

UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS

BEATRIZ SOARES JUSTO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

SANTOS

2023

BEATRIZ SOARES JUSTO

Relatório de estágio curricular

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Metropolitana de Santos como parte do Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora:
Profa. Dra. Cristina de Fátima Lúcio

SANTOS

2023

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: JUSTO, Beatriz Soares.
Título: Relatório de Estágio Curricular.

Relatório de Estágio Curricular
Supervisionado apresentado à Faculdade
de Medicina Veterinária da Universidade
Metropolitana de Santos como parte do
Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Data: ___/___/_____

Banca examinadora

Membro: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Membro: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Elder, não mais presente em vida, que sempre me incentivou nos estudos e fez de tudo para que eu pudesse ter as melhores oportunidades.

À minha mãe, Adriana, por me ensinar a ser forte e persistente e me dar colo nos momentos de fragilidade.

Pais, obrigada por todo amor incondicional que me moldou a ser a pessoa que sou hoje, devo minha vida à vocês, amo vocês mais que tudo e prometo orgulha-los.

À minha irmã, Bruna, que me presenteou com meu afilhado, Lucca e meu sobrinho, Noah, que me fizeram conhecer o amor mais puro do mundo. Eu amo vocês.

Às minhas amigas de sala, Ana Carolina e Maria Clara, que tornaram o ambiente acadêmico mais leve e juntas alcançamos nosso sonho de nos tornamos médicas veterinárias.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cristina Lúcio. Pelas aulas maravilhosas que me inspiraram a seguir o caminho da reprodução, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade construída com a sala e empenho para a realização desse trabalho. Todo meu respeito à você.

Por último, ao meu namorado, Nicholas, que foi um verdadeiro alicerce por toda minha trajetória na faculdade, me dando motivação e força nos dias difíceis. Eu definitivamente não teria conseguido sem você. Obrigada por ser meu ponto de equilíbrio, eu te amo.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
2.1 Haras Melo Pinheiro	1
2.2 Introdução	1
2.3 Histórico.....	2
2.4 Descrição do local	2
2.4.1 Piquetes de enfermaria	2
2.4.2 Piquetes de parto	3
2.4.3 Piquetes de maternidade	4
2.4.4 Piquetes de éguas.....	4
2.4.5 Piquetes de potros	5
2.4.6 Piquetes de cavalos aposentados.....	6
2.4.7 Elíptico para salto em liberdade	6
2.4.8 Baias maternidade.....	7
2.4.9 Baias	7
2.4.10 Quarto de ração	8
2.4.11 Quarto de feno	9
2.4.12 Farmácia e Escritório	9
2.5.13 Laboratório.....	11
2.5.14 Tronco de contenção.....	11
2.5 Atividades realizadas	12
2.6 Considerações finais.....	14
RELATO DE CASO: TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO EM EQUINOS	15
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO	16
1. ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA ÉGUA.....	16
1.1 Vulva	17
1.2 Vestíbulo.....	17
1.3Vagina	18
1.4 Útero.....	18
1.5 Tuba uterina.....	19
1.6 Ovários.....	19
2. CICLO ESTRAL DA ÉGUA	20

2.1 Sazonalidade	20
2.2 Sistema hipotálamo-hipófise-gonadal	21
3. PROTOCOLOS DE MANIPULAÇÃO HORMONAL	22
3.1 Prostaglandinas.....	23
3.2 Estrógenos	23
3.3 Progesterona	24
3.4 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)	24
3.5 Hormônio Liberador De Gonadotrofina (GnRH).....	25
4. DINÂMICA FOLICULAR.....	25
4.1 Seleção folicular	26
4.2 Fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF)	26
5. ACOMPANHAMENTO ULTRASSONOGRÁFICO TRANSRETAL.....	27
5.1 Útero	27
5.2 Folículos	29
5.2.1 Diâmetro folicular.....	29
5.2.2 Conformação folicular	30
5.2.3 Camada anecogênica.....	31
5.3 Corpos lúteos	31
6. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	32
7. TRANSFERENCIA DE EMBRIÃO.....	34
8. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	38
9. RELATO DE CASO	40
10. DISCUSSÃO	49
11. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

No presente relatório será descrito de maneira geral as atividades realizadas entre os meses de agosto a novembro, no Haras Melo Pinheiro, que permitiram meu crescimento e aprimoramento profissional, além do relato de caso sobre Transferência de Embriões em Equinos.

2. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

2.1 Haras Melo Pinheiro

Localizado em Porto Feliz – SP, o haras investe na criação de Cavalos Brasileiros de Hipismo. Supervisionada pela médica veterinária Luiza Isaac, a rotina de reprodução é baseada na inseminação, coleta e transferência de embriões de éguas atletas. O haras conta com outras duas médicas veterinárias: Larissa Duarte, especialista em medicina neonatal, responsável pelos potros desde o 5º mês de gestação até os 5 meses de vida e a partir dos 6 meses de idade, os potros ficam sob os cuidados da M.V. Priscila Sampaio, clínica geral e especialista em medicina esportiva.

2.2 Introdução

O estágio curricular obrigatório, realizado sob a supervisão da Médica Veterinária Luiza Isaac, me proporcionou experiências que me permitiram crescer profissionalmente e me aprofundar no mundo da reprodução equina.

2.3 Histórico

A princípio, o Haras Melo Pinheiro foi construído em 2019 para o desfrutamento pessoal de Lina Carneiro, amazona cearense que queria explorar a genética dos seus próprios cavalos. Ao perceber o potencial dos produtos, decidiu expandir a propriedade e investir na reprodução, criação e venda de cavalos brasileiro de hipismo.

2.4 Descrição do local

A parte externa do haras conta com o total de 26 piquetes, sendo eles, 5 piquetes de enfermaria, 3 piquetes de parto, 3 piquetes de maternidade, 4 piquetes de potros, 7 piquetes de éguas e 4 piquetes de cavalos aposentados, elíptico de salto em liberdade e galpão de armazenamento.

O pavilhão abriga 3 baias maternidade e 9 baias comuns, quarto de ração, quarto de feno, farmácia, escritório, laboratório, quarto para o plantão, tronco de contenção e copa.

2.4.1 Piquetes de enfermaria

Os piquetes destinados à enfermaria (Figura 1) abrigam animais doentes ou em recuperação de procedimentos médicos. São piquetes de área menor, com o objetivo de restringir o movimento dos animais, favorecendo o repouso. Para facilitar a observação e o manejo dos animais, ficam localizados próximos à sede.



Figura 1. Piquete de enfermaria.

2.4.2 Piquetes de parto

Reservados para éguas com apresentação de sinais de parto ou 10 dias antes da data prevista, até o dia do parto. São próximos à sede para melhor observação e realização dos plantões noturnos (Figura 2).



Figura 2. Piquete de parto.

2.4.3 Piquetes de maternidade

Abrigam as mães e os potros (Figura 3) a partir do primeiro dia de vida até o final da cura do umbigo e término do protocolo de imunização. São próximos à sede para facilitar o manejo e melhor observação.



Figura 3. Piquete de maternidade.

2.4.4 Piquetes de éguas

São reservados de acordo com a finalidade e afinidade entre os animais. São 7 piquetes para éguas, sendo eles: quatro de matrizes (Figura 4), um de receptoras e dois de gestantes.



Figura 4. Piquete de égua.

2.4.5 Piquetes de potros

Ao total são 5 piquetes de potros, um para cada geração, desde 2019. A imagem é do novo piquete da geração de 2023 (Figura 5).



Figura 5. Piquete de potros ao pé.

2.4.6 Piquetes de cavalos aposentados.

Abrigam cavalos aposentados que não são mais utilizados no esporte ou reprodução (Figura 6).



Figura 6. Piquete de cavalo aposentado.

2.4.7 Elíptico para salto em liberdade

Utilizado para análise do potencial para salto dos potros em criação. Os potros são colocados no elíptico e saltam pequenos obstáculos em liberdade (Figura 7).



Figura 7. Elíptico para salto em liberdade.

2.4.8 Baias maternidade

Baias de 4x8 metros, utilizadas para potros ao pé em recuperação que precisam de maior atenção, oferecendo melhor supervisão (Figura 8).



