

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

BÁRBARA MANICA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: ÁREA DE
REPRODUÇÃO EQUINA**

**CAXIAS DO SUL
2021**

BÁRBARA MANICA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: ÁREA DE
REPRODUÇÃO EQUINA**

Relatório de Estágio Curricular Obrigatório apresentado para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade de Caxias do Sul na área de reprodução equina.

Orientação: Prof. Dr. Fernando Caetano de Oliveira.

CAXIAS DO SUL

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me abençoar com cada oportunidade que tive de aprendizado e de conhecer pessoas especiais durante minha formação acadêmica, tudo isto foi e está sendo de suma importância para meu crescimento não só profissional, mas também pessoal. Obrigada por sempre me iluminar e guiar meus passos na estrada da vida.

Aos meus pais, Bernardete e Ari e ao meu irmão Rafael que sempre me apoiaram e estiveram disponíveis para me ajudar sempre que necessário. Obrigada por tudo, amo vocês.

Aos meus avós maternos, Glaci e Olímpio, que me deram todo apoio e muitas vezes se dispuseram a me ajudar sempre que necessário nos estágios que realizei.

Ao meu professor e orientador Prof. Dr. Fernando Caetano de Oliveira, que se disponibilizou a me ajudar em tudo que precisei, e que sempre acreditou na minha capacidade, contribuindo para que eu acreditasse nela, sempre me incentivando a ser melhor.

Aos demais professores da graduação que contribuíram para a minha formação profissional, trago comigo os ensinamentos e as lembranças de cada um de vocês, por menor que tenha sido nossa convivência.

Aos meus supervisores de estágio, Juliana e Reno, que se disponibilizaram a me receber, e principalmente, me proporcionaram momentos únicos de aprendizado durante este período final da graduação. Também fica aqui meu agradecimento especial pela oportunidade à Perla Fleury, médica veterinária e diretora da In Vitro Equinos, aos demais médicos veterinários do local, Rafael, Thiago, Williams, Michel, Ana Paula e Marcos por todo o conhecimento a mim passado. À todas as demais equipes, laboratório, seleção de oócitos, limpeza, obrigada pela excelente recepção e convivência neste período que foi incrível, levarei cada um de vocês comigo. À equipe do Dr. Reno Roldi de Araújo do Árion Lab, Aline e Mariana, obrigada meninas, vocês me ensinaram muito além do que o processamento de exames e análises clínicas.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado durante a graduação, e às minhas amigas Luísa, Laura, Bianca, Larissa e Franciele, cada uma de vocês foi e é muito importante para mim. Obrigada por todo o apoio, mesmo que de longe, vocês são muito especiais para mim.

À médica veterinária Angélica Pires Neves, a qual tive a oportunidade de realizar meu primeiro estágio em reprodução, tu foste minha inspiração na reprodução equina e é uma das profissionais que tanto admiro no meio do cavalo. Obrigada pelas indicações, pelos ensinamentos, pelas conversas e acima de tudo pela amizade que criamos.

E obviamente, sou grata aos cavalos, que me moveram e me motivaram durante toda a graduação. Dedicarei todos meus esforços e conhecimentos a eles que mudaram minha vida em diversos aspectos e ressignificaram a palavra amor para mim. Viverei para vocês!

RESUMO

O estágio curricular obrigatório foi realizado na área de Reprodução Animal com ênfase na espécie equina, sob orientação acadêmica do Prof. Dr. Fernando Caetano de Oliveira. A primeira etapa foi realizada na In Vitro Clonagem Animal, localizada na Fazenda São Francisco, na cidade de Mogi Mirim, estado de São Paulo, durante o final do mês de agosto e todo o mês de setembro de 2021, totalizando 200 horas, sob supervisão da médica veterinária especialista em reprodução equina Juliana Schleich Fontes. A segunda etapa foi realizada acompanhando o médico veterinário Dr. Reno Roldi de Araújo, que atua na cidade de Caxambu, estado de Minas Gerais, durante o mês de outubro até meados de novembro, totalizando 240 horas. Durante o período de estágio na maternidade de clones equinos foi possível acompanhar o manejo sanitário, manejo nutricional, neonatologia e biotecnologias reprodutivas, também foi possível visitar a central de receptoras e realizar o acompanhamento ultrassonográfico semanal da gestação, além de acompanhar os veterinários em aspirações externas. E por fim, na rotina de visitas realizadas aos haras com o Dr. Reno pude acompanhar o exame de ultrassonografia para controle folicular, avaliação gestacional, diagnóstico gestacional e aplicação das biotecnologias reprodutivas na raça Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: Biotecnologias reprodutivas. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides. Aspiração folicular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura da In Vitro Equinos. A) Cocheiras maternidade. B) Lanchonete com cochos cobertos para alimentação.....	11
Figura 2-	Esquema do ciclo estral da égua e os hormônios envolvidos.....	13
Figura 3-	Materiais utilizados para OPU. A) Mesa de aspiração montada com US, banho maria, bomba de vácuo, haste guia, agulha e equipos instalados. B) Guia de aspiração aberta com probe micro convexa.....	15
Figura 4-	Aspiração folicular guiada por US. A) . B) Imagem ultrassonográfica de folículo sendo puncionado por agulha (seta).....	16
Figura 5-	Processos da seleção de oócitos em laboratório. A) Filtragem do fluido folicular com solução DPBS. B) Deposição do líquido já lavado para placa de Petri com jato de meio na tela do filtro. C) Busca e seleção de oócitos sob a lupa. D) Oócitos selecionados depositados nas gotas de meio específico para lavagem final.....	17
Figura 6-	Oócitos selecionados de égua da raça Mangalarga Marchador, depositados em gota de meio específico pós lavagem, prontos para serem envasados em tubos com meio de transporte.....	18
Figura 7-	Oócito equino, após recuperação por aspiração folicular guiada por US.....	19
Figura 8-	Realização da técnica de ICSI no laboratório da In Vitro com oócito já maturado e desnudo.....	20
Figura 9-	Diagnóstico de gestação no décimo primeiro dia pós ovulação em égua matriz.....	25
Figura 10-	Avaliação de gestação, embrião com aproximadamente trinta dias.....	26
Figura 11-	Coleta de sêmen com utilização de égua em estro e uso de vagina artificial.....	27
Figura 12-	Embrião com 8 dias (indicado pela seta) sobre o filtro do copo coletor de égua doadora da raça Mangalarga Marchador.....	30
Figura 13-	Organização do laboratório e equipamentos para manipulação do embrião.....	31
Figura 14-	Mesa aquecedora regulada em 37°C com meio holding e placa de Petri.....	31
Figura 15-	Pipeta contendo o embrião já envasado em pipeta, note as colunas alternadas com solução e ar.....	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Atividades acompanhadas, número (n) e porcentagem, durante o estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária na In Vitro Brasil Clonagem Animal S/A, de 30 de agosto a 30 de setembro de 2021.....12
- Tabela 2- Atividades acompanhadas, número (n) e porcentagem, durante o estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária com o Dr. Reno Roldi de Araújo, de 01 de outubro a 12 de novembro de 2021.....22
- Tabela 3- Inseminações artificiais acompanhadas durante o período do estágio curricular obrigatório.....27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
CL	Corpo lúteo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Solução de fosfato tamponada de Dulbecco
Dr.	Doutor
E2	Estrógeno
EPE	Extrato de pituitária equina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Hora
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
kg	Quilogramas
LA	Longa ação
LH	Hormônio luteinizante
LIU	Líquido intrauterino
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
MN	Monta natural
OPU	<i>Ovum pick up</i>
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SC	Sêmen congelado
SF	Sêmen fresco
SR	Sêmen refrigerado
SOV	Superovulação
TE	Transferência de embriões
TO	Transportadora de oócitos
UI	Unidades Internacionais
US	Ultrassonografia
VO	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	ESTÁGIO 1: IN VITRO EQUINOS.....	10
2.1	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	10
2.2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	11
2.2.1	Ciclo estral da égua.....	12
2.2.2	Transferência de embriões.....	13
2.2.3	Produção de embriões <i>in vitro</i>.....	14
2.2.3.1	Aspiração folicular transvaginal.....	14
2.2.3.2	Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides.....	19
3	ESTÁGIO 2: RENO ROLDI DE ARAÚJO.....	21
3.1	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	21
3.2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	22
3.2.1	Controle folicular.....	22
3.2.2	Indução da ovulação.....	23
3.2.3	Luteólise.....	24
3.2.4	Monta controlada.....	25
3.2.5	Diagnóstico e acompanhamento da gestação por ultrassom.....	25
3.2.6	Coleta e análise de sêmen.....	26
3.2.7	Inseminação artificial.....	27
3.2.8	Sincronização de receptoras.....	28
3.2.9	Coleta de embrião.....	29
3.2.10	Manipulação do embrião.....	30
3.2.11	Inovulação do embrião.....	32
.		
4	CONCLUSÃO.....	33
5	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da FAO (2017), o Brasil concentra em seu território o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,5 milhões de animais. Para tanto, o cavalo consegue movimentar significativamente a economia do país, sendo responsável por gerar mais de três milhões de empregos, diretos e indiretos, arrecadando mais de R\$ 16 bilhões a cada ano.

