuo que estabilizou a coluna de ringer lactato no filtro durante o lavado. Enquanto a solução passava pelo filtro, o útero foi massageado para que ela entrasse em contato com todas as porções da parede uterina (FIGURA 5B). O processo de infusão e retirada de solução foi repetido quatro vezes para cada procedimento, e após isso, o balonete foi desinflado para que a sonda fosse retirada do útero e a solução remanescente na sonda transferida para o filtro. A seguir, o copo foi encaminhado rapidamente para o laboratório, onde o filtro foi lavado com solução de ringer com lactato para clarear a solução e facilitar o rastreamento do embrião. Havendo ou não recuperação embrionária, foi realizada administração de $\text{PGF2}\alpha$ na doadora após o lavado uterino.



FIGURA 5 – Procedimento de lavagem intrauterina em égua doadora para recuperação de embrião durante o ECSMV. A) Infusão de Ringer com Lactato sob pressão para o lúmen uterino; B) Massagem do útero via palpação retal e refluxo do líquido passando em filtro contido no copo coletor de embrião. Fonte: arquivo pessoal.

2.6.4 Rastreamento e avaliação embrionária

O conteúdo presente no filtro foi transferido para uma placa de petri (100x200) previamente riscada na porção inferior para facilitar sua leitura em microscópio estereoscópio em aumento de 10 a 20 e 40x. Com auxílio de uma seringa de 20 mL contendo solução de ringer com lactado, o filtro foi lavado mais uma vez e o conteúdo escoado para a placa. Após a identificação do embrião, este foi aspirado com uma palheta de 0,25 mL acoplada a seringa de insulina e depositado em uma placa de petri menor (35x10) contendo meio de manutenção TQC Holding Plus®. Foram recuperados 13 embriões, o que corresponde a uma eficiência de 61% em relação aos 21 lavados uterinos acompanhados durante o ECSMV.

Após realizada a varredura completa da placa maior, classificou-se o (s) embrião (ões) contido (s) na placa menor de acordo com estágio de desenvolvimento (FIGURA 6) e qualidade (FIGURA 7).

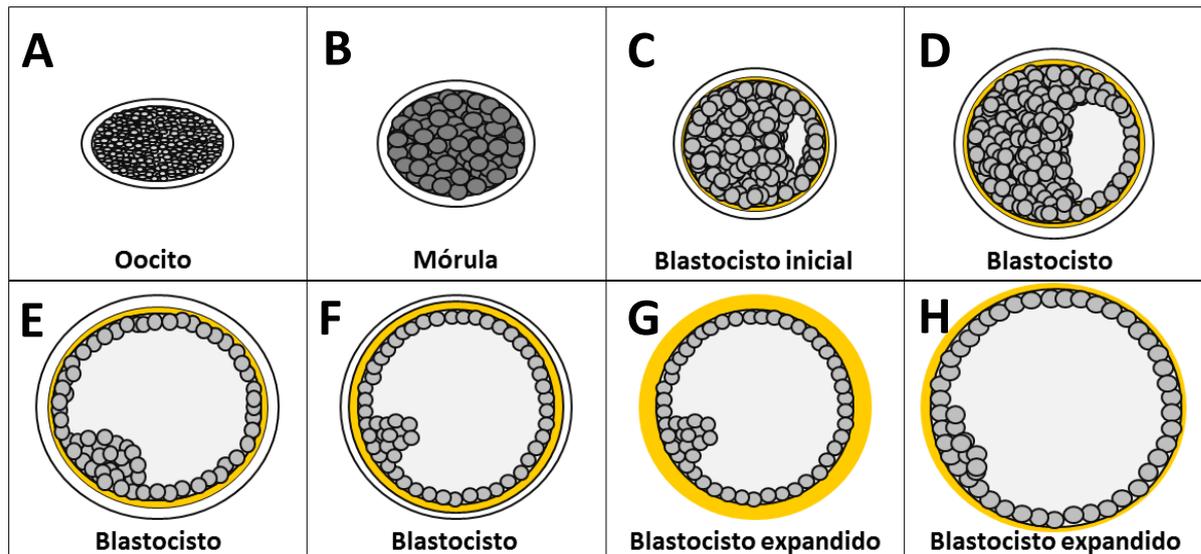


FIGURA 6 - Desenho esquemático da morfologia de oócito e estágio de desenvolvimento embrionário. A) oócito; B) Mórula compacta; C) Blastocisto inicial; D) Blastocisto; E) Blastocisto; F) Blastocisto com cápsula formada e zona pelúcida delgada; G) Blastocisto com cápsula e extrusão da zona pelúcida; H) Blastocisto expandido. Fonte: arquivo pessoal.