Figura 8. Baia de maternidade.

2.4.9 Baias

De tamanho 4x4 metros, totalizam nove baias comuns. Utilizadas para animais lesionados, em tratamento ou acompanhamento do ciclo reprodutivo (Figura 9).



Figura 9. Baia comum.

2.4.10 Quarto de ração

Estoque de ração e suplementos, reabastecido quinzenalmente (Figura 10).



Figura 10. Quarto de ração.

2.4.11 Quarto de feno

Armazenamento de feno e serragem, reabastecido semanalmente (Figura 11).



Figura 11. Quarto de feno e serragem.

2.4.12 Farmácia e Escritório

A farmácia e o escritório se integram no mesmo ambiente. Armazenamento de fichas dos pacientes, medicamentos e materiais hospitalares (Figuras 12, 13 e 14).



Figura 12. Farmácia.



Figura 13. Farmácia.



Figura 14. Escritório integrado à farmácia.

2.5.13 Laboratório

Armazenamento e manipulação de sêmen congelado, manipulação de embriões, armazenamento de banco de colostro e plasma hiperimune. Armazenamento dos materiais referentes à reprodução (Figuras 15 e 16).



Figura 15. Laboratório e freezer.



Figura 16. Botijões de nitrogênio armazenando os sêmens congelados.

2.5.14 Tronco de contenção

Contenção dos animais principalmente para palpação transretal, acompanhamento folicular, inseminação artificial e lavado uterino das éguas para reprodução e ultrassonografia e palpação de éguas gestantes (Figura 17).

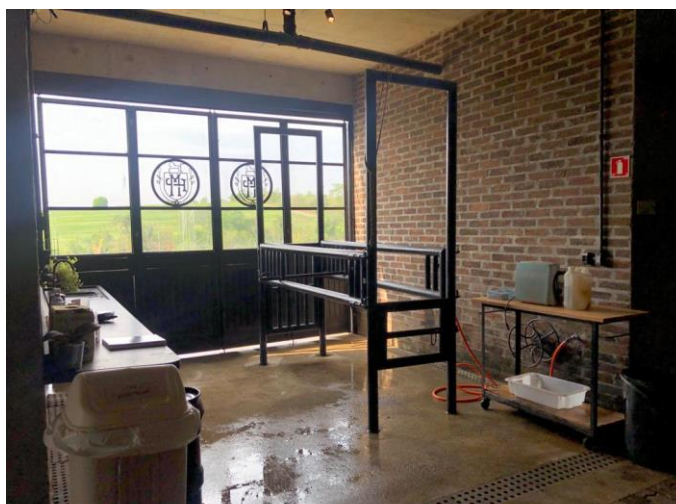


Figura 17. Tronco de contenção.

2.5 Atividades realizadas

As responsabilidades como estagiária baseavam-se no auxílio do manejo sanitário dos cavalos, com protocolos individuais para potros, cavalos adultos e éguas gestantes e manejo dos cavalos doentes, com administração de medicamentos, suplementos e massagens, acompanhando a enfermeira e o residente. Na parte da reprodução, prestava-se auxílio à veterinária no acompanhamento folicular ultrassonográfico de éguas, na realização de inseminação artificial, coleta e transferência de embriões, diagnóstico de gestação e realizações de plantões noturnos para partos assistidos. O estágio foi realizado do dia 01 de agosto ao dia 30 de novembro, das 7h30 às 17h, além dos x plantões de 12 horas, totalizando xxx horas de carga horária.

No período de 23 de agosto até 18 de outubro foram realizadas 35 inseminações para TE e 19 coletas foram positivas, sendo 3 delas coletas gemelares, resultando em 22 embriões no total (Tabela 1). Das 22 transferências realizadas, apenas um embrião foi perdido. Resultando em uma taxa de sucesso de 60%.

Tabela 1. Procedimentos de IA, TE e DG realizados entre 23/08 e 18/10 (Continua)

DOADORA	Inseminação	Coleta	Diagnóstico de gestação
RIVONA	23/08	-	
ELETRICE	23/08	-	
MACARENA	23/08	-	
CAPADÓCIA	24/08	+	06/09 +
BETINA	30/08	+	12/09 +
CHARENTES	01/09	+	15/09 +
BELIZE	01/09	+	15/09 -
CALVARA	04/09	-	
CALEDONIA	04/09	-	
ELETRICE	08/09	-	
CAPADÓCIA	10/09	+	24/09 +
MAGDA	13/09	+	26/09 +
BETINA	18/09	Manteve	30/09
CHARENTES	18/09	-	
MACARENA	22/09	-	
NORAH	22/09	-	
BELIZE	22/09	+	01/10 +
PRETTY ELLEN	22/09	+	01/10 +
TANGERINA	24/09	++	07/10 ++
MAGDA	27/09	+	09/10 +
CALEDONIA	27/09	-	
QBELLA	29/09	-	

(Continuação)

DOADORA	Inseminação	Coleta	Diagnóstico de gestação
CAPADOCIA	29/09	+	11/10 +
NIGHTSTAR	29/09	+	11/10 +
COALILA	01/10	++	14/10 ++
KOALA	05/10	++	14/10 ++
MACARENA	11/10	-	
NORAH	11/10	+	22/10 +
CALVARA	11/10	-	
CALEDONIA	14/10	+	22/10 +
CAPADOCIA	14/10	+	22/10 +
BETHANIA	14/10	+	22/10 +
NIGHTSTAR	17/10	-	
RIVONA	18/10	+	30/10 +

2.6 Considerações finais

A imersão na rotina do haras foi de extrema importância para o meu crescimento profissional. O comprometimento de toda a equipe foi um verdadeiro exemplo para que eu busque me tornar uma médica veterinária de excelência. Durante o estágio consegui colocar em prática os temas abordados em sala de aula e tive diversas experiências que puderam somar com a teoria que foi ensinada e mostrar a importância de estar sempre atualizada.

RELATO DE CASO: TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO EM EQUINOS

RESUMO

A transferência de embriões é uma biotecnologia utilizada para maior exploração genética, que possibilita a obtenção de vários potros de uma mesma égua por estação reprodutiva. Consiste na retirada de um embrião do útero de uma égua doadora e transferência para o útero de uma égua receptora. Para isso, é importante que o médico veterinário tenha domínio da anatomia e da fisiologia do reprodutiva da égua. O objetivo do relato foi analisar a taxa de confirmação de recuperação embrionária e taxa de prenhez das éguas receptoras entre os meses de agosto e novembro no Haras Melo Pinheiro em Porto Feliz – SP.

Palavras-chave: transferência, embrião, doadora, receptora.

ABSTRACT

The embryo transfer is a biotechnology used for greater genetic exploration, enabling the acquisition of several foals from the same mare in a single reproductive season. It involves removing an embryo from the uterus of a donor mare and transferring it to the uterus of a recipient mare. For this, it is important that the veterinarian has a thorough understanding of the anatomy and reproductive physiology of the mare. The objective of the report was to analyze the confirmation rate of embryo recovery and the pregnancy rate of recipient mares between the months of August and November at Haras Melo Pinheiro in Porto Feliz – SP.

Keywords: transfer, embryo, donor, receiver.

INTRODUÇÃO

A criação de cavalos destinados ao segmento esportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas, devido à importância do cavalo na prática de diversos esportes e lazer, e não mais apenas no transporte ou tração animal, é incontestável o crescimento mundial da equideocultura (Mariz, 2008).

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (Ginther, 1992).

Contudo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos, sendo a transferência de embrião (TE) a ferramenta mais promissora para essa finalidade, tornando-se assim, cada vez mais comum no mundo equino para obtenção de potros (Arruda et al., 2001).

Esta biotécnica tem sido utilizada como uma gestão de procedimentos para a produção de múltiplos potros por égua durante o ano, o melhor aproveitamento de éguas que possuam alto valor zootécnico e sejam idosas ou que estejam em atividade esportiva (Arruda et al., 2001).

A complexidade da TE é relativamente baixa quando comparada com técnicas mais avançadas. A dificuldade de um programa de TE está na organização e coordenação de componentes separados que afetam o sucesso da taxa, como o manejo da égua doadora, qualidade da égua receptora e da sincronização e habilidade/técnica na transferência (Ginther, 1992).

1. ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA ÉGUA

Para que seja possível o acompanhamento do ciclo reprodutivo, é importante ter conhecimento sobre a fisiologia e anatomia do sistema reprodutor da égua, sendo ele composto por dois ovários, duas tubas uterinas ou cornos uterinos, útero, cérvix,

vagina e vulva (Figuras 19 e 20). Esse sistema é responsável pela produção do gameta feminino (oócito), o qual depois poderá ser fecundado pelo gameta masculino (espermatozoide), e fornece um ambiente adequado para a fecundação, desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação (KLEIN, 2014).

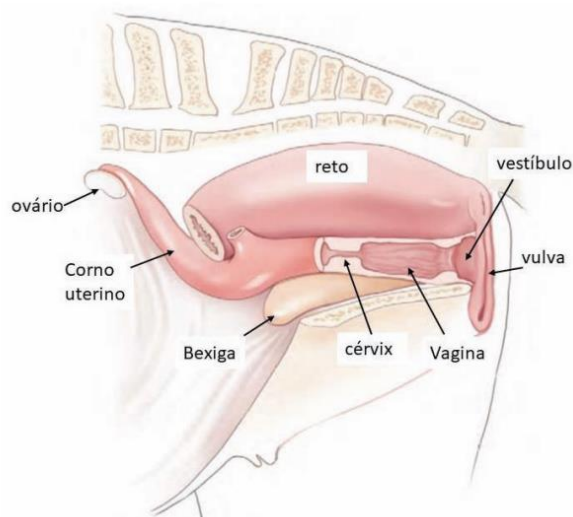


Figura 19. Anatomia do trato reprodutivo da égua (adaptado de Brinsko, 2011).

1.1 Vulva

Considerada a primeira barreira de proteção do trato reprodutivo. A vulva é formada por dois lábios que se encontram em uma comissura dorsal e outra ventral circundando a abertura vulvar vertical. A comissura dorsal é aguda e a comissura ventral é arredondada. O clitóris se posiciona na comissura ventral em uma fossa amplamente coberta por uma prega mucosa. Ele se torna bastante proeminente na égua durante o cio, quando é exposto pelos movimentos dos lábios (KÖNIG, 2016).

1.2 Vestíbulo

O vestíbulo é a parte caudal da vagina. Ele se prolonga desde o óstio externo da uretra até a vulva externa e combina funções reprodutoras e urinárias. A parede do

vestíbulo contém glândulas vestibulares, cuja secreção mantém a umidade da mucosa do vestíbulo e facilita o coito e o parto. Durante o cio, o odor da secreção possui um efeito sexualmente estimulante sobre o macho (KLEIN, 2014).

1.3 Vagina

A vagina é o órgão copulatório feminino. Ela se prolonga desde o óstio uterino externo até o óstio externo da uretra, portanto, ela pertence apenas ao trato reprodutivo.

Cranialmente ao óstio externo da uretra, apresenta uma prega transversa vestibulo-vaginal, que constitui a segunda barreira anatômica de proteção. Em éguas virgens a prega prolonga-se em ambos os lados formando o hímen. O fórnice vaginal é um recesso anular formado pela junção das paredes vaginais cranialmente (orifício externo da cérvix) (KÖNIG, 2016).

1.4 Útero

O útero da égua possui um corpo amplo e dois cornos divergentes, os quais normalmente se elevam em direção ao teto do abdome acima da massa intestinal. O colo do útero é comparativamente pequeno e pode ser facilmente palpado retalmente. O colo do útero com paredes espessas pode ser palpado transretalmente e forma um esfíncter que controla o acesso ao útero. O lúmen do colo é o canal cervical, o qual é formado por pregas mucosas que frequentemente provocam sua oclusão.

Internamente, o útero é revestido por 3 camadas: paramétrio, miométrio e endométrio. O endométrio reveste o lúmen do útero. Sua espessura varia dependendo do estágio do ciclo fértil, e é coberto por uma membrana serosa (perimétrio) a qual é contínua com o ligamento largo. Vários vasos sanguíneos e fibras nervosas situam-

se no paramétrio, o local onde a camada dupla do ligamento largo se separa para envolver o útero (KLEIN, 2014).

1.5 Tuba uterina

Também chamado de corno uterino. Recebem e transportam os ovócitos para o útero. Elas também conduzem o espermatozóide em sua ascensão. A fertilização normalmente ocorre no interior das tubas. A extremidade ovariana da tuba uterina que recebe o oócito após a ovulação assume a forma de um funil e é denominada infundíbulo (KLEIN, 2014).

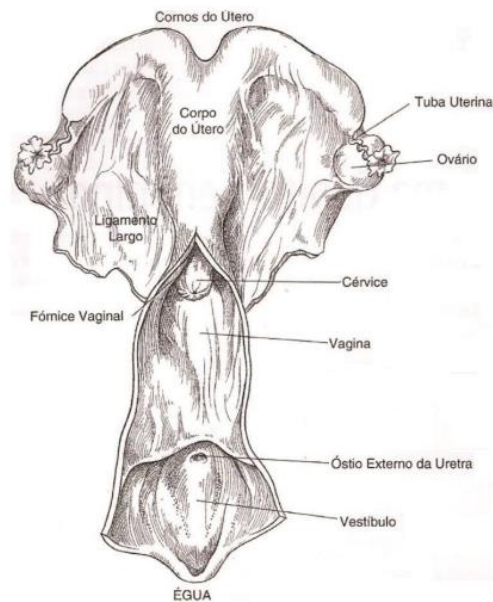


Figura 20. Representação esquemática do trato reprodutivo da égua.
Fonte: Fradson, 2014.

1.6 Ovários

A sua posição é variável, mas geralmente estão situados ventralmente entre a 4ª e 5ª vértebra lombar. O ovário direito, geralmente encontra-se mais cranial e dorsal.

Em uma égua adulta, os ovários apresentam tamanho variável a depender da época do ano, entre 2-4cm de comprimento no período de anestro e 6-8cm na época reprodutiva. Apresentam uma zona cortical interna, onde se encontram estruturas foliculares e luteínicas, e uma zona medular externa, composta por células intersticiais, que fornecem suporte a porção cortical. Possuem uma superfície convexa, por onde se estabelece a irrigação e enervação e uma superfície côncava livre, onde se situa a fossa ovariana, local onde os folículos maduros se irrompem. (Figura 21). Essa conformação apresenta um formato de “feijão” (KÖNIG, 2016).

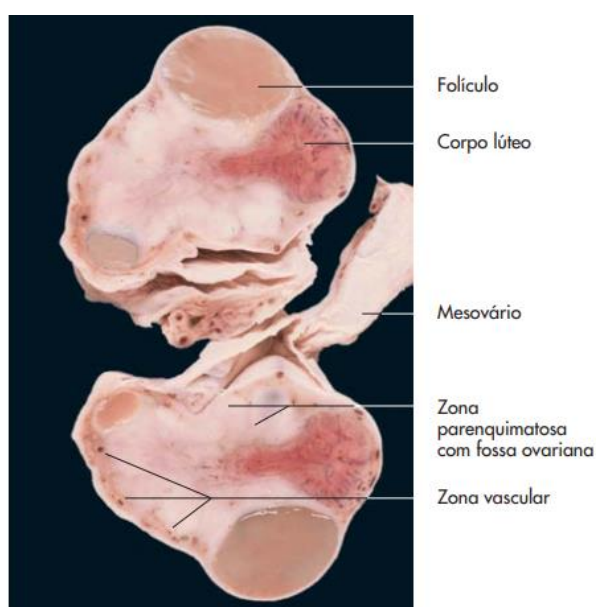


Figura 21. Ovário de égua: corte transversal. Fonte: (KÖNIG, 2016).

2. CICLO ESTRAL DA ÉGUA

2.1 Sazonalidade

As éguas são categorizadas como poliéstricas estacionais, ou seja, animais que apresentam ciclos estrais consecutivos em épocas de fotoperíodo crescente (primavera e verão). O ciclo estral, considerado como o intervalo entre as ovulações,

tem a duração entre 21 e 24 dias e consiste nas fases de proestro, estro, metaestro e diestro. Na égua, os períodos de metaestro e proestro não são muito bem definidos, então é comum trabalhar analisando apenas o estro e o diestro (WILLIAM, 2017).