O segundo estágio foi acompanhando a rotina a campo da reprodução equina e aplicação das biotecnologias reprodutivas do médico veterinário Dr. Reno Roldi de Araújo, que atua na cidade de Caxambu-MG e região, que atende aos haras da raça Mangalarga Marchador.

Devido a esse cenário promissor, o criador de cavalo é estimulado a investir em melhoramento genético, no desejo de obter animais melhores que seus pais, aperfeiçoando a realidade reprodutiva da espécie em seu estabelecimento. Assim, há uma maior disponibilidade de empregos para novos médicos veterinários na área de reprodução equina, participando ativamente do investimento desses criadores.

Como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário pela Universidade de Caxias do Sul (UCS), o presente documento tem a finalidade de descrever as atividades realizadas e acompanhadas no estágio curricular obrigatório durante o período de setembro de 2021 a novembro de 2021. O estágio foi realizado na *In Vitro* Equinos localizada na fazenda São Francisco em Mogi Mirim/SP, gerenciada pela Diretora Financeira e Médica Veterinária Dra. Perla Dagher Cassoli Fleury, onde desde 2005 dedica-se ao trabalho de armazenamento celular de grandes animais.

O principal objetivo do estágio curricular foi à vivência da reprodução equina em dois locais distintos, o primeiro com emprego de técnicas modernas e o segundo, onde se aplicam inúmeras biotecnologias da reprodução, como a transferência de embriões, observando o papel do Médico Veterinário nesses dois diferentes segmentos da reprodução equina. Este relatório caracteriza os dois locais de realização do estágio curricular, descreve a rotina acompanhada, as atividades desenvolvidas e os procedimentos realizados durante o período.

2 ESTÁGIO 1: *IN VITRO* EQUINOS

O primeiro estágio curricular foi realizado no período de 30 de agosto de 2021 a 30 de setembro de 2021 na *In Vitro* Equinos, sob supervisão da médica veterinária Dra. Juliana Schleich Fonte. Foi possível acompanhar durante o estágio a rotina de partos, manejo alimentar e sanitário com os clones, aspiração folicular para injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e para clonagem e acompanhamento gestacional das éguas receptoras de embriões.

2.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A *In Vitro* Clonagem Animal é uma empresa pioneira no Brasil por utilizar biotécnicas inovadoras como a clonagem animal e a produção *in vitro* de embriões equinos pela técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Fundada em 2005, está localizada na Fazenda São Francisco na cidade de Mogi Mirim, estado de São Paulo. Além da sede, a *In Vitro* possui uma central que aloja aproximadamente 80 éguas receptoras de embriões na cidade de Santo Antônio da Posse, estado de São Paulo, há 35 km de Mogi Mirim.

A sede da empresa possui 3 hectares, com 4 baias maternidade, 8 piquetes para potros ao pé, potros desmamados e éguas prenhes no terço final da gestação, além de uma lanchonete coberta com quinze cochos de alimentação (Figura 1). Nos 15 dias prévios à data prevista do parto, a égua prenhe fica isolada em um piquete para parir, após o parto é transferida juntamente com o neonato para a cocheira maternidade.

Os clones equinos são principalmente das raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista, totalizando 15 clones de potro e 11 éguas receptoras, além de 5 éguas no terço final da gestação e 1 égua doadora, em estadia para aspiração folicular e posterior produção de embriões por ICSI.

Atualmente, o quadro de profissionais da *In Vitro* é de 10 médicos veterinários, 1 biólogo e 3 técnicos agrícolas que são responsáveis pela rotina de aspiração folicular, seleção de oócitos, produção de embriões *in vitro* e transferência dos mesmos, clonagem, manejo e neonatologia equina, controle folicular, diagnóstico e acompanhamento gestacional.

Figura 1- Estrutura da In Vitro Equinos. A) Cocheiras maternidade. B) Lanchonete com cochos cobertos para alimentação.



Fonte: arquivo pessoal (2021).

O laboratório junto à propriedade é um ambiente restrito, visto que necessita de temperatura controlada, bem como fluxo de pessoas. Lá são realizados os seguintes processos: maturação de oócitos in vitro, ICSI, cultivo in vitro e envase de embriões. Estes embriões podem ser destinados à inovulação em égua receptora ou à vitrificação, conforme decisão do cliente.

2.2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Diariamente, a refeição ofertada na lanchonete era a ração, programada para às 07 horas e às 15 horas a todos os animais que comiam separados conforme sua alocação por lotes nos piquetes. As éguas prenhes e as éguas lactantes recebiam a ração Nutriage¹, os potros ao pé e alguns dos potros desmamados recebiam Care², os demais potros desmamados também recebiam Nutriage.

Era adicionado sobre a ração dos potros ao pé pela manhã e à tarde o suplemento Crescer, à base de algas marinhas que contém probióticos e prebióticos,

¹ Proteína bruta (mín.) 15%; Extrato etéreo (mín.) 4%; Fibra bruta (máx.) 12%; Matéria mineral (máx.) 12%; Cálcio (máx.) 1,8%; Fósforo (mín.) 0,5%; Energia digestível (mín.) 3.200kcal/kg.

² Proteína bruta (mín.) 18%; Extrato etéreo (mín.) 3,5%; Fibra bruta (máx.) 10%; Matéria mineral (máx.) 10%; Cálcio (máx.) 1,5%; Fósforo (mín.) 0,6%; Energia digestível (mín.) 3.200kcal/kg.

que auxilia no desenvolvimento e crescimento destes potros. O Mono-hidroclorato de L-Lisina 98,5% era misturado à ração somente pela manhã, este também tem a função de colaborar para o crescimento de potros. O feno de azevém era distribuído pelos piquetes logo após as refeições na lanchonete.

Éguas receptoras de embriões produzidos *in vitro* para clonagem têm maior probabilidade de desenvolver placentite (ref). Portanto, junto à ração, as éguas prenhes recebiam uma dose profilática para placentite de Pentoxifilina pasta equivalente a 0,002mg/kg e Sulfametoxazol 20% + Trimetoprima 4% solução.

As aspirações foliculares eram realizadas nas centrais que solicitavam o serviço. Então, na data agendada uma equipe especializada se deslocava até o local para realizar a aspiração nas éguas previamente examinadas. Enquanto uma égua era preparada, o técnico ficava responsável por selecionar os oócitos já coletados pelo médico veterinário, que retornava com a equipe para o laboratório da In Vitro.

Tabela 1 - Atividades acompanhadas, número (n) e porcentagem, durante o estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária na In Vitro Brasil Clonagem Animal S/A, de 30 de agosto a 30 de setembro de 2021.