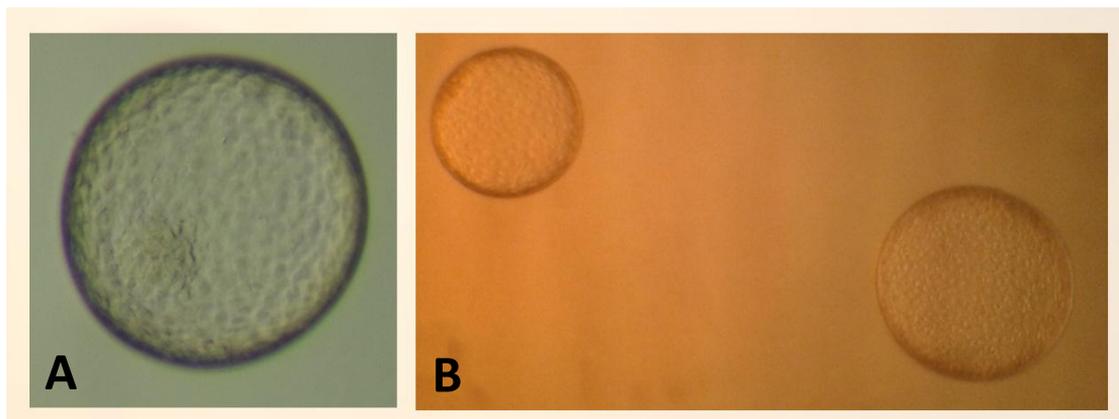


FIGURA 7 - A) Blastocisto expandido grau 1; B) Blastocistos expandidos grau 1 originados do protocolo de indução de dupla ovulação com baixa dose de deslorelina. Fonte: arquivo pessoal.

Após a classificação do embrião, os mesmos foram lavados em 11 gotas de meio de manutenção (previamente aquecido a 37°C) em placa de Petri para a eliminação de impurezas antes da sua inovulação. A cada gota, o embrião foi aspirado e espirado três vezes, e a cada três gotas, a palheta foi trocada. Após a lavagem do embrião, pronto para inovulação, o mesmo foi transferido para outra placa ainda menor (28x08) preenchida com meio de manipulação aquecido.

2.6.5 Inovulação

Para inovulação, o embrião foi envasado em palheta de 0,25mL pelo método de aspiração utilizando uma seringa de insulina. Primeiramente aspirou-se uma coluna de líquido para evitar que o embrião ficasse retido no algodão da palheta, depois aspirou-se uma bolha de ar, em seguida uma nova coluna de líquido contendo o embrião, uma segunda bolha de ar e uma terceira coluna de líquido (FIGURA 8). Após o envase, a palheta foi acoplada ao aplicador que foi introduzido na receptora.

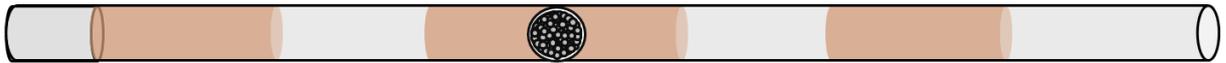


FIGURA 8 - Desenho esquemático da disposição das colunas de líquido e de ar com embrião pronto para inovulação em palheta de 0,25 mL. Fonte: arquivo pessoal.

Após a seleção da receptora, conforme relatado no item 2.8.1, esta foi devidamente contida no tronco com sua cauda enfaixada, e períneo e vulva devidamente higienizados pelo auxiliar. A mão do veterinário foi enluvada de forma estéril, a palheta contendo o embrião foi introduzida na bainha e ajustada ao aplicador, que foi envolto por uma camisa sanitária para evitar carreamento de contaminação vaginal para o útero. O dorso da mão enluvada foi lubrificada com gel lubrificante íntimo (KY®) para que fosse introduzida por via vaginal. O dedo indicador serviu como guia para que a extremidade do aplicador ultrapassasse a cérvix, neste momento a camisinha sanitária foi rompida a bainha introduzida até o fundo do corpo uterino e o embrião inovulado.

Após a inovulação, todas as receptoras foram tratadas com 20 mL de sulfametoxazol trimetoprima (Borgal®) e 10 mL de flunixin meglumine por via endovenosa; e 4 a 6mL de P4 - 300 mg intramuscular.

2.6.6 Preservação e transporte de embriões por curto período de tempo

No estado de São Paulo, tem se tornado comum a venda de embriões em leilões. Dessa forma, éguas doadoras hospedadas em centrais de reprodução produzem embriões que podem ser enviados para diversas regiões do estado. Em outras ocasiões, dentro da rotina de transferência de embriões, não se têm éguas em condições satisfatórias para assumir a função de receptora de um embrião de grande valor, e para não se perder o valioso tempo de um ciclo estral na estação de monta, este embrião pode ser enviado para uma central de receptoras.

Para estes casos, é necessário que se possibilite o transporte e preservação de embriões para que estes cheguem viáveis até a receptora.

Durante o ECSMV, dois embriões foram recuperados e enviados para uma central de receptoras localizada em Botucatu. Desde a lavagem e recuperação até o rastreamento e avaliação do embrião, o procedimento foi realizado conforme já descrito neste relatório.

Para preservação e transporte do embrião, este foi colocado submerso em meio de manutenção TQC Holding Plus® previamente aquecido a 37°C em um tubo falcon de 15 mL. O tubo foi acondicionado em uma caixa térmica com gelo reciclável adaptada (FIGURA 9). O espaço remanescente em torno do tubo foi preenchido com papel toalha para minimizar os riscos de traumas mecânicos durante o transporte. A temperatura interna da caixa se manteve entre 5 e 15 °C, e os embriões foram preservados por cerca de 2 horas até a sua chegada na central de receptoras para a inovulação, que foi realizada por outro profissional.