2.2 Sistema hipotálamo-hipófise-gonadal

A menor concentração de melatonina faz com que o hipotálamo secrete o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) de maneira pulsátil, estimulando a hipófise, desencadeando o eixo (DUKES, 2017). (Figura 22).

Os gonadotrofos da adeno-hipófise produzem dois hormônios: o hormônio foliculoestimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Nas fêmeas, o FSH estimula o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Além disso, provoca a secreção de estrogênios pelas células da parede do folículo em desenvolvimento. Os estrogênios induzem alterações no trato reprodutor e a égua apresenta sinais comportamentais de cio, representando a fase do estro, com duração de 5 a 9 dias. O estrogênio bloqueia a secreção de FSH na hipófise por feedback negativo, para que não haja mais recrutamento. (DUKES, 2017).

O LH é responsável pela maturação do folículo e indução da ovulação, que ocorre entre 24 e 48 horas antes do fim do estro, além disso, faz com que as células que compõem o folículo ovulado modifiquem o seu fenótipo, tornando-se células secretoras de progesterona e formando uma estrutura denominada corpo lúteo (CL), dando início a fase do diestro, que dura em média 14 dias. A progesterona é necessária para a preparação do útero para a implantação de um óvulo fertilizado e bloqueia, também por feedback negativo, a secreção de GnRH do hipotálamo. Caso não haja a fecundação, haverá a produção de prostaglandina F2 alfa (PF2 α) pelo endométrio, provocando a luteólise e conseqüentemente a diminuição de concentração de progesterona e aumento de secreção de GnRH. O tempo entre a luteólise e o início do novo cio varia de acordo com o diâmetro do folículo luteinizado (WILLIAM, 2017).

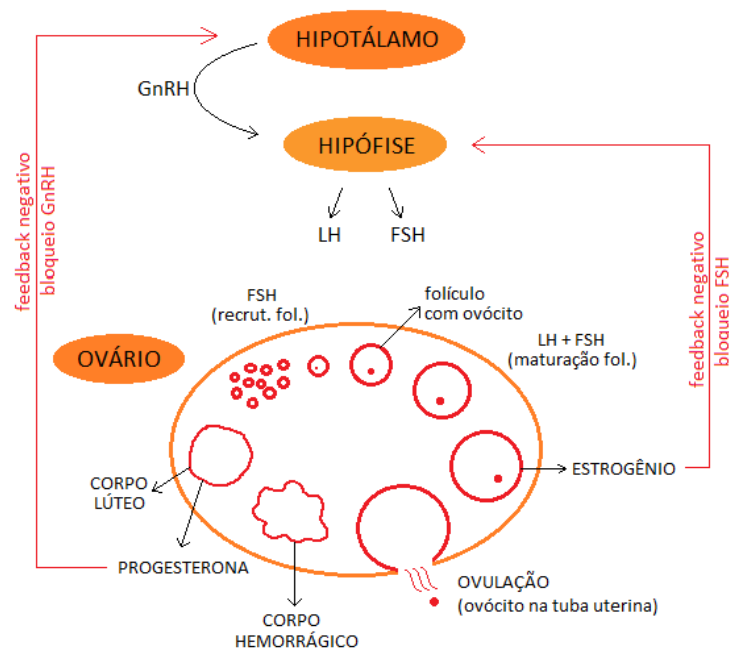


Figura 22. Esquemática do sistema hipotálamo-hipófise-gonadal. Fonte pessoal.

3. PROTOCOLOS DE MANIPULAÇÃO HORMONAL

A base da TE consiste em determinar o momento ideal de cobertura ou inseminação da doadora, e preparar a receptora para receber o embrião no dia adequado. Diante disso, muitas das vezes é necessária a utilização de protocolos hormonais para sincronizar o ciclo da doadora e da receptora, e acompanhar de maneira mais precisa o desenvolvimento folicular e uterino. Para isso utiliza-se os hormônios relacionados à fisiologia reprodutiva, na tentativa de mimetizar, induzir e/ou controlar a ovulação e desenvolvimento uterino nas fêmeas.

Os principais hormônios usados para controle da atividade ovariana nos protocolos de TE são: Prostaglandina, Estrógenos, Progesterona, hCG e GnRH. Abaixo estão descritas as principais atividades e funções desses hormônios (HAFEZ, JAINUDEEN, ROSNINA, 2004) (Quadro 1).

3.1 Prostaglandinas

Na reprodução equina, a prostaglandina mais utilizada é a prostaglandina F2 α (PGF2 α). A PGF2 α tem função luteolítica primária nas éguas, promovendo a lise do corpo lúteo em éguas não gestantes. Fisiologicamente esse hormônio promove a luteólise entre o 13° e 16° dia do ciclo estral. (FARIA, GRADELA, 2010).

Ainda de acordo com os autores citados anteriormente, a PGF2 α pode ser usada para acabar com uma fase luteal persistente, controlar o tempo de ovulação, sincronizar o estro, tratar animais com endometrite, eliminar pseudogestação, induzir o parto e estimular contração uterina, atuando no transporte espermático e na motilidade uterina.

3.2 Estrógenos

Estrógenos (E2), são hormônios esteroides, associado ao estro, sendo produzidos pelos folículos ovarianos e pela unidade feto-placentária. Nas éguas cíclicas, o estrógeno é secretado um ou dois dias pré-ovulação, e sua concentração sérica reduz ao atingir o diestro. Administrar estradiol em éguas em anestro pode-se induzir sinais de estro dentro de 3 a 6 horas, sendo essa utilização interessante quando quer se preparar éguas para servirem de manequim na coleta de sêmen.

Além da ação indutora de estro, a administração de estradiol (50mg, IM) ou de cipionato de estradiol (50mg, IM) após a ovulação em éguas cíclicas suprime o desenvolvimento dos folículos, não alterando a função luteal, sendo úteis em programas de sincronização de estro e ovulação associados à progesterona em éguas não cíclicas. (FARIA, GARDELA, 2010).

3.3 Progesterona

A progesterona é secretada pelas células luteínicas do CL, pela placenta e glândulas adrenais. Ela prepara o endométrio para a prenhez, aumenta a secreção das glândulas do endométrio e inibe a motilidade do miométrio. Auxilia no desenvolvimento do tecido secretor da glândula mamária, inibe o cio e o pico pré-ovulatório de LH. O uso da progesterona na TE, vai auxiliar na manutenção de gestação, sincronização do estro e ovulação de éguas cíclicas, além de induzir um ciclo artificial de P4 em receptoras que estão recebendo os embriões (HAFEZ, JAINUDEEN, ROSNINA, 2004).

3.4 Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

A hCG é uma glicoproteína hormonal, produzida pelas células trofoblásticas sinciciais dentro dos líquidos maternos. Ela interage com receptores de LH, promovendo a manutenção do corpo lúteo no começo da gestação e na secreção de progesterona (P4) (FARIA, GRADELA, 2010).

Ainda de acordo com os autores citados anteriormente, a hCG é uma proteína quimicamente diferente do LH, porém, a atividade biológica primária de ambas é parecida. Desse modo a via placentária é responsável pelo desenvolvimento de imunotolerância materna local, tendo a função de proteger o feto no primeiro trimestre de gestação.

Tendo ação semelhante ao LH, a hCG está sendo usada para indução da ovulação em éguas, reduzindo a duração de estro e o intervalo de ovulação (dentro de 48 horas). A diminuição no número de inseminações e de coberturas a cada estro aumenta os índices de fertilidade e de concentração plasmática de P4 e conseqüentemente a taxa de prenhez (FARIA, GRADELA, 2010).

3.5 Hormônio Liberador De Gonadotrofina (GnRH)

O GnRH estabelece uma ligação do sistema endócrino e nervoso, assim, quando há resposta ao estímulo nervoso, libera pulsos de GnRH no sistema porta-hipotálamo-hipofisário, induzindo a hipófise liberar LH e FSH. Pode ser usado para iniciar crescimento folicular ou induzir secreção de FSH em éguas em anestro, além de promover a ovulação por ação direta nas secreções hipofisárias de LH (FARIA, GRADELA, 2010).