Atividade	N	Porcentagem
Controle folicular	189	58,15
Aspiração folicular	51	15,7
Coleta de sangue e resenha	47	14,47
Acompanhamento de gestação	36	11,08
Acompanhamento de parto	1	0,3
Lavado uterino	1	0,3
TOTAL	325	100

Fonte: Arquivo pessoal (2021).

2.2.1 Ciclo estral da égua

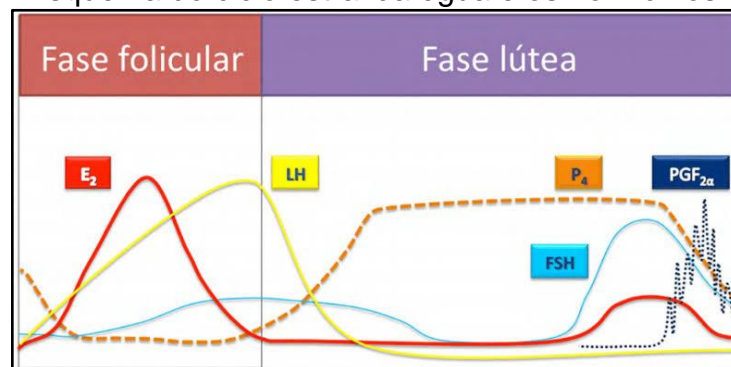
A égua, por ser poliéstrica estacional de dias longos, entra em anestro no inverno e reinicia a ciclar na primavera (REECE, 2017). Portanto, necessita de luminosidade para diminuição da produção de melatonina pela glândula pineal, hormônio este que inibe a produção do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) pelo hipotálamo. Conforme Ginther (1992), o GnRH, como o próprio nome sugere, estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante

(FSH) através da hipófise, ambos irão atuar sobre os ovários, dependendo da influência da Progesterona (P4) ou do Estrógeno (E2).

A progesterona é dominante quando a égua se encontra em diestro e o FSH é liberado. Este hormônio irá ativar e recrutar alguns dos oócitos e a formação do folículo se dá pelo acúmulo de fluido entorno do oócito. Geralmente, somente um folículo se torna dominante a cada ciclo estral, este irá ativar a liberação de Inibina, um hormônio que inibirá o crescimento dos demais folículos e causará atresia, fazendo com que regridam de tamanho (SARAIVA, 2010).

Conforme o folículo dominante cresce, a secreção de estrógeno vai aumentando, fazendo com que a égua entre em estro, o folículo vai se deslocando para a fossa ovulatória do ovário. O LH é então liberado e ocorre a ovulação, 24h após acontece a luteinização das células da granulosa. O corpo lúteo (CL) formado permanece no ovário até o 14º dia pós ovulação que secretará progesterona para a preparação endometrial. Caso não ocorra a fertilização do oócito, o LH liberará prostaglandinas que causarão luteólise e, conseqüentemente, regressão do CL. Assim, a égua está apta a iniciar mais um ciclo estral, que tem duração média de 21 dias (Ginther, 1992). A Imagem 2 ilustra o esquema hormonal do ciclo estral da égua.

Imagem 2- Esquema do ciclo estral da égua e os hormônios envolvidos.



Fonte: RANGEL, 2018.

2.2.2 Transferência de embriões

A equideocultura tem papel importantíssimo no agronegócio mundial com o mercado em crescente constante. Com isso, a procura por animais de genética superior e melhor desempenho esportivo aumentou (ALMEIDA, 2010). Logo, conforme Bertozzo (2014), as biotecnologias reprodutivas tiveram mais procura, e a

transferência de embriões, com grande aumento nas últimas décadas, hoje é a técnica mais utilizada.

A transferência de embriões (TE), bem como as demais biotecnologias reprodutivas, tem como intuito maior eficiência reprodutiva de éguas de alto potencial genético e especialmente das que não podem levar uma gestação a termo, seja por serem atletas, idosas ou por possuírem problemas reprodutivos que as impeçam de gestar por serem inférteis ou subférteis (ALVARENGA, 2017).

A TE, além de ser um método não invasivo, otimiza a perpetuação de características desejáveis na espécie utilizando éguas doadoras e sêmen de garanhões de alto valor genético e zootécnico (SILVA, 2003). Após o sucesso do estudo pioneiro realizado por Oguri e Tsutsumi (1972), no Japão e no Brasil em 1987 realizado pela primeira vez por Fleury, hoje a técnica de TE não invasiva é comercialmente utilizada na espécie equina em todos os países. Conforme Alvarenga e Fleury (1999), as taxas de prenhez foram aumentando gradativamente nas últimas décadas com a utilização e o avanço desta biotécnica aplicada à espécie equina, passando de 12,5% para 74,55% de sucesso.

2.2.3 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Na espécie equina, a fertilização *in vitro* tem baixa taxa de sucesso, visto que o espermatozoide tem dificuldade de penetrar a zona pelúcida do oócito *in vitro* (BRINSKO, 2011). Por isso, a aspiração folicular de oócitos para injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) tem se mostrado um bom método com grandes taxas de nascimento de potros (CARNEIRO, 2016).

O processo para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) segue as seguintes etapas, respectivamente: coleta de oócitos por aspiração folicular, seleção, maturação, fecundação por ICSI, formação do embrião, cultivo embrionário e posterior inovulação do embrião ou vitrificação. Todos processos supracitados são realizados *in vitro*, tendo assim maior taxa de sucesso.

2.2.3.1 Aspiração folicular transvaginal

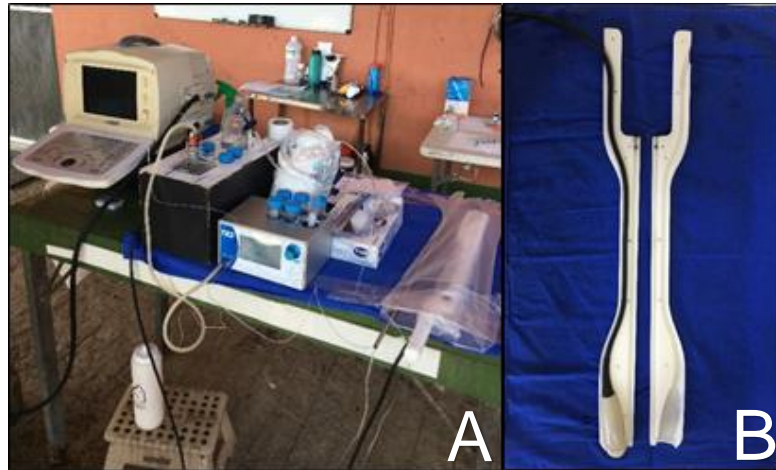
A coleta de oócitos usando a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (US) é uma técnica avançada para a produção de embriões que

revolucionou a indústria equina (RODRIGUEZ, 2021). Também conhecido como “*Ovum Pick Up*” (OPU), este método pouco invasivo foi realizado e descrito pela primeira vez por Brück et al (1992) que efetivaram a aspiração de quatro folículos que variaram de 30mm a 37mm, com recuperação de um oócito, sendo aprimorada desde então. Alguns parâmetros já ficam pré-estabelecidos antes de iniciar a OPU, tais como a temperatura do banho, a pressão da bomba de vácuo e o protocolo anestésico, este último costuma ser padrão do local ou do profissional que está atuando (SÁ *et al*, 2017).

Segundo Coutinho da Silva (2008), o complexo *cumulus oophorus* (COC) de folículos imaturos é fortemente aderido à parede folicular reduzindo assim a taxa de coleta de oócitos que fica em torno de 30%. Porém, com o aprimoramento da técnica e a escarificação folicular elevou-se essa taxa para 70% na espécie equina, por isso, estabeleceu-se a aspiração de folículos pré-ovulatórios com mais de 8mm. Ainda, conforme estudo realizado, as lesões ovarianas causadas pela punção com agulha não influenciou a função ovariana no ciclo seguinte e não interferiu diretamente com a fertilidade (FRANCO *et al*, 2014).