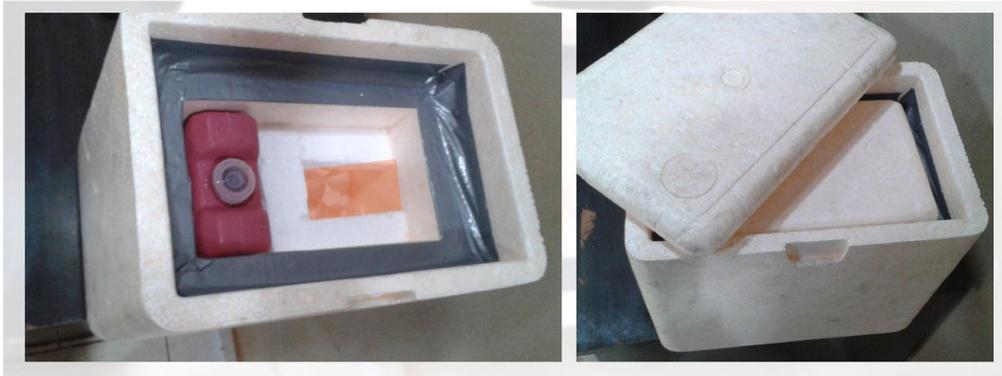


FIGURA 9 - Caixa térmica adaptada para preservação e transporte de embrião equino por curto período de tempo. Fonte: arquivo pessoal.

3- DISCUSSÃO

3.1 Fisiologia reprodutiva do garanhão

A produção e ejaculação de espermatozoides viáveis é imprescindível para a reprodução e perpetuação natural da espécie, e para isso é necessário que o sistema reprodutivo do macho funcione adequadamente. Os testículos são órgãos pares que possuem basicamente duas funções reprodutivas: espermatogênese e secreção de hormônios para o funcionamento correto do epidídimo, das glândulas sexuais acessórias e do comportamento do garanhão (AMANN, 2011). A espermatogênese depende do funcionamento correto do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, e os principais hormônios envolvidos na fisiologia reprodutiva do macho são: hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) produzido pelo hipotálamo; hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) produzidos pela hipófise; andrógenos e estrógenos produzidos por células de leydig; e inibina produzidos por células de sertoli (ROSER, 2000). A fertilidade e função reprodutiva, tanto do garanhão quanto da égua, apresentam maior eficiência durante o período de maior incidência solar (verão) pois a captação de luz pela retina inibe a produção de melatonina pela glândula pineal, um hormônio que possui forte relação com o fotoperíodo e queda da eficiência reprodutiva pela inibição da síntese de GnRH no hipotálamo (MINNEMAN; WURTMANN, 1975).

O hipotálamo está conectado diretamente à hipófise através de um sistema porta hipofisário, onde o sangue segue o fluxo no sentido hipotálamo-hipófise. Sob estimulação neural adequada, o hipotálamo secreta GnRH de forma pulsátil, um hormônio peptídeo que resulta na estimulação das células secretoras de gonadotrofinas da adenohipófise: LH e FSH. Dois hormônios gonadotróficos que estimulam os testículos a produzirem esteroides e espermatozoides, havendo grandes diferenças nas suas concentrações conforme a estação do ano. As células de leydig, localizadas nos túbulos seminíferos dos testículos, secretam os hormônios esteroidais e as células de sertoli secretam inibina e ativina. A inibina é um hormônio glicoproteico produzido pelas células de sertoli e túbulos seminíferos que atua conjuntamente com a testosterona na modulação da secreção de FSH. A prolactina é produzida pela glândula pituitária, consiste em um hormônio supressor da produção de melatonina e ainda controla a expressão de receptores de LH nos testículos, por isso é

encontrada em maiores concentrações durante a estação reprodutiva (GERLACH; AURICH, 2000).

As células de leydig ainda secretam ocitocina no fluido intersticial, o que aparentemente facilita a contração rítmica dos túbulos seminíferos e ducto deferente para evacuação do esperma (ROSER, 2000), pensando nisso, durante o ECSMV, 2 mL de ocitocina foram administrados por via endovenosa em garanhões com dificuldades ejaculatórias 10 minutos antes de uma nova tentativa de coleta.

As secreções pulsáteis de LH estimulam a produção de testosterona e estrógeno pelas células de leydig, e de inibina, ativina e proteína ligadora de andrógenos (ABP) pelas células de sertoli (PAPA et al., 2015). A testosterona é drenada pelo sangue venoso testicular atingindo o eixo hipotalâmico-hipofisário e ativando o sistema de retroalimentação negativo. Altas concentrações de testosterona modulam a produção de GnRH e LH. Em contrapartida, quando baixos níveis de testosterona atingem o hipotálamo ocorre aumento da secreção pulsátil de GnRH, conseqüentemente aumento de LH e estimulação rápida de células de leydig para secretar testosterona. Por esta razão, o uso de anabolizantes esteroidais em cavalos atletas altera o equilíbrio e perturba profundamente a função reprodutiva. Além disso, a testosterona ainda pode ser convertida em estradiol no hipotálamo ou adenohipófise (Roser, 2000), que atua na maturação de espermatozoides, desenvolvimento das células de leydig e modulação da esteroidogênese (PAPA et al., 2015).