Quadro 1. Hormônios utilizados e suas principais funções	
Prostaglandinas	Luteólise – início de novo cio
Estrógenos	Preparação do útero
Progesterona	Manutenção da gestação
Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)	Indutor de ovulação de ação rápida
Hormônio Liberador De Gonadotrofina (GnRH)	Indutor de ovulação de ação lenta e indutor de cio em éguas acíclicas

4. DINÂMICA FOLICULAR

O termo “onda folicular” compreende um conjunto de fenômenos foliculares que obedecem à seguinte sequência: recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia. Durante o recrutamento, ocorre o crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela fase de seleção, na qual um ou alguns folículos mantêm o padrão de crescimento, em detrimento dos demais que começam um processo de regressão ou atresia. Nas espécies monovulatórias, normalmente, o folículo que continua a crescer é considerado dominante (fase de dominância); este secreta elevada quantidade de estrógeno e é sensível ao estímulo ovulatório desempenhado pelo padrão de liberação do LH (Driancourt, 2001).

4.1 Seleção folicular

A seleção folicular é um mecanismo pelo qual um (ou alguns) dos folículos recrutados se torna dominante, e exerce um efeito inibitório indireto sobre os demais e, além disso, é capaz de ovular. Eventualmente dois folículos são selecionados, desenvolvendo-se em codominância. A seleção folicular ocorre no fim da fase de crescimento comum, quando o folículo dominante cresce em uma taxa contínua, e os folículos subordinados regridem ou crescem temporariamente em uma taxa reduzida (Ginther, 2000; Ginther et al., 2001; Beg e Ginther, 2006).

As concentrações de FSH diminuem gradativamente a partir do surgimento do pico do FSH quando o maior folículo da onda atinge 13 mm, sendo que as baixas concentrações de FSH são temporariamente associadas com a seleção folicular. Aparentemente, quando o maior folículo alcança um estágio decisivo de desenvolvimento, uma rápida ativação do mecanismo de desvio bloqueia o segundo maior folículo antes de este alcançar um diâmetro decisivo. (Ginther, 2000).

Quando os folículos alcançam aproximadamente 13 mm, eles secretam concentrações aumentadas de inibina durante a fase de crescimento comum. O estradiol aumentado é secretado pelo maior folículo sob influência de concentrações aumentadas de LH. Aparentemente, o aumento no estradiol atua em conjunto com a inibina para continuar a redução nas concentrações de FSH após o desvio. O LH elevado continua a estimular a produção de estradiol por meio do desenvolvimento do folículo dominante e tem um efeito positivo no diâmetro do folículo dominante dentro de dois dias após o início do desvio (Ginther et al., 2001).

4.2 Fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF)

Durante as fases de crescimento e atresia folicular, ocorre uma reorganização dos capilares sanguíneos a fim de suprir as necessidades teciduais. Esse processo é definido como angiogênese e é dependente da produção de fatores angiogênicos específicos (Ponchirolli, 2003).

O desvio do diâmetro entre os folículos dominantes e subordinados em éguas cíclicas é associado com um aumento diferencial no fluxo sanguíneo nos folículos dominantes. A vascularização aumentada supostamente fornece aporte essencial para o desenvolvimento de folículos ovulatórios. O principal estimulador da angiogênese é o VEGF, e as concentrações de VEGF no fluido folicular têm se mostrado, diferencialmente, aumentadas nos folículos dominantes ovulatórios de éguas. A vascularização reduzida dos folículos transicionais foi atribuída aos baixos níveis de VEGF e levou ao suporte limitado de gonadotrofina, resultando em deficiências de desenvolvimento e funcionais (baixa capacidade esteroidogênica) nestes folículos (Donadeu e Watson, 2007). Segundo Beg e Ginther (2006), um aumento na vascularização proporciona ao folículo a vantagem de receber suprimento preferencial de fatores de crescimento, gonadotrofinas, precursores esteróides e outros nutrientes necessários para seu desenvolvimento contínuo.

O VEGF estimula a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular. Uma camada anecogênica expandida dentro da parede do folículo dominante se torna-se aparente um dia antes da ovulação e foi atribuída à vascularização aumentada (Gastal et al., 2006)

5. ACOMPANHAMENTO ULTRASSONOGRÁFICO TRANSRETAL

5.1 Útero

A avaliação da ecotextura uterina é um dos sinais mais utilizados e mais facilmente visualizados para avaliação do ciclo reprodutivo nas éguas. O útero durante o período de estro sofre a ação do E2 produzido pelos folículos dominantes se desenvolvendo nos ovários. O E2 pode realizar sua ação uterina e com isso é possível observar no US um aumento de edema presente nas pregas uterina, as quais, se apresentam como áreas enegrecidas que aumentam progressivamente conforme se aproxima a ovulação. O edema uterino se apresenta de maneira heterogênea e se

assemelha a uma roda de carroça (MOREL, 2003). Durante o período de diestro, em virtude dos altos níveis de P4 produzidos pelo corpo lúteo, o útero apresenta-se no US com uma forma arredondada a ovalada, homogênea e em tons de cinza de intensidade intermediária (SAMPER, 2009).

O edema endometrial se inicia com o final do período de diestro e início da fase estrogênica do ciclo. Uma vez que isso ocorra, o edema endometrial aumenta progressivamente com a proximidade do estro (Figura 23). Porém, quando se atinge o período de 48 - 24 horas que antecedem a ovulação, tem-se uma redução dos níveis do edema endometrial, podendo estes atingir escores 0 ou 1 no momento da ovulação. Após a ovulação o edema uterino não deve persistir por mais de 36 horas, em uma situação fisiológica (CÔRTE et al., 1993; SAMPER et al., 2007; SAMPER, 2009; DASCANIO E McCUE, 2014).

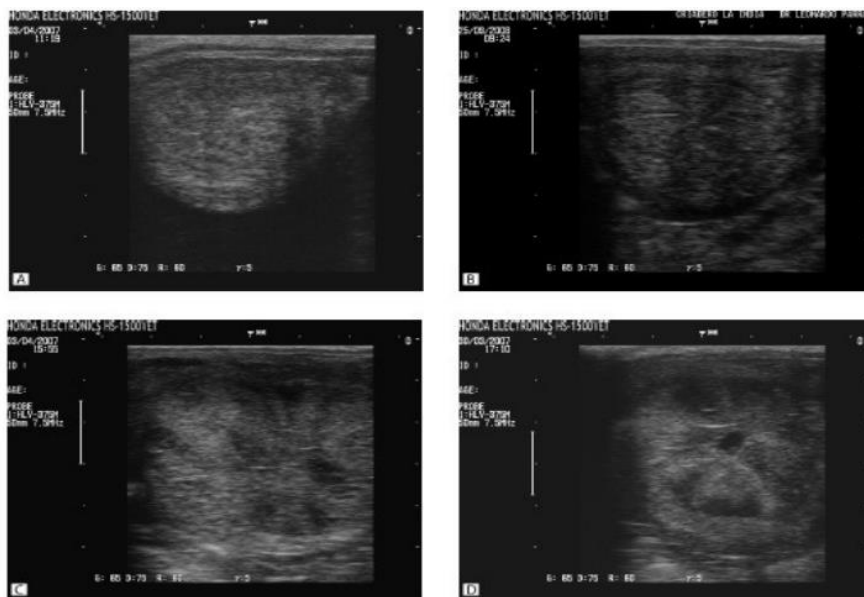


Figura 23. Evolução do edema uterino acompanhado pela ultrassonografia durante o período de estro de uma égua. Aumento do grau do edema conforme aumentam a heterogeneidade e as áreas anecóicas da imagem. A - Edema grau 0; B - Edema grau 1; C - Edema grau 2; D - Edema grau 3. Fonte: Paredez, et al, 2012.