Na *In Vitro*, as éguas submetidas à OPU não recebiam nenhum protocolo hormonal com o intuito de puncionar o maior número de folículos antrais (>8mm). No entanto, visto que os oócitos são imaturos, estes devem seguir maturação *in vitro*. Para o procedimento, era utilizada uma guia Mindray® com uma probe micro convexa de 5MHz, acoplada à extensão da guia passa uma agulha de calibre 12G que punciona e escarifica o folículo, para cada égua era vestida uma camisa sanitária na guia. Além disso, integravam uma bomba de vácuo regulada a 150mmHg de pressão e junto ao sistema uma garrafa coletora de 500mL que armazenava o fluido folicular aspirado (Figura 3).

Figura 3- Materiais utilizados para OPU. A) Mesa de aspiração montada com US, banho maria, bomba de vácuo, haste guia, agulha e equipos instalados. B) Guia de aspiração aberta com probe micro convexa.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Prévio ao procedimento, a égua era posicionada em tronco de contenção onde era realizada a avaliação folicular por US transretal. Uma vez apta à OPU, era iniciado o preparo com a égua, inicialmente aplicava-se um agonista alfa 2-adrenérgico, o cloridrato de detomidina na dose de 0,01mg/kg por via endovenosa. Após cinco minutos da aplicação do primeiro fármaco, administrava-se então hioscina sódica na dose de 10mg/kg e tartarato de butorfanol na dose de 0,01 mg/kg, ambos medicamentos com intuito de promover a analgesia e espasmo visceral prévio à punção folicular, protocolo medicamentoso adotado pela *In Vitro*.

Posterior a isso, retirava-se todo o bolo fecal da ampola retal para facilitar o manuseio dos ovários. Em seguida era realizada a antisepsia da região perineal, vulva e vagina da égua com sabão neutro e água corrente, por fim mantinha-se a região seca e limpa até o momento do procedimento.

Então, a guia era introduzida por via transvaginal até chegar à região de encontro com o ovário, guiada por US. Na palpação transretal, o médico veterinário direcionava o ovário desejado na lateral da cérvix, onde está localizado o fundo de saco vaginal. No momento em que as duas partes eram mantidas em contato, a punção com a agulha era efetivada. Cada folículo era lavado (flushing) de cinco a dez vezes com um volume de aproximadamente 1 ml por vez, com solução DPBS contendo heparina e antibiótico, específica para OPU. Junto com o flushing, o operador realizava movimentos com a guia na tentativa de escarificar a parede do folículo, fazendo assim com que houvesse o desprendimento do complexo *cumulus oophorus* da parede folicular (Figura 4).

Figura 4- Aspiração folicular guiada por US. A) . B) Imagem ultrassonográfica de folículo sendo puncionado por agulha (seta).



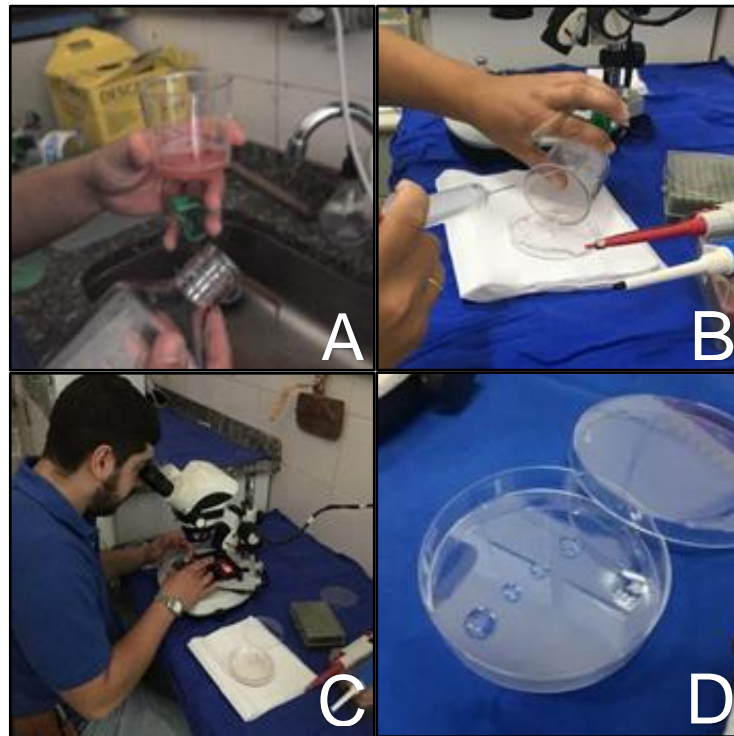
Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Finalizada a OPU em ambos os ovários, era administrado então como analgésico e anti-inflamatório Flunixin Meglumine na dose de 1,1mg/kg IV e loimbina (Reset® - Botupharma) na dose de 0,1mg/kg IV como antagonista alfa adrenérgico. Em seguida, por via IM, era administrada uma dose profilática (12mg/kg) de Ceftiofur (Excede® - Zoetis), antibiótico do grupo das cefalosporinas.

Imediatamente após o término da aspiração folicular de cada égua, o copo coletor era levado ao laboratório instalado no local. Para a seleção dos oócitos presentes no fluido folicular era necessário passar por um filtro coletor todo o conteúdo aspirado, que muitas vezes se apresentava sanguinolento devido à escarificação dos folículos, mas sem interferência na qualidade oocitária.

Após passado pelo filtro e lavado novamente com solução DPBS, o fluido final era acomodado sobre uma placa de Petri para a seleção dos oócitos sobre a lupa. Uma vez encontrados, são depositados sobre sucessivas gotas de meio específico, transferindo-os de gota a gota com o objetivo de lavar cada oócito adequadamente. Este processo de lavagem é repetido por volta de cinco vezes para garantir que nenhuma impureza permaneça em sua superfície antes de seguir para o envase (Figura 5).

Figura 5- Processos da seleção de oócitos em laboratório. A) Filtragem do fluido folicular com solução DPBS. B) Deposição do líquido já lavado para placa de Petri com jato de meio na tela do filtro. C) Busca e seleção de oócitos sob a lupa. D) Oócitos selecionados depositados nas gotas de meio específico para lavagem final.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Terminada a coleta e seleção, os oócitos (Figura 6) eram acomodados na transportadora de oócitos (TO) e lá permaneciam por 24h a uma temperatura controlada de 22,5°C. Passado este período, os oócitos eram retirados do meio de transporte e inseridos em meio de maturação específico produzido pela In Vitro onde iriam maturar em estufa a uma temperatura de 37°C. A última etapa deste processo pós maturação era a realização da ICSI.

Figura 6- Oócitos selecionados de égua da raça Mangalarga Marchador, depositados em gota de meio específico pós lavagem, prontos para serem envasados em tubos com meio de transporte.

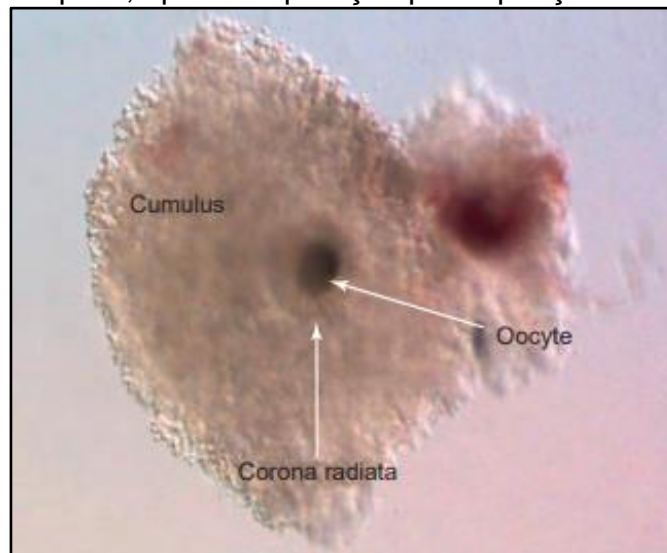


Fonte: Arquivo pessoal (2021).