Embora a secreção de FSH também seja estimulada por GnRH, os mecanismos de controle são distintos, onde a síntese de FSH é muito menos dependente de GnRH do que o LH. FSH parece atuar exclusivamente nas células de sertoli dentro dos túbulos seminíferos, produzindo inibina e ativina, que atuam na adenohipófise suprimindo e estimulando a secreção do próprio FSH (ROSER, 2000).

Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos, em seguida são depositados no mediastíno testicular, preenchido pela rede testicular, que os conduz até a cabeça do epidídimo, onde são levados pelo ducto eferente até a região do corpo e cauda do epidídimo pelos ductos epididimários, são maturados na cauda do epidídimo e conduzidos pelo ducto deferente até a uretra para receber os fluidos das glândulas sexuais acessórias no momento da ejaculação. O epitélio seminífero é sensível a diversos fatores externos, bem como elevação de temperatura, uso de anabolizantes esteroidais, exposição a metais como cádmio, exposição a raios X, álcool e doenças infectocontagiosas, podendo causar uma resposta degenerativa no epitélio seminífero acarretando na redução da fertilidade (JOHNSON, et al., 1997) em variados níveis, sendo reversíveis ou não.

O sucesso de uma coleta de sêmen é fundamental em um programa de inseminação artificial, e depende basicamente de três mecanismos: ereção, emissão e ejaculação. A ereção do pênis ocorre quando o garanhão se excita por via de mecanismos neuroendócrinos através de estímulos sensoriais proporcionando a rigidez necessária para que seu órgão copulador penetre na vagina da égua, essa rigidez é alcançada pela contração dos músculos extrínsecos (isquiocavernoso, bulboesponjoso e uretral) comprimindo as veias profundas e dorsais do pênis contra o arco isquiático, impedindo que o sangue venoso retorne dos corpos cavernosos do pênis (ROSER, 2000). A emissão é causada por estímulos simpáticos que transportam os espermatozoides presentes no epidídimo e vaso deferente, juntamente com secreções das vesículas seminais e próstata, por contração ativa da musculatura que circunda o epidídimo, o ducto deferente e vesículas seminais (HAFEZ E.; HAFEZ B., 2004) até a uretra. A ejaculação é efetuada por estimulação parassimpática, consistindo em uma série de contrações fortes de forma pulsátil dos músculos extrínsecos de modo que jatos sucessivos de sêmen são lançados ao longo da uretra. A próstata excreta um líquido aquoso na uretra pélvica, depois é expelida a fração rica em espermatozoides provinda do epidídimo e fluidos prostáticos e bulbouretrais, e por último, mas nem sempre presente, a fração pós espermática conhecida como “gel” derivada das glândulas vesiculares. O pênis retorna ao seu estado flácido após a ejaculação, quando se contraem as artérias devido a impulsos simpáticos e a pressão sobre as veias é aliviada pelo relaxamento dos músculos extrínsecos do pênis (ROSER, 2000).

Dentre os fatores que alteram a função reprodutiva, ainda pode-se citar o fator sazonalidade. Em 1974, Berndtson e colaboradores comprovaram a redução da concentração plasmática de testosterona na estação não reprodutiva, e aparentemente as glândulas sexuais acessórias também reduziram sua atividade neste período, pois o volume do ejaculado foi menor quando comparado com a estação reprodutiva. Apesar de ser possível coletar sêmen durante todo o ano, os efeitos da variação sazonal incluem ainda a redução na motilidade e no número total de espermatozoides por ejaculado, necessidade de maior tempo para reação de interesse sexual, maior número de montas por ejaculado e maior aglutinação espermática (HAFEZ E.; HAFEZ B., 2004). Com isso, o controle do fotoperíodo artificial pode ser considerado uma ferramenta a ser utilizada para otimizar o ciclo reprodutivo do garanhão, o aumento do período de luminosidade altera o comportamento sexual e aumenta a circunferência testicular (CLAY et al., 1987), que está diretamente relacionada com a capacidade produtiva de células espermáticas.

A puberdade pode variar entre raças, mas geralmente inicia por volta dos 2 anos de idade (HAFEZ E.; HAFEZ B., 2004), e a função reprodutiva máxima do garanhão é

alcançada por volta de 2 a 4 anos, sendo que dos 4 aos 20 anos de idade não se observa alterações significativas na espermatogênese (ROSER, 2000). O início da puberdade pode ser indicado através da avaliação do sêmen do garanhão, principalmente pela presença ou não de células redondas durante a avaliação de morfologia espermática. Em geral, nos equinos da raça miniature horse avaliados durante o ECSMV algumas células redondas ainda estavam presentes no ejaculado de animais com cerca de 3 a 4 anos de idade, corroborando com os conceitos supracitados.

Com tudo, pode-se dizer que a fertilidade do garanhão é um conceito multifatorial, pois varia de acordo com a raça, idade, sazonalidade, temperatura e manejo; e o entendimento da fisiologia reprodutiva é imprescindível para o sucesso da eficiência reprodutiva do macho em uma estação de monta.

3.2 Coleta de sêmen

A coleta de sêmen é uma prática amplamente utilizada na reprodução equina, pois esta biotécnica otimiza o uso do garanhão com a possibilidade de inseminação de um maior número de éguas por ejaculado, minimiza os riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, viabiliza o uso de diluentes e incremento das taxas de prenhez, possibilita preservação e transporte de sêmen para longas distâncias sem a necessidade de deslocar o animal e ainda permite a avaliação do sêmen de garanhões com suspeita de infertilidade. Geralmente, a coleta é realizada com o auxílio de uma VA que está disponível no mercado em vários modelos. Durante o ECSM, foram utilizados principalmente o modelo Botucatu, mas também o modelo Hannover.