5.2 Folículos

5.2.1 Diâmetro folicular

A observação dos folículos ao US acontece com a visualização de uma estrutura arredondada a ovalada (podendo variar de forma dependendo do seu grau de desenvolvimento). Os folículos antrais apresentam anecóico na imagem ultrassonográfica, devido a presença de líquido folicular em seu antro (FILHO, 2010). O diâmetro folicular também é um dos parâmetros mais utilizados para se estimar o momento da ovulação (Figura 9). A grande maioria das éguas ovula folículos que vão de 30 - 70 mm de diâmetro. Após a emergência da onda folicular o folículo dominante tem potencial de crescimento de 2,0 - 3,0 mm por dia (SAMPER et al., 2007). A parede do folículo aparenta uma cápsula no exame ultrassonográfico, sendo esta parede composta pela teca externa, interna, membrana basal e pela camada de células da granulosa. Esta parede sofre alterações de conformação no decorrer do desenvolvimento folicular, podendo estas alterações serem utilizadas como sinais da proximidade da ovulação.

O acompanhamento do diâmetro folicular é um parâmetro muito útil na predição do momento da ovulação, estando este exemplificado na Figura 13. Se sabe que a ovulação em éguas ocorre na grande maioria das vezes próxima as 48 horas anteriores ao final do estro. Além disso, no momento da ovulação os folículos apresentam entre 30 e 70 mm, de diâmetro, porém a maioria das ovulações ocorre com diâmetros foliculares variando de 40 - 45 mm (podendo ocorrer ovulações de folículos maiores e menores que os padrões citados de acordo com a raça do animal). Uma vez que se utiliza como parâmetro de crescimento folicular, de 2,0 - 3,0 mm por dia, consegue-se fazer uma estimativa para quando ocorrerá a ovulação. Outro aspecto que deve ser levado em consideração para se utilizar do diâmetro folicular como parâmetro para se determinar o momento da ovulação é o fato de que o diâmetro máximo do folículo é determinado pela época do ano, a raça, além da variação individual de cada animal. Os folículos ovulatórios geralmente são maiores na época do início da estação reprodutiva da espécie quando comparados aos

folículos ovulatórios observados no restante do período reprodutivo (CÔRTE et al., 1993; SAMPER et al., 2007; MOURA, 2012; DASCANIO E McCUE, 2014).

Além da sua utilização para estimativa do período de ovulação, o diâmetro folicular é uma informação vital quando se tem a intenção de se utilizar de indutores de ovulação no manejo reprodutivo das éguas. Porém, o folículo só se torna responsivo aos indutores de ovulação a partir do momento em que este atinge o diâmetro de 35 mm. Entretanto, é importante se ter em mente que os folículos de éguas sob o efeito de indutores de ovulação tendem a ovular com diâmetros menores quando comparados aos folículos de éguas sem o uso destes indutores (SAMPER et al., 2007)

5.2.2 Conformação folicular

No início do estro a maioria dos folículos apresenta um formato arredondado/esférico. Porém, com a proximidade da ovulação, a maioria dos folículos sofrem alterações em sua conformação (Figura 24). Isso ocorre com maior frequência a partir das 24 horas que antecedem a ovulação, sendo observado na maioria dos folículos ovulatórios a partir das 4 horas anteriores à ovulação. Estas mudanças conformacionais, estão associadas ao processo de migração do folículo para a fossa de ovulação (CÔRTE, 1993; ULIANI, 2012).

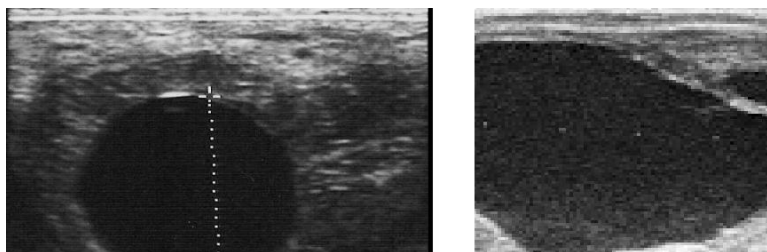


Figura 24. Folículos com conformação esférica (regular) e conformação irregular, respectivamente. Fonte: www.personalhorse.com.br

5.2.3 Camada anecogênica

O VEGF estimula a mitose de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular. Uma camada anecogênica expandida dentro da parede do folículo dominante torna-se aparente um dia antes da ovulação e é atribuída à vascularização aumentada (Figura 25). As concentrações de VEGF no fluido folicular são mais altas no maior folículo do que no segundo maior folículo, no dia após o início do desvio do diâmetro (Beg e Ginther, 2006).

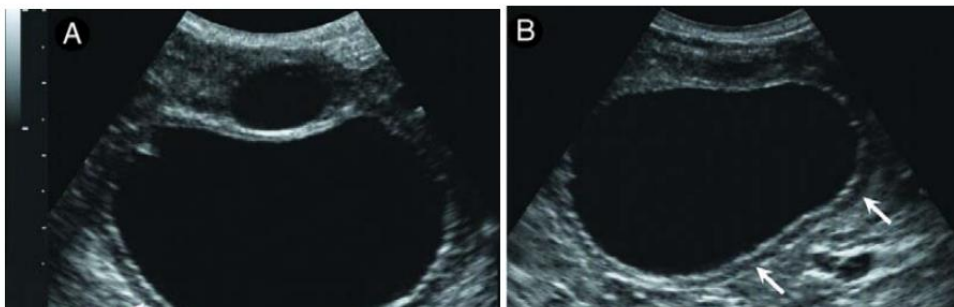


Figura 25. Imagem ultrassonográfica demonstrando uma camada anecogênica expandida dentro da parede dos folículos (setas brancas). A figura A mostra um folículo 2 dias antes de atingir um diâmetro >35mm e figura B mostra um folículo um dia antes de ovular. Fonte: adaptado de Gasta et al., 2006.

5.3 Corpos lúteos

O corpo lúteo é considerado uma glândula transitória ovariana desenvolvida a partir da ovulação, responsável pelo controle do ciclo estral e em algumas fêmeas pela manutenção da gestação. Sua formação depende de fatores mitogênicos, angiogênicos e de crescimento, bem como sua luteólise depende da liberação pulsátil de PGF2 α pelo endométrio (SALLES e ARAÚJO, 2010).

A função primária do corpo lúteo é a secreção de progesterona. O LH é relevante para o desenvolvimento normal e função luteal, sendo responsável por estimular células luteínicas a secretar progesterona por meio da ativação da proteína quinase

A (NISWENDER et al., 2000). A progesterona é um hormônio secretado pelas células luteínicas na forma de grânulos, também pela placenta e glândulas adrenais. Atua sinergicamente com estrógeno para promoção do cio, prepara o endométrio para implantação do embrião e manutenção da prenhez, inibe a motilidade uterina e, quando em níveis elevados, promove a inibição do cio e LH, auxiliando no desenvolvimento do tecido secretor da glândula mamária (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Após a ovulação do folículo dominante, o seu antro folicular será preenchido por sangue formando o corpo hemorrágico (Figura 26). Cinco dias após a ovulação o corpo lúteo (CL) estará totalmente formado e produzindo altas concentrações de P4. Durante o exame ultrassonográfico o CL pode se apresentar com um formato variável, mas sempre tendendo à forma arredondada. Sua ecogenicidade é variável em tons de cinza, sendo que logo após a ovulação sua ecogenicidade aumenta de maneira rápida e contínua até 24 -48 horas após a ovulação, a partir deste ponto sua ecogenicidade começa a decair lentamente até que aconteça a luteólise (BERGFELT e ADAMS, 2007).



Figura 26. Imagem ultrassonográfica apresentando o folículo 24 horas antes da ovulação, o momento da ovulação e a formação do corpo hemorrágico 24 horas depois da ovulação. Fonte: www.argos.portalveterinaria.com

6. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial (IA) em equinos é amplamente praticada em todo o mundo. A maneira mais comumente utilizada nessa espécie é mediante o resfriamento e transporte de sêmen (BORTOT, 2013).

O procedimento de escolha do garanhão, na maioria das vezes, é baseado na avaliação das características morfológicas, aprumos, órgãos genitais, além de textura, temperatura, sensibilidade e circunferência testicular (SILVA, 2018).