2.2.3.2 Injeção intracitoplasmática de espermatozoides

A ICSI é um método de fertilização *in vitro* de oócitos. Com isso, um único espermatozoide é selecionado com uma pipeta sobre um micromanipulador acoplado ao microscópio e é então injetado no oócito (BRINSKO, 2011) (Figura 7). Este avanço tem contribuído para o uso na fertilização equina assistida para garanhões com quantidade ou qualidade de sêmen limitada ou para éguas subférteis (CARNEVALE, 2016).

Figura 7- Oócito equino, após recuperação por aspiração folicular guiada por US.



Fonte: BRINSKO (2011).

Para a realização da técnica de ICSI, os oócitos que chegam à In Vitro são maturados até atingirem metáfase II, em seguida são desnudados e apenas os oócitos que apresentam corpúsculo polar aparente são utilizados. Eles, então, recebem a injeção intracitoplasmática com um único espermatozoide, que pode ser oriundo de sêmen fresco ou congelado. 90% da ICSI realizada no laboratório da In Vitro é realizada com sêmen congelado, por escolha do cliente.

Previamente à ICSI, a amostra de sêmen é lavada e deixada em meio específico que reduz a motilidade e a aderência de um único espermatozoide a ser aspirado pela pipeta. Após pipetado pela cauda, ele é introduzido no citoplasma do oócito utilizando equipamento específico chamado Piezo Xpert® (Figura 8). A partir disso, cada oócito que recebeu uma injeção de espermatozoide segue para a estufa onde permanece de 24 a 48h para clivagem.

Figura 8- Realização da técnica de ICSI no laboratório da In Vitro com oócito já maturado e desnudo.



Fonte: In Vitro Clonagem (2018).

A taxa de maturação de oócitos equinos da In Vitro fica próxima de 70%, já o número de embriões por égua pode variar conforme sua idade. Após a clivagem do embrião, muitos clientes optam por vitrificá-los, sendo que 98% são vitrificados e permanecem na In Vitro e apenas 2% destes embriões são transferidos à fresco para doadoras.

3 ESTÁGIO 2: RENO ROLDI DE ARAÚJO

O estágio foi realizado no período de 01 de outubro de 2021 a 12 de novembro de 2021, sob supervisão do médico veterinário Dr. Reno Roldi de Araújo. Durante o estágio foi possível acompanhar a rotina a campo com aplicação das biotecnologias reprodutivas voltadas à espécie equina.

3.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O médico veterinário Dr. Reno Roldi de Araújo exerce sua profissão de forma autônoma, realizando atendimentos na área de reprodução equina e eventualmente atendimentos clínicos na propriedade dos clientes. Atende em alguns haras da cidade de Caxambu e região, estado de Minas Gerais. Também possui um laboratório de análises clínicas veterinárias localizado em Caxambu-MG. Durante esta temporada pude acompanhar a rotina reprodutiva intensa de três haras da raça Mangalarga Marchador, os quais eram atendidos pelo médico veterinário.

A estrutura física dependia de cada local atendido, para o manejo algumas propriedades contavam com lanchonete para palpação e outros com um único tronco de contenção. Todos locais apresentavam um ambiente seguro e adequado para realização da rotina de reprodução como palpação retal e avaliação por ultrassonografia, inseminação artificial, lavagem uterina, coleta e transferência de embrião e coleta de sêmen de garanhão.

Cada um dos locais contava com um espaço para organização de equipamentos de laboratório para análise e manipulação de embrião e de sêmen, bem como para aquecimento de água e descongelamento de palhetas de sêmen congelado. Todos os haras possuíam mais de um garanhão, os quais eram utilizados ou para coleta de sêmen seguida de inseminação, ou para monta controlada.

No caso de utilização de sêmen refrigerado de garanhões de outros haras, este era enviado somente nas segundas, quartas e sextas-feiras. Por isso, nestes mesmos dias a rotina era mais intensa iniciando às 07h e estendendo-se até as 22h. Já quando a escolha do proprietário era utilizar sêmen congelado, a administração de GnRH era pela manhã e o controle folicular era realizado à noite, garantindo assim que a égua fosse inseminada logo após a ovulação.

3.2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período foi possível acompanhar a rotina que era baseada em acompanhamento folicular de éguas doadoras de embrião e matrizes, sincronização de doadoras, coleta de sêmen com vagina artificial, inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado e congelado, coleta e transferência de embrião e lavagem uterina.

Cada local era visitado conforme a necessidade de acompanhamento das éguas ou de lavado de embrião e inseminação. O haras 1 recebia atendimento diário de segunda a sábado, e eventualmente aos domingos, visto que possuía um número expressivo de éguas doadoras, matrizes e receptoras. Os haras 2 e 3 recebiam visitas de segunda a sábado, porém os dias fixos eram segundas, quartas e sextas-feiras, nos demais somente se necessário.

Na Tabela 2 estão descritas as atividades acompanhadas durante o estágio realizado com o Dr. Reno Roldi de Araújo em Caxambu, Minas Gerais.

Tabela 2- Atividades acompanhadas, número (n) e porcentagem, durante o estágio curricular obrigatório em Medicina Veterinária com o Dr. Reno Roldi de Araújo, de 01 de outubro a 12 de novembro de 2021.

Atividade	N	Porcentagem
Controle folicular	1051	82,05
Inseminação artificial	60	4,68
Diagnóstico de gestação	59	4,60
Coleta de sêmen	37	2,89
Lavado uterino	26	2,03
Implante de P4	19	1,48
Acompanhamento de monta natural	15	1,17
Transferência de embrião	14	1,10
TOTAL	1281	100

Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.2.1 Controle folicular

Diariamente, as rotinas de controle folicular eram realizadas através da palpação retal e do exame complementar de ultrassonografia transretal. O médico veterinário possuía dois aparelhos de ultrassom, ambos da marca Domed® modelo

DM10V Pro. As éguas paridas eram palpadas pela primeira vez no sétimo dia pós-parto, sendo o cio do potro utilizado na maioria dos casos. Todos os dados da palpação, ultrassonografia, procedimentos e medicações eram anotados em um caderno e ao final do dia as informações eram repassadas para um book de trabalho reprodutivo individual de cada fêmea, separadas por haras e subdivididas por doadoras, matrizes e receptoras.

O cio do potro é conhecido como o primeiro estro pós-parto da égua. Entre os dias 4 e 7 pós-parto, o epitélio luminal apresenta-se intacto, desaparecem as dilatações das glândulas endometriais e completando-se a reabsorção das microcarúnculas no dia 7. Em torno do 14º dia, o endométrio pode apresentar aparência histológica de útero normal pré gestante (BLANCHARD e VARNER, 1993).

A previsão da ovulação e o momento da cobertura eram definidos através do exame do útero e dos folículos ovarianos. Ao ultrassom, observavam-se a ecotextura e a presença de líquido intrauterino. Os folículos eram avaliados através do tamanho, forma e flutuação. Na maioria dos casos, as éguas que apresentassem edema uterino 3 ou 4 (aumento das pregas endometriais) com folículos ≥ 35 mm de diâmetro, flutuantes e ovóides eram encaminhadas para a monta controlada ou inseminadas com sêmen fresco.

Segundo McCue, Scoggin e Lindholm (2011), os sinais que indicam a proximidade da ovulação são: diminuição dos sinais de estro, tamanho folicular ≥ 35 mm de diâmetro, a forma folicular torna-se ovóide direcionando-se para a fossa ovulatória 24 horas antes da ovulação e a diminuição do edema uterino.

3.2.2 Indução da ovulação

A deslorelina é um hormônio sintético análogo ao GnRH indicado para induzir a ovulação em éguas com folículos ovarianos ≥ 35 mm de diâmetro. Este agente induz a luteinização ovariana por provocar a liberação do LH. Cerca de 80% das éguas ovulam dentro de 48 horas após aplicação da deslorelina (BRINSKO, 2011).