O comportamento sexual do garanhão é provocado por estímulos visuais, auditivos, olfativos e táteis na presença de uma égua em cio. Éguas em estro, chamadas de manequins, podem ser devidamente contidas para excitação e coleta de sêmen de garanhões, porém ainda existem riscos de acidentes com os animais ou profissionais durante este procedimento. Visando minimizar estes riscos, Richardson e Wenkoff (1976) relataram a utilização de manequim artificial, bem como o treinamento do garanhão para este fim. Desde então, a prática vem se tornando cada vez mais comum comercialmente, inclusive estimulando estudos que relatam a influência da presença da égua em estro nas características físicas do ejaculado durante a coleta em manequim artificial (SILVA FILHO, 1999). Biotécnicas de

reprodução vêm sendo aplicadas na raça crioula mais recentemente em relação à outras raças no Brasil, por esta razão, estudos do comportamento sexual do garanhão desta raça durante a coleta em manequim visam tornar o manejo o mais próximo possível do natural, lembrando que um manejo inadequado pode ocasionar acidentes que prejudiquem o comportamento sexual dos animais ou levar a lesões que comprometam a fertilidade (SOUZA et al., 2010).

A área para coleta deve ser ampla, limpa, sem distrações, o piso deve ser plano de superfície antiderrapante e de preferência próxima ao laboratório de análise de sêmen, fatores como a temperatura ambiente e do interior da vagina são fundamentais para o sucesso do procedimento (HURTGEN, 2000). A coleta pode ser feita com o auxílio de camisinha, indução farmacológica, manipulação manual, coleta em estação com auxílio de VA, coleta da cauda do epidídimo ou pelo método mais convencional que é a utilização de VA e manequim.

Indiferente do modelo de VA empregado, a sua temperatura interna deve se manter entre 44° a 48°C (HURTGEN, 2000; BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2011), embora tenha sido preconizado a temperatura de 42° a 45°C nas coletas durante o ECSMV. O diâmetro interno da VA deve ser ajustado com a adição de água entre 50° e 55°C e ar de acordo com o garanhão. Para garanhões com dificuldades ejaculatórias, pode ser necessário a elevação da temperatura interna até 50°C (HURTGEN, 2000), ou ainda até 60°C, além da administração endovenosa de ocitocina, álcool na ampola retal e utilização de compressa morna na base do pênis, conforme observado em Botucatu. O uso de lubrificante minimiza o atrito do pênis com a mucosa plástica interna da VA durante os movimentos de fricção, mas ainda é uma prática que apresenta divergência de opinião entre técnicos, inclusive entre os profissionais acompanhados. Durante o ECSMV, foi utilizado vaselina sólida para lubrificar a entrada da VA apenas nas coletas realizadas em Uruguaiana-RS. A utilização de vaselina sólida também é relatada por Silva Filho e colaboradores (1999), pois tem efeito negativos mínimos à motilidade espermática *in vitro* sendo indicada, juntamente com a glicerina, como um dos lubrificantes de escolha para coleta de sêmen (GOLDENBERG; WHITE, 1975). Samper e Garcia (2008) avaliaram 4 lubrificantes comerciais declarados não espermicidas e seu efeito na motilidade espermática em comparação com um grupo controle. Dentre os 4 produtos, apenas o uso de Pre-Seed® Equine (Ing-Fertility, Valleyford, WA) não apresentou perdas significativas de motilidade avaliada em temperatura ambiente aos 15 minutos, 3 horas e 6 horas após a coleta, bem como após refrigeração por 24 e 48 horas em Equitainer® em relação ao grupo controle. Mais recentemente, um estudo em humanos foi realizado e também indica a utilização de lubrificante Pre-Seed® (Valleyford, WA) para a coleta de sêmen sem o comprometimento da avaliação espermática (motilidade, motilidade progressiva, morfologia),

além de que todos os pacientes relataram preferência no uso do lubrificante durante o procedimento de coleta (ABADIE; LAMBERT, 2014). Possivelmente o efeito deletério de lubrificantes no ejaculado seja ocasionado pela hiperosmolaridade do meio e alteração de pH (SAMPER; GARCIA, 2008). Imediatamente após a coleta, o sêmen deve ser transportado para o laboratório de análise de sêmen, todo o material que entra em contato com o sêmen deve estar entre 37° a 38°C (BRIKSON et al., 2011) ou 35° a 37° (HURTGEN, 2000).

A coleta de sêmen é o ponto de partida para um programa de inseminação artificial, transferência de embriões, ou criopreservação de espermatozoides, por isso é de suma importância que o médico veterinário conheça seus princípios básicos e alternativas de suporte frente a eventuais transtornos ou particularidades de ganhões em uma estação de monta.