Quando se usa sêmen fresco a IA é realizada no momento da indução, pois continua viável por 48 horas, o mesmo tempo máximo da ovulação. Quando se usa o sêmen refrigerado, as IAs são realizadas 24 horas após a indução da ovulação. Esses tipos de sêmen tem uma melhor qualidade por não sofrerem alterações de temperatura e possuem maior concentração espermática na dose inseminante (BORTOT, 2013).

Após 24 horas da indução, faz-se a IA, onde a égua é contida adequadamente, tem a cauda levantada e enfaixada e são higienizadas na região de períneo e vulva. A inseminação convencional em éguas é por via vaginal, na qual o inseminador possui a mão enluvada, direciona uma pipeta até a passagem da cérvix e o sêmen é depositado no corpo do útero (MIES, 1987). No dia posterior a IA, realiza-se exame ultrassonográfico para a confirmação da ovulação, caso não tenha ocorrido, a fêmea é induzida novamente e inseminada (SILVA, 2018).

O sêmen congelado possui menor habilidade em interagir com as células do oviduto, mantendo sua viabilidade por menos tempo (SQUIRES et al., 1999). O acompanhamento ultrassonográfico é realizado a cada 2 horas e são avaliadas as mudanças nas imagens relacionadas a diminuição do edema uterino, as células da granulosa hiperecoicas, o formato irregular do folículo pré-ovulatório e maior flutuação, além da sensibilidade ao ser tocado. Para detectar a ovulação na égua se observa a formação de uma massa homogênea, hiperecoica (corpo hemorrágico) no lugar do folículo (SILVA, 2018).

O procedimento de higienização da égua é da mesma forma que realiza no sêmen fresco ou refrigerado. No entanto, o material e a técnica são diferentes; é utilizada uma pipeta flexível específica para a palheta de 0,5mL e a técnica intracornual profunda (Figura 27), que direciona a pipeta de inseminação pelo corno uterino ipsilateral ao ovário desejado e permite a deposição do sêmen o mais próximo possível do final do corno uterino (SILVA, 2018).

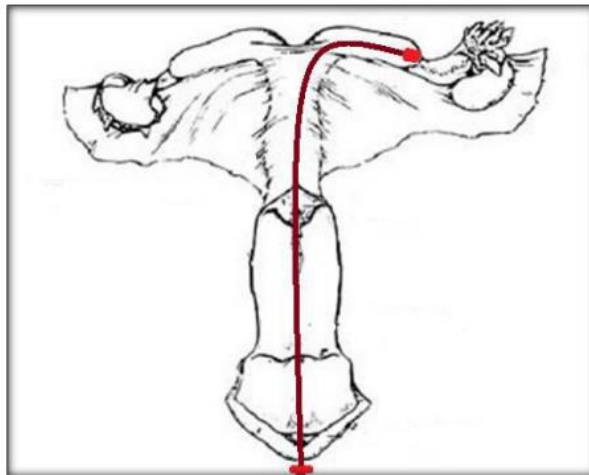


Figura 27. Ilustração da pipeta flexível na técnica intercornual profunda. Fonte: Silva, 2018.

7. TRANSFERENCIA DE EMBRIÃO

Ocorrida a ovulação, recomenda-se que a colheita de embriões seja realizada nos dias 7 (D7) ou 8 (D8) após a ovulação (D0).

Quando o objetivo da coleta é o congelamento de embrião, o controle de desenvolvimento folicular deve ser realizado com intervalos menores que 24 horas e o lavado uterino é realizado no dia 9 (D9) pós-ovulação (FLEURY, 2007).

No método transcervical, o embrião é recolhido através de uma lavagem uterina (flushing) da égua doadora, utilizando para tal de 2 a 3 litros de uma solução de Ringer com Lactato previamente aquecida a 37- 40°C (MC KINNON et al., 1988). Utiliza-se um cateter do tipo Foley, semirrígido, que passa através da cérvix até ao corpo uterino. Este cateter possui um balão inflável na porção anterior que, quando cheio de ar, impede que o meio de lavagem reflua através da cérvix para a vagina. Esse balão é inflado com 40 a 80mL de ar, sendo que a quantidade de ar irá variar de égua para égua.

O extremo posterior é ligado a duas vias, em que uma extremidade corresponde ao recipiente com o meio de lavagem e a outra ao filtro. Quando o cateter se encontra bem posicionado procede-se à introdução do meio de lavagem e sua posterior recolha (LENZI, 2008). Para facilitar este procedimento, pode-se colocar uma mão pelo reto,

de modo a ser possível massagear e elevar os corpos uterinos tendo isto impacto positivo na saída do fluido (Figura 28).

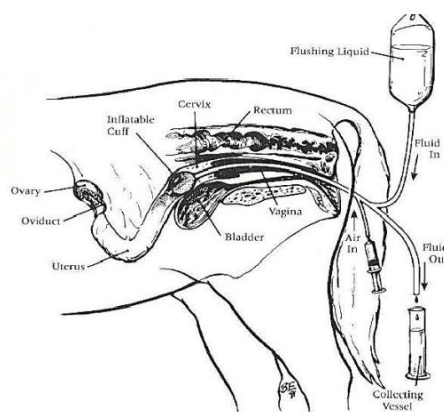


Figura 28. Ilustração da técnica de coleta de embrião. Fonte: Futino, 2005.

Quando se termina o procedimento, separa-se o filtro do circuito, já no laboratório, transferem-se os 20 a 30mL de meio de lavagem que ficaram residuais no filtro para placas de Petri estéreis com marcações (MC KINNON et al., 1988).

A avaliação do rastreamento dos embriões é realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob aumento de 10x e para a classificação embrionária utiliza-se um aumento de 40x (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009).

A placa de Petri deve estar previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de congelamento de sêmen de 0,25 ou 0,5mL acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de Petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção holding, dentre outros. Sob condições de higiene ambiental e operacional, quando esse embrião é encontrado, deve-se examinar sobretudo a sua qualidade e estado de desenvolvimento que se encontra (MC KINNON et al., 1988).

A maioria dos embriões encontra-se em fase de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, devido a data da coleta, entre os dias D7 à D9, após a ovulação da doadora (LENZI, 2008).

A classificação dos embriões ocorre através da sua avaliação morfológica e se baseia na forma, cor, tamanho, uniformidade, extrusões e degenerações de blastômeros. A fase de avaliação é muito importante na classificação do embrião, pois

a qualidade do embrião equino 30 é o fator que mais influencia as taxas de prenhes nos programas de transferências de embriões (FUTINO, 2005).

O embrião pode ser resfriado e transportado para uma transferência posterior ou ser transferido logo após a recuperação embrionária. Para a transferência, os embriões são acondicionados em palhetas de 0,25 ou 0,5 ml ou então em pipetas de inseminação artificial e inseridos no corpo do útero utilizando-se para isso, um inovulador.

Quando o embrião é aspirado para dentro de um instrumento de manipulação, a coluna de meio contendo o embrião deve ser mantido de cada lado por colunas de ar (Figura 29) (SILVA, 2014).

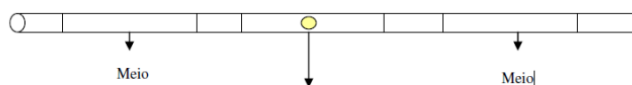


Figura 29. Ilustração do embrião no meio de manutenção entre as colunas de ar. Fonte: Futino, 2005.

Isso previne que o embrião acidentalmente seja lesionado ocorrendo perdas durante a transferência (FUTINO, 2005). O material normalmente utilizado é uma pipeta de inseminação padrão, inovuladores descartáveis, uma bainha plástica é colocada sobre o instrumento.

Com a égua receptora contida em tronco de contenção, a limpeza da região perineal é feita, então o profissional que está realizando a TE veste uma luva de plástico sobre seu braço. Uma pequena quantidade de lubrificante é aplicada na vulva. A extremidade distal do instrumento de transferência coberta pela bainha é colocada na palma da mão e protegida pelo dedo do operador. O instrumento é introduzido dentro da vagina e a ponta da bainha é introduzida na abertura externa da cérvix (Figura 30) (FUTINO, 2005).

O embrião pode ser depositado no corpo uterino ou em um dos cornos uterinos, momento no qual, o instrumento é empurrado através da camisa sanitária (SILVA, 2014).