O hCG (gonadotrofina coriônica humana) é um hormônio que possui ação semelhante ao LH acelerando a maturação folicular e, conseqüentemente ocorrendo mais cedo a ovulação. Este hormônio deve ser administrado em éguas com folículos de diâmetro ≥ 35 mm. É recomendada a utilização do hCG intravenoso em dose única entre 1500 a 3500 UI. O tratamento tem custo baixo e bastante eficácia, pois cerca de

90% das éguas ovulam entre 36-48 horas após aplicação (SQUIRES, 2011). Utilizava-se 1mL de Deslorelina® (acetato de deslorelina) por via IM ou 2000UI de Chorulon® (hCG) IV como indutores da ovulação.

As doadoras inseminadas com sêmen fresco ou sêmen refrigerado eram, na maioria dos casos, induzidas um dia antes da inseminação artificial (IA). Já as éguas doadoras e matrizes que eram inseminadas com sêmen congelado tinham sua ovulação induzida geralmente as 18h, buscando com isso, a realização da IA às 6h da manhã do segundo dia pós-indução, com cerca de 36 horas de intervalo entre a indução e a ovulação. Mesmo com esse manejo controlado, algumas fêmeas ovulavam antes do tempo previsto fazendo com que todas fossem palpadas de quatro em quatro horas para um controle mais preciso do momento da ovulação, visto que o sêmen congelado possui apenas 6h de atividade no trato reprodutivo da égua.

3.2.3 Luteólise

A prostaglandina F2 α (PGF2 α) está intimamente relacionada à reprodução, sendo liberada no trato reprodutivo em função de estímulos endócrinos, neurais e físicos. PGF2 α atua como hormônio luteolítico, modulando a fase do diestro, a função e a duração do ciclo estral em éguas. Na fêmea equina não prenhe a liberação de PGF2 α endógena ocorre entre os dias 14 e 15 pós-ovulação causando a lise do corpo lúteo (SQUIRES, 2011; STAEMPFLI, 2011).

Em centrais de reprodução e haras, as prostaglandinas exógenas mais frequentemente administradas são PGF2 α natural, dinoprost trometamina (PGF2 α sintética) e o cloprostenol sódico (análogo da prostaglandina sintética). É necessário que a aplicação seja realizada entre o 6° e o 15° dia do diestro, pois o corpo lúteo não é responsivo às prostaglandinas nos cinco primeiros dias da fase luteínica. Após a aplicação, a égua pode apresentar efeitos adversos como sudorese e desconforto abdominal. O retorno ao cio inicia de 48 a 72 horas, dependendo do tamanho folicular no dia da aplicação (SQUIRES, 2011; STAEMPFLI, 2011).

Utilizava-se o Lutalyse® (dinoprost trometamina) na dose 7,5 mg/égua IM no sexto dia após a ovulação como agente luteolítico, dose padrão para todos os animais.

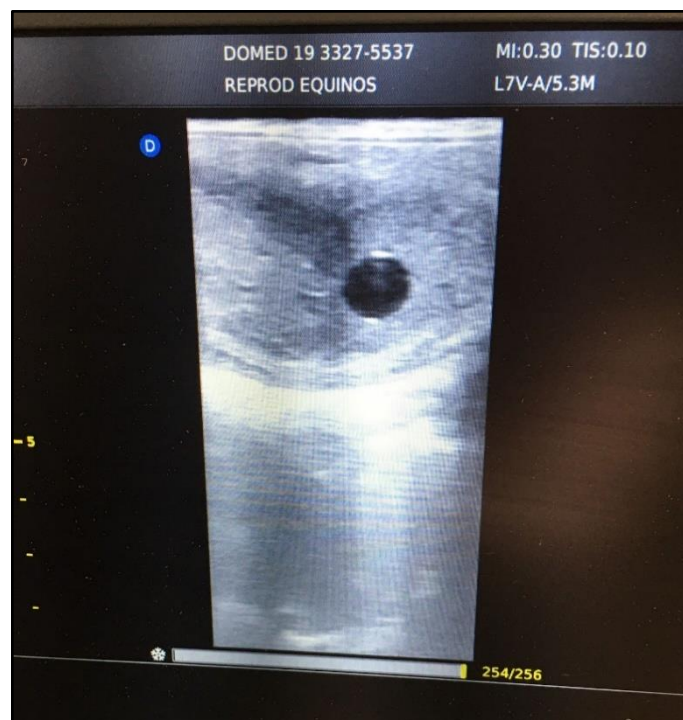
3.2.4 Monta controlada

As coberturas ocorriam em um local aberto, com piso de areia ou concreto, conforme estrutura do haras. A égua tinha sua região vulvar higienizada através de lavagem com água e sabão neutro. Posteriormente, a região lavada era secada e a cauda ligada com atadura. A fêmea era contida utilizando-se peias, cabresto e cachimbo. O garanhão era então conduzido até a mesma, aproximando-se desta sempre pela cabeça. No momento da monta, o médico veterinário afastava a cauda para o lado, auxiliando na penetração do pênis. Após a ejaculação, a região do pênis e prepúcio era higienizada com água morna.

3.2.5 Diagnóstico e acompanhamento da gestação por ultrassom

O diagnóstico de gestação era realizado através do exame de ultrassonografia transretal no 11º dia pós-ovulação (Figura 9). Caso não fosse constatada a vesícula embrionária, a égua era novamente examinada no 14º dia pós-ovulação. Estando a égua prenhe, o acompanhamento da gestação por ultrassom era realizado na fase embrionária no 20º e 30º dias (Figura 10) e na fase fetal no 60º, 120º e 180º dias.

Figura 9- Diagnóstico de gestação no décimo primeiro dia pós ovulação em égua matriz.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Figura 10- Avaliação de gestação, embrião com aproximadamente trinta dias.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.2.6 Coleta e análise de sêmen

As coletas de sêmen eram realizadas conforme a demanda para IA das éguas. Os garanhões coletados eram de propriedade de cada haras, geralmente utilizados nas éguas para IA ou para realizar monta controlada em matrizes e doadoras. O haras 3 utilizava somente sêmen de seus garanhões para inseminação das éguas, portanto não usavam sêmen congelado, tampouco de fora. As coletas ocorriam nas segundas, quartas e sextas-feiras.

O pênis de cada garanhão era sempre higienizado com água morna antes da coleta, realizando uma boa limpeza na fossa da glândula. Os reprodutores eram coletados (Figura 11) com vagina artificial, modelo Botucatu®, preenchida com água morna de a uma temperatura interna entre 47° a 52°C. A vagina era montada com uma mucosa de plástico descartável e um copo coletor, que continha dentro um saco plástico para armazenamento do sêmen e um filtro para separação da fração de gel do ejaculado e possíveis sujidades. A ejaculação era confirmada pela palpação da base do pênis sentindo-se os pulsos ejaculatórios e observada pelo movimento de bandeira da cauda do macho.

Figura 11- Coleta de sêmen com utilização de égua em estro e uso de vagina artificial.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Após a coleta, o sêmen era encaminhado ao laboratório, onde se retirava o filtro com o gel, este era descartado. A amostra era colocada em uma proveta para anotação do volume. A motilidade e vigor espermáticos eram avaliados subjetivamente através da visualização de uma gota de sêmen entre uma lâmina e lamínula em um microscópio óptico. Após a avaliação do ejaculado fresco, procedia-se a preparação da dose que seria utilizada para IA. O sêmen era então diluído com Botusêmen® GOLD, na proporção 1:1 de diluente e sêmen.

3.2.7 Inseminação artificial

Foram acompanhadas inseminações artificiais (Tabela 3) com sêmen fresco, resfriado e congelado, totalizando 60 IA.

Tabela 3- Inseminações artificiais acompanhadas durante o período do estágio curricular obrigatório.