3.3 Congelamento de sêmen

É notório o aumento do interesse pela utilização de sêmen congelado por parte de criadores de equinos, o que impulsiona cada vez mais o desenvolvimento da técnica através de pesquisas voltadas a superar seus fatores limitantes. A criopreservação do sêmen, além de fácil aplicação a campo, permite inúmeras vantagens como a diminuição do custo de produção de animais geneticamente superiores; utilização de ganhões que tenham perdido sua capacidade reprodutiva por injúrias ou morte; otimização do uso do reprodutor com um maior número de fêmeas; prevenção de doenças sexualmente transmissíveis; transporte de material genético viável em longas distâncias; e principalmente armazenamento e preservação de sêmen por tempo indeterminado. No entanto, existem algumas desvantagens que incluem a necessidade de controle mais intensivo do momento da ovulação e baixa fertilidade em relação à utilização de sêmen fresco e resfriado; alto custo com equipamentos e materiais adequados; e grande variação individual na resistência a criopreservação entre ganhões.

O relato do primeiro protro nascido de sêmen congelado é oriundo de égua inseminada com espermatozoides coletados da cauda do epidídimo (BARKER; GANDIER, 1957). Desde então, a maioria dos estudos de congelamento foram conduzidos com sêmen ejaculado. O congelamento de sêmen equino varia individualmente e é um dos fatores mais importantes para a determinação da taxa de prenhez, por esta razão acredita-se que o segredo para o sucesso da técnica ainda seja o próprio indivíduo (SIEME; HARRISON; PETRUNKINA,

2008). O primeiro passo para o desenvolvimento da técnica é a coleta do sêmen, processo já descrito no item 3.2 deste relatório.

Um dos fatores que podem interferir na qualidade espermática pós refrigeração é a presença de plasma seminal. Altas proporções de plasma já foram descritas como nocivas à motilidade espermática pós refrigeração (BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000), assim como também já se constatou não haver diferenças significativas entre motilidade de sêmen resfriado contendo 5% de plasma ou sêmen não centrifugado (JASKO, 1992), talvez as variações individuais na congelabilidade do sêmen equino estejam relacionadas a composição do plasma seminal de cada garanhão. Essas diferenças podem ter origem genética, e a seleção de animais aptos ao congelamento poderia ser uma possibilidade (SIEME; HARRISON; PETRUNKINA, 2008). Em todos os processos de congelamento acompanhados durante o ECSMV, o ejaculado foi diluído na relação mínima de 1:1 e centrifugado a 600 G por 10 minutos para remoção total ou redução das proporções de plasma. Alguns autores consideram uma perda aproximada de 20% de espermatozoides durante o processo de centrifugação e rediluição (WRENCH et al., 2010). Outras técnicas de concentração de espermatozoides também poderiam ter sido utilizadas (ALVARENGA; MAGALHÃES; PAPA, 2010; ALVARENGA et al., 2012).

Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser desprezado e o pellet ressuspendido em diluente de congelamento previamente aquecido e calculado. Durante o ECSMV, foi realizada a avaliação de concentração espermática inicial do sêmen para estimativa de espermatozoides móveis totais do ejaculado, em seguida o número encontrado foi dividido pelo número de células projetadas por palheta de 0,5 mL, geralmente 100×10^6 /palheta, e o resultado final representou o volume de diluente (Botucio®) que deve ser acrescido ao sêmen. Um método diferente de determinação do volume do diluente de congelamento foi descrito por Osório e colaboradores (2008), onde o pellet obtido pela centrifugação é diluído na proporção 1:1 para análise de concentração e posterior ajuste da diluição para a concentração de células desejadas por palheta. Garanhões também apresentam variações individuais referentes a criotolerância com diferentes diluentes, mas um recente estudo obteve resultados que sugerem minimizar os efeitos desta variação (RODRIGUES et al., 2011). Realizar um teste de congelamento com diferentes diluentes antes de iniciar a temporada de congelamento de um garanhão pode ser uma boa alternativa para se aumentar as chances de sucesso e fertilidade do sêmen a ser preservado.

O envase foi realizado em palhetas com volume de 0,5 mL nos procedimentos acompanhados, pois além de serem necessárias muitas palhetas de 0,25 mL para se atingir

uma dose inseminante em éguas, parâmetros de cinética espermática foram inferiores quando estas foram utilizadas. Mais recentemente, com a vantagem de minimizar os riscos de dano pela manipulação e reduzir uma dose inseminante a um único compartimento, Lorenzoni e colaboradores (2013) relataram que criotubos de 4 mL podem ser uma alternativa para o uso de utilização de sêmen congelado em equinos, já que não foram constatadas diferenças estatísticas significativas nos parâmetros espermáticos pós descongelamento comparados com palhetas de 0,5 mL (MAZIERO, 2013).

Após o envase, as palhetas de sêmen foram levadas a compartimentos de resfriamento a 5°C (geladeira Minitube®, caixa térmica Botuflex®, Botutainer® ou Equitainer®) por um período de 20 minutos. Comparando sêmen congelado com resfriamento prévio a 5°C e sem resfriamento, alguns estudos comprovam a importância desta etapa na longevidade espermática pós descongelamento (FÜRST et al., 2005; LORENZONI; ARRUDA; RODRIGUES, 2013). A vantagem de um tempo de resfriamento curto é óbvia, mas nem sempre é possível coletar e congelar o sêmen no mesmo local. Nestas circunstâncias, o sêmen pode ser refrigerado e transportado a 5°C por um período de até 18 horas sem perdas significativas na sua fertilidade, apesar da queda nos parâmetros de motilidade total e progressiva (BACKMAN et al., 2004). Em experimento realizado comparando o efeito dos diferentes compartimentos de refrigeração na mesma partida de sêmen, observou-se diferenças nos parâmetros de cinética espermática pós descongelamento de 4 garanhões (dados não publicados), provavelmente as taxas de resfriamento sejam distintas e a composição individual do sêmen seja mais adequada a alguns compartimentos em relação a outros.