Inseminação artificial	SF	SC	TOTAL
IA prenhez	41 (82%)	5 (50%)	46 (76,67)
IA coleta de embrião	9 (18%)	5 (50%)	14 (23,33)
TOTAL	50 (100%)	10 (100%)	60 (100%)

Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Antes da IA, a égua era sempre palpada e através da US transretal verificava-se o(s) folículo(s) ovariano(s) e a condição uterina (grau de edema). A base da cola era ligada com atadura, levando a cauda amarrada pela ponta em direção ao flanco, atando-a na própria égua mantendo a região do períneo livre. A vulva e a fossa do clitóris eram lavadas com água e sabão. Em inseminações com sêmen fresco e resfriado, a pipeta de inseminação era passada pela cérvix e o sêmen depositado na ponta do corno uterino onde se encontrava o folículo ovulatório. Na IA com sêmen congelado, as palhetas eram descongeladas em banho-maria a 37°C, por um minuto, sendo a inseminação realizada com pipeta flexível na ponta do corno uterino ipsilateral à ovulação.

As éguas inseminadas eram palpadas no dia seguinte, avaliando ovulação e condição uterina, sendo novamente inseminadas caso não houvessem ovulado em até 48 horas após a primeira IA. Se houvesse muito líquido intrauterino (LIU) eram lavadas com solução de RL até o conteúdo sair translúcido, recebendo três doses de ocitocina por dia até o terceiro dia pós ovulação.

3.2.8 Sincronização de receptoras

As éguas receptoras eram utilizadas entre o quarto (D4) e sétimo dia (D7) pós-ovulação, com preferência para o quinto dia (D5). A sincronização das receptoras era realizada a partir da ovulação da doadora. Então, separava-se de três a quatro receptoras para cada doadora, de acordo com a disponibilidade de estro no dia. Induzia-se a ovulação das receptoras, dois dias após a confirmação da ovulação da doadora, mantendo-a D4 no dia da transferência. Eventualmente, alguma receptora não era utilizada no D4, mantendo-se como uma opção para os demais dias, até o D7, quando então era administrada medicação luteolítica.

Era utilizado como protocolo hormonal de receptoras anovulatórias, primeiramente, a administração de estrógeno na dose de 2mg/égua por via IM. Os estrógenos acabam simulando as condições hormonais de estro, além de estimular a expressão de receptores no útero para P4, semelhante ao ciclo estral das éguas cíclicas previamente a ovulação (AUPPERLE et. al., 2000).

Após 72 horas da aplicação do estrógeno, através da ultrassonografia verifica-se a presença de edema uterino. Com o edema formado, ocorre a aplicação de P4 ou altrenogest injetável, simulando a ovulação, considerada como D0 (CARNEVALE et

al, 2000). A TE é executada 4 a 7 dias após a aplicação do progestágeno. Após o diagnóstico gestacional positivo, a égua é mantida com aplicações semanais de P4 de longa ação (LA) até que a placenta assuma a secreção de progesterona, aos 120 dias de idade fetal.

Outra opção também utilizada pelo médico veterinário para a sincronização de receptoras em anestro era o dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona, Primer® 1g (Progesterona). Após constatar por palpação retal e US que a égua apresentava folículos ovarianos de 25mm, o implante era preparado, retirando o cordão plástico e borrifando Terra-Cortril spray (Acetato de Oxitetraciclina + Dexametasona) para prevenir uma possível vaginite, em seguida era introduzido na vagina. O dispositivo era retirado somente para a inovulação do embrião e após recolocado, permanecendo de 8 a 9 dias.

Nos dois dias que antecediam a retirada do implante, a égua recebia uma dose de 1500mg de P4-300® (Acetato de Isoflupredona), via IM, para manter o nível de progesterona elevado no momento da retirada do implante. Também se fazia necessária a suplementação com P4-300® na dose de 1500mg/égua, IM, semanalmente até o 120º dia de gestação.

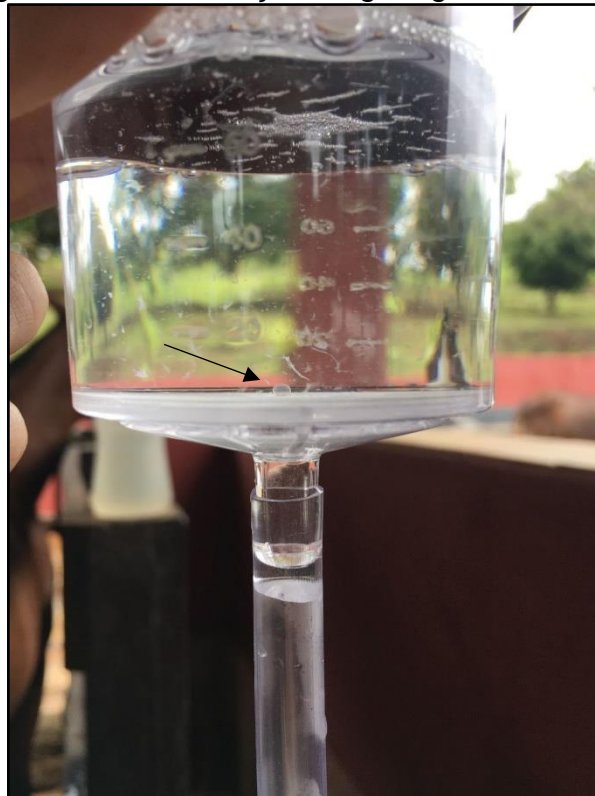
3.2.9 Coleta de embrião

As coletas de embrião eram normalmente realizadas no 8º dia pós-ovulação, sendo somente realizadas no 9º dia pós-ovulação em éguas inseminadas com sêmen congelado ou em éguas muito velhas. Antes da coleta, as receptoras eram palpadas e realizada a avaliação do CL, edema uterino, tônus e cérvix. Prévia a coleta era realizada a limpeza da região perineal.

A recuperação embrionária era realizada pelo sistema fechado de uma via. O médico veterinário direcionava a passagem da sonda de silicone pela cérvix, depois da retirada de ar do sistema. O balão da sonda era inflado e a mesma era tracionada gentilmente para trás selando a cérvix. Um litro de ringer lactato morno (30-35°C) era depositado no útero. Para retirada desse líquido, após massagem do útero por palpação retal, abriam-se os “clips” acoplados ao sistema, um deles antes do filtro do embrião e o outro após o filtro.

Em seguida, um litro de ringer lactato era novamente infundido e retirado. A cada passagem pelo filtro, era observado se o embrião já estava no copo coletor, interrompendo-se a coleta ao encontrá-lo (Figura 12).

Figura 12- Embrião com 8 dias (indicado pela seta) sobre o filtro do copo coletor, de égua doadora da raça Mangalarga Marchador.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.2.10 Manipulação do embrião

O filtro era levado ao laboratório após a lavagem. O conteúdo era colocado em uma placa de Petri para a procura do embrião com o auxílio de uma lupa (Figura 13). Quando um embrião era encontrado, esse era lavado, sendo em média passado por seis gotas de cerca de um 1mL de holding (meio de lavagem de embrião que contém nutrientes e antibióticos) (Figura 14).

Figura13- Organização do laboratório e equipamentos para manipulação do embrião.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Figura 14- Mesa aquecedora regulada em 37°C com meio holding e placa de Petri.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Após a lavagem, o embrião era colocado em uma pequena placa que continha o mesmo holding, à espera da transferência. Para ser inovulado o embrião era envasado em uma pipeta de IA em soluções alternadas de solução de manutenção e ar (Figura 15). A primeira coluna era composta de solução, a segunda de ar, a terceira de solução com embrião, a quarta de ar e a quinta de solução. Uma camisa sanitária plástica estéril era utilizada para cobrir a pipeta.

Figura 15- Pipeta contendo o embrião já envasado, note as colunas alternadas com solução e ar.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

3.2.11 Inovulação do embrião

Antes da transferência, realizava-se a escolha da receptora que seria utilizada. Para cada embrião recuperado existia em média 2 a 3 éguas disponíveis. Após a escolha da receptora, sua região perineal era bem limpa, com água e sabão, sendo a porção interior dos lábios vulvares lavada abundantemente com RL. No momento da inovulação, o médico veterinário posicionava a mão na vagina, guiando a pipeta pela cérvix e antes de ultrapassá-la, a camisa sanitária era tracionada para trás, sendo o embrião depositado no corpo uterino.

Todas as éguas receptoras de embrião, após serem inovuladas, recebiam uma dose de 10mg de Chemitril Injetável 10% (Enrofloxacina) associada a 1mL/50kg de Flumax® (Flunixin meglumina), IM, e Altrenigest® (Altrenogest) na dose de 1mL/égua. Durante o período de estágio foram acompanhadas 16 coletas de embrião com 14 embriões recuperados, obtendo uma taxa de recuperação embrionária de 87,5%% (14/16).

4 CONCLUSÃO

O estágio curricular obrigatório na área de reprodução equina requer do estudante uma bagagem teórica para poder aliar este conhecimento ao raciocínio prático. Além de dominar a fisiologia, é importante ter o conhecimento básico das biotecnologias reprodutivas empregadas na espécie equina para um acompanhamento da rotina na temporada de reprodução.

Nos dois locais de estágio foi possível acompanhar procedimentos e inclusive realizar inúmeros deles. Aliando teoria e prática o conhecimento se expande e aos poucos se aperfeiçoa. Além disso, a oportunidade de debater e questionar sobre os procedimentos faz com que o conhecimento aumente.

Em síntese, o estágio curricular obrigatório, além de um momento de aprendizado constante, permitiu ao aluno imergir na realidade dos profissionais que com isso trabalham, observando as dificuldades de trabalhar na área, além de oportunizar a obtenção de uma rede de contatos com a qual poderá contar para indicações de trabalho, troca de conhecimento e amizade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.119-129, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/RyJwfl4MrQLCY3FDDrj3mq9h/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 31 ago. 2021.

ALVARENGA, M.A.; TONGU, E.A.O. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.19-24, 2017. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p019-024%20\(RB656\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p019-024%20(RB656).pdf). Acesso em: 19 set. 2021.

ARAÚJO, R.R. **Estudo em larga escala dos efeitos da idade sobre os parâmetros reprodutivos e viabilidade de oócitos após injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) usando sêmen sexado**. São Paulo, 108f. Tese (Doutorado em Ciência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-04092015-162237/publico/RENO_ROLDI_DE_ARAUJO_Original.pdf. Acesso em: 02 set. 2021.

AUPPERLE, H. *et al.* Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine veterinary journal**, v. 32, n. 3, p. 228-232, 2000.

BERTOZZO, B.R.; *et al.* Vantagens e desafios das biotécnicas avançadas utilizadas na reprodução equina assistida: revisão bibliográfica. **B. Industr. Anim.**, Nova Odessa, v.71, n.1, p.84-93, 2014. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/pdfsbia/1396561590.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BETANCUR, G.R.; ESCOBAR, S.R. Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos. **Rev CES Med Vet Zotec.**, Medellín-Colombia, v. 6, n. 1, p.55-63, 2010. Disponível em: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/1500/1928>. Acesso em: 23 set. 2021.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Uterine involution and postpartum breeding. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.622-625.

BRINSKO, S.P., *et al.* **Manual of equine reproduction**. 3ª ed. Missouri: Elsevier, 2011. *E-book*.

BRÜCK, I. *et al.* Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Veterinary Journal**, v.24, p.58–59, 1992. Disponível em: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1992.tb02780.x>. Acesso em: 25 set. 2021.

CARNEIRO, G.F. Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões em equinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.158-166, out./dez. 2016. Disponível em:

[http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v40/n4/p158-166%20\(RB688\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v40/n4/p158-166%20(RB688).pdf). Acesso em: 31 ago. 2021.

CARNEVALE, E. M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 54, n. 6, p. 965-979, 2000.

CARNEVALE, E.M.; D.R. In Vitro Production of Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.367-371, 2012. Disponível em: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.054>. Acesso em: 23 set. 2021.

CARNEVALE, E.M. Advances in collection, transport and maturation of equine oocytes for assisted reproductive techniques. **Vet Clin Equine**, v.32, n.3, 2016. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1016/j.cveq.2016.07.002>. Acesso em: 25 set. 2021.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>, 2017 > Acesso em 23 set. 2021.

FERNANDES, C.B. **Contribuição para a clonagem em equinos por meio de transferência nuclear**. 138 p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/105978>. Acesso em: 30 ago. 2021.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A. Effects collection day on embryo recovery and pregnancy rates in nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**. 1999, 51:261. Disponível em: [https://sci-hub.se/10.1016/S0093-691X\(99\)91820-4](https://sci-hub.se/10.1016/S0093-691X(99)91820-4). Acesso em: 23 set. 2021.

GALLI, C. *et al.* Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001. Disponível em: [https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00486-1](https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00486-1). Acesso em: 23 set. 2021.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**. 1992, 2nd ed. Equiservices Publishing, Cross Plains. 642p.

MASERATI, M.; A.M. In vitro production of equine embryos and cloning: today's status. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.41, p.42-50, 2016. Disponível em: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.004>. Acesso em: 23 set. 2021.

McCUE, P. M. *et al.* Estrus. In: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v. 2, cap. 179, p. 1718- 1727.

MORRIS, L.H.A. The development of in vitro embryo production in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.50, p.712-720, 2018. Disponível em: <https://beva.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/evj.12839>. Acesso em: 23 set. 2021.

OGURI,N.; TSUTSUMI, Y. NON-SURGICAL RECOVERY OF EQUINE EGGS, AND AN ATTEMPT AT NON-SURGICAL EGG TRANSFER IN HORSES. *J. Reprod. Fert.*

1972, v.31, p.187-195. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4637635/>. Acesso em: 26 set. 2021.

PALHARES, R.C.F.T.; *et al.* Injeção intracitoplasmática de espermatozóides aplicada à reprodução equina. **Revista V&Z Em Minas**, n.142, p.40-43, Jul/Ago/Set 2019. Disponível em: <http://crmvmg.gov.br/RevistaVZ/Revista142.pdf#page=40>. Acesso em: 02 set, 2021.

PERRY, G. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v.38, n.4, 2020. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2019.pdf. Acesso em: 23 set. 2021.

REECE, W.O. **Dukes- Fisiologia dos Animais Domésticos**. 2017, 13^a ed. 725 p. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.

RODRIGUEZ, J., *et al.* Recovery of Equine Oocytes in Ambulatory Practice and Potential Complications. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 98, 2021. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1016/j.jevs.2020.103324>. Acesso em: 08 set. 2021.

SÁ, M.A.F. *et al.* Use of different pressures for transvaginal follicular aspiration in mares. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.69, n.3, p. 529-534, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318313825_Use_of_different_pressures_for_transvaginal_follicular_aspiration_in_mares. Acesso em: 08 set. 2021.
SQUIRES, E. L. Gonadotropin-releasing hormones. In: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v. 2, cap. 190, p. 1822.

SARAIVA, M.V.A.. *et al.* Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, 2010, v.34, n.4, p.206-221. Disponível em cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n4/p206-221.pdf. Acesso em: 04 out. 2021.

STAEMPFLI, S. A. Prostaglandins. In: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v. 2, cap. 187, p. 1797-1801

STOUT, T.A.E. Clinical Application of in Vitro Embryo Production in the Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, 2020. Disponível em: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103011>. Acesso em: 23 set. 2021.

TRECENTI, A.S.; ZAPPA, V. Clonagem animal: revisão de literatura. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, ano XI, n.20, jan. 2013. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/tlY0tGhDpRW1vrK_2013-6-21-15-43-38.pdf. Acesso em: 30 ago. 2021.