Após o resfriamento, as palhetas repousaram em uma bandeja de aço inox a uma distância de 3 a 6 cm da superfície de uma coluna de 6 cm de N₂ em uma caixa térmica de isopor por 20 minutos a -30°C. Em seguida as palhetas foram submersas N₂ (-186°C), acondicionadas em raques e estocadas em botijão de N₂ com a mesma metodologia relatada por Oliveira, Rubin e Mondino (2014). O descongelamento de uma palheta a 37°C por 30 segundos foi procedido para avaliação do sêmen e certificação da eficiência da técnica realizada. Descongelamento a temperaturas superiores e menor tempo também podem ser utilizadas, porém 46°C por 20 segundos são mais rotineiramente adotadas na metodologia de outros trabalhos (ALVARENGA et al., 2010; MONTEIRO, et al., 2013; MAZIERO et al., 2013).

Mesmo com novos estudos que tendem a diminuir o efeito da variação individual na congelabilidade do sêmen equino (ALVARENGA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2011;

OLIVEIRA; RUBIN; MONDINO, 2014), nota-se ainda que este é um dos fatores que dificulta a padronização de um protocolo para comparação de resultados entre diferentes trabalhos e grupos de pesquisa. Por esta razão, testes de congelamento com frações de uma mesma partida de sêmen utilizando diferentes diluentes, crioprotetores, concentrações, curvas de resfriamento e temperaturas de descongelamento antes do início da temporada de congelamento de um garanhão podem colaborar com os resultados de fertilidade do sêmen congelado no período de sua utilização.

4- CONCLUSÕES

Com base na experiência do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, foi possível observar a importância da utilização de biotécnicas no manejo reprodutivo equino para viabilizar e intensificar a produção de animais com interesse comercial, dessa forma a reprodução equina se mostra uma área com grande potencial de empregabilidade para médicos veterinários. Além disso, o estágio superou as expectativas em relação às oportunidades de acompanhar a rotina de profissionais renomados, grandes pesquisadores e pós-graduandos da área de reprodução equina. Propiciou uma satisfatória experiência prática e visão crítica tanto no âmbito científico quanto no mercado de trabalho autônomo. O conhecimento adquirido durante a graduação, tanto na universidade quanto em estágios extracurriculares, foi de grande valia durante o desenvolvimento das atividades do estágio curricular, principalmente como embasamento para busca de novos conceitos e atualizações para aprofundar ainda mais o conteúdo, proporcionando confiança para entrar no mercado de trabalho ou carreira acadêmica após a conclusão do curso. O convívio com diferentes pessoas e culturas contribui não só com o desenvolvimento profissional, mas também desenvolve a formação do caráter pessoal através das novas experiências. Assim, o estágio proporcionou um crescimento acadêmico, profissional e pessoal como futuro médico veterinário, além da certeza do interesse pela área escolhida e motivação para seguir buscando novas oportunidades de aperfeiçoamento.

REFERÊNCIAS

ABADIE, J. M.; LAMBERT, H. B. Effects of lubricants and wash solutions on semen evaluation in a fertility clinic laboratory. **Lab Medicine**. v. 45, p. 116 – p. 119, 2014.

ALVARENGA, M. A., PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n.6, 2009.

_____. MELO, C. M.; MAGALHAES, L. C. O.; Papa, F. O. A new method to concentrate equine sperm. **Animal Reproduction Science**. v. 121, p. 186-187, 2010.

_____. PAPA, F. O.; CARMO, M. T.; KIEVITSBOSCH, T; CASTRO CHAVES, M. M.; RAMIRES NETO, C. Methods of concentrating stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 32, p. 424 – 429, 2012.

_____.; PAPA, F. O.; LANDIN-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 105 – 113, 2005.

AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E, Varner, D. D. **Equine Reproduction: Second Edition**. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. p. 881 – 908.

BACKMAN, T.; BRUEMMER, J. E.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **American Society of Animal Science**. v. 82, p. 390 – 694, 2004.

BARKER, C. A.; GANDIER, S. C. C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v. 21, p. 47 – 51, 2000.

BERNDTSON, W. E.; PICKETT, B. W.; NETT, T. M. Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. **Journal of Reproduction & Infertility**. v. 39, p. 115 – 118, 1974.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K; HARTMAN, D. Semen collection and artificial insemination with fresh semen. In: BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K; HARTMAN, D. **Manual of Equine Reproduction, Third Edition**. China: Mosby Elsevier, 2011. p. 160 – p. 175.

BRINSKO; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**. v. 54, p. 129 – 136, 2000.

CLAY, C. M.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: testicular size, seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**. v. 64, p. 517 – 525, 1987.

GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. **Animal Reproduction Science**. v. 58, p. 197 – 213, 2000.

GOLDENBERG, R. L.; WHITE, R. The effect of vaginal lubricants on sperm motility in vitro. **Fertil Steril**. v. 26, p. 872 – 873, 1975.

GUERRA, P. Riqueza equina do Brasil. Página Rural, São Paulo, ago, 2003. Seção Artigos. Disponível em: < <http://www.paginarural.com.br/artigo/675/riqueza-equina-do-brasil>>. Acesso em 14 dez. 2015.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Equinos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal, 7ª edição**. Barueri: Manole, 2004. p. 193 – 218.

HURTGEN, J. P. Semen collection in stallions. In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination, Second Edition**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 33 – 39.

JASKO et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 37, p.1241–1252, 1992.

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

LIMA, R. A. S; SHIROTA, R; BARROS, G. S. C; Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Centro de estudos avançados em economia aplicada**, ESALQ-USP, 2006.

LORENZONI, S. L. G.; ARRUDA, N. S.; RODRIGUES, J. L. Cryopreservation of equine semen loaded in cryovials. **Acta Science Veterinariae**. v. 39, p. 1 – 7, 2011.

MAZIERO, R. R. D.; GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; AVANZI, B. R.; HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; MARTIN, I.; PAPA, F. O. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 33, p. 165 – 168, 2013.

MINNEMAN, K. P.; WURTMAN, R. J. Effects of pineal compounds on mammals. **Life Sciences**. v. 17, p. 1189 – 1200, 1975.

NAGAO, J. F.; NETO, J. R. N.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA, C. P. F.; DELL'AQUA Jr, J. A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**. v. 136, p. 69 – 73, 2012.

OLIVEIRA, R. A.; RUBIN, M. E. B.; MONDINO, C. A. Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões da raça crioula usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**. v. 14, p. 488 – 494, 2014.

OSÓRIO, J. P.; CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; DA SILVA, E. C.; LIMA, A. L. Princípios do congelamento de sêmen do garanhão. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 10, p. 15 – 22, 2008.

PAPA, O. F.; **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. 2015.

RICHARDSON, G. F.; WENKOFF, M. S. Semen collection from a stalling using a dummy mount. **Canadian Veterinary Journal**. v. 17, p. 177 – 180, 1976.

RODRIGUEZ, A. M.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; VEGA, F. J. P.; TAPIA, J. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; DALIN, A. M.; MORRELL, J. M. Freezing stallion semen with the new Caceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. **Animal Reproduction Science**. v. 127, p. 78 – 83, 2011.

ROSER, J. F. Reproductive endocrinology of the stallion. In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding, Management and Artificial Insemination**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 17 – p. 31.

SAMPER, J.; GARCIA, A. Comparative effect of “non-spermicidal” lubricants on stallion sperm function. **Animal Reproduction Science**. v. 107, p. 360, 2008.

SIEME, H.; HARRISON, R. A. P.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**. v. 107, p. 276 – 292, 2008.

SILVA FILHO, J. M.; VALLE, G. R.; VIANA, W. S.; VIANNA, L. R.; PALHARES, M. S. Utilização de manequim para coleta de sêmen equino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, p. 499 - 504, 1999.

SOUZA, D. C.; MACIEL, M. A. P.; SCHIAVO, S. D.; NARDINO, T. A. C.; FONSECA, G. R.; ROSA, C. S.; LINDEN, L. S. V.D.; LEITE, T. E.; NEVES, A. P.; Aspectos comportamentais de equinos da raça crioula estabulados fora da estação reprodutiva, submetidos a coleta de sêmen. In: **Anais do II Salão de Ensino Pesquisa e Extensão**. v. 2, 2010.

WRENCH, N.; PINTO, C. R. F.; KLINEFELTER, G. R.; DIX, D. J.; FLOWERS, W. L.; FARIN, C. E. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. **Animal Reproduction Science**. v. 119, p. 219 – 227, 2010.

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



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU-SP

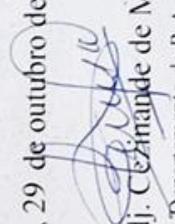
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - CEP 18.618-970-Botucatu-SP- Fone: (14) 3880-2119
e-mail: rarv@fmvz.unesp.br

Certificado

CERTIFICAMOS que **NATAN DA CRUZ DE CARVALHO**, aluno do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa, realizou Estágio Curricular junto ao CERBEQ - Posto de Monta – Fazenda Lageado, da **Área de Reprodução Animal** do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, no período de 01 de setembro a 29 de outubro de 2015 com duração de 320 horas de atividades normais e 56 horas em plantões, sob a orientação do Prof. Adj. Marco Antonio Alvarenga.

Botucatu, 29 de outubro de 2015


Prof. Adj. Celso de Meira

Chefe do Departamento de R.A.R.V.

ANEXO B - Atestado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO



ATESTADO

Atesto que **Natan da Cruz de Carvalho**, acadêmico do curso de Medicina Veterinária UNIPAMPA - Uruguaiana realizou seu estágio curricular junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), na área de **Reprodução Animal**, no período de 2 de novembro a 05 de dezembro de 2015, com duração de 200 horas de atividades.

Atividades desenvolvidas: Manejo reprodutivo em bovinos e equinos, avaliação espermática, técnicas de fertilização *in vitro*, produzir relatório final de atividades desenvolvidas.

Uruguaiana, 05 de dezembro de 2015.

Dra. Daniela Brum
Professor Associado