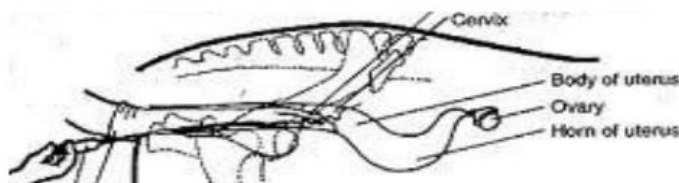


Figura 30. Ilustração do inovulador atravessando a cérvice e depositando o embrião no corpo uterino. Fonte: Silva, 2014.

Vários fatores foram identificados como importantes para a sobrevivência do embrião equino transferido. Estes incluem: qualidade do embrião, tamanho do embrião, grau de sincronizada da ovulação entre a égua doadora e a receptora, idade da receptora e doadora, estação do ano e uso concomitante de medicamentos no momento da transferência, como antibióticos, progesterona/progestógenos e agentes anti-inflamatórios não esteroidais para receptoras (MCCUE, 2015). Assim, a seleção e manutenção de éguas receptoras parece ter um papel preponderante no sucesso desta técnica. Afinal, além de ter que emprenhar, a receptora será responsável pelo desenvolvimento da gestação e cuidados com o neonato até a desmama (LOPES, 2015). Desta forma, é necessário ter um olhar atento na seleção de receptoras, as quais devem ser jovens, ter excelente escore de condição corporal, tamanho, útero adequado, já ter parido e apresentar habilidade materna (RIGOLETO JÚNIOR et al., 2021).

A sincronia entre doadora e receptora é necessária para o estabelecimento da prenhez após um procedimento de TE. A importância dessa sincronização é pelo fato de que o embrião em um útero não sincronizado está sujeito a se desenvolver com níveis hormonais de uma fase a qual ele não se encontra, podendo não efetivar a prenhez ou ocorrer morte embrionária precoce (BARNES, 2000).

Para contornar esta situação surgiu outra possibilidade que é preparar a receptora com ciclo artificial para simular um ciclo natural nas éguas que estão em transição ou anestro, sendo a utilização de benzoato de estradiol e progesterona de longa duração os mais utilizados (BOTELHO et al., 2015).

Esse processo é citado como ciclo artificial, onde são administrados hormônios como estradiol e progesterona que são responsáveis pela manutenção da gestação das mesmas (SILVA; MEIRA, 2014). Desta forma é possível continuar com as transferências de embriões ao longo do ano. Nas receptoras acíclicas são utilizados protocolos com estradiol que se baseiam em simular a condição hormonal do estro e expressão dos receptores uterinos para progesterona (AUPPERLE et al., 2010). Após a aplicação do estradiol observa-se a presença do edema uterino em 24 a 48 horas, e conseqüentemente faz a administração da progesterona. Todo esse procedimento é finalizado realizando a inovulação (ROCHA FILHO et al., 2004)

Após detectar a prenhez por ultrassom, tão cedo quanto quatro dias após a inovulação, as receptoras são suplementadas com a progesterona exógena até em torno 100 a 120 dias de gestação (BOTELHO et al., 2015). O corpo lúteo primário, ou seja, resultante da ovulação da prenhes, é complementado por corpos lúteos que iniciam sua formação em torno de 40 dias de gestação, desenvolvendo-se a partir da luteinização de folículos ovulatórios e anovulatórios, por ação da eCG (gonadotrofina coriônica esquinha) produzida pelos cálices endometriais da placenta (MCKINNON et al., 2011). Em torno de 80 a 100 nas éguas gestantes a placenta tem a capacidade de secretar a progesterona com níveis suficientes para manter a gestação, logo a suplementação com a progesterona exógena passa a não ser mais necessária (VANDERWALL et al., 2007).

8. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões, conforme as recomendações da IETS (Sociedade Internacional de Transferência Embrião) e descrito no Quadro 2. Em coletas realizadas entre D6 e D8 dias após ovulação, geralmente são encontrados mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e/ou blastocisto expandido (Bx). A avaliação da qualidade embrionária leva em consideração a morfologia relacionando com sua viabilidade (LIRA; PEIXOTO; SILVA, 2009).

Quadro 2. Estágios de desenvolvimento embrionário equino.

Estágio	Tamanho (µm)	Descrição
Mórula	150 a 200 µm	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores; borda externa dos blastômeros de aparência “serrilhada”; possibilidade de identificação do espaço perivitelínico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento à manipulação.
Blastocisto inicial	150 a 250 µm	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros; mínimo espaço perivitelínico, tamanho semelhante ao da mórula
Blastocisto	150 a 300 µm	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina
Blastocisto Expandido	300 a > 1,000 µm	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade
Ovócito não fertilizado (UFO)	125 a 150 µm	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola à manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados

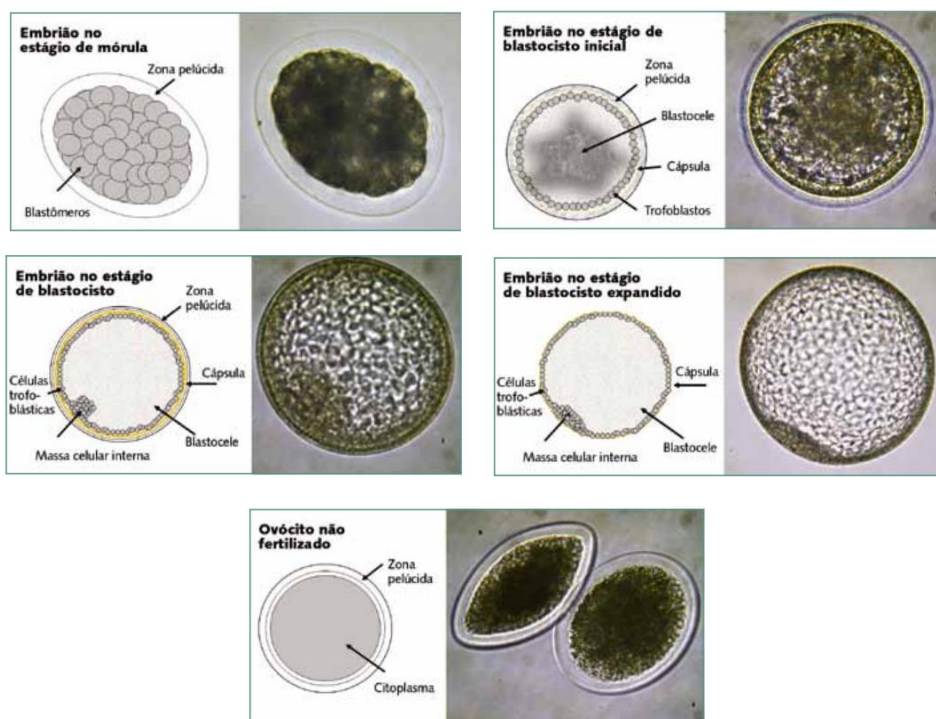


Figura 31. Imagens dos estágios embrionários relatados no Quadro 2.
 Fonte: MCCUE, 2011.

9. RELATO DE CASO

As éguas utilizadas para o programa de transferência foram acompanhadas por meio de ultrassonografia transretal desde o início da estação de monta, sendo o primeiro cio utilizado apenas para acompanhamento. Na avaliação ultrassonográfica foram observados os critérios descritos no presente artigo, como o diâmetro e a conformidade do folículo e o edema uterino.

Belize, a égua escolhida para este relato, tem 3 anos e 8 meses e é sua segunda estação de monta. Para a realização do procedimento de transferência de embriões, foi realizado o acompanhamento ultrassonográfico do desenvolvimento folicular. Quando seu folículo dominante atingiu o tamanho de 43mm (Figura 32), a ovulação foi induzida por meio da aplicação de hCG (Chorulon), 1,7mL intravenosa. O sêmen utilizado na inseminação era congelado, por esse motivo, 24 horas após a indução da ovulação, foi iniciado o acompanhamento ultrassonográfico a cada 4 horas. Quando

o edema uterino, que se encontrava em grau 2 (Figura 33) no momento da indução, caiu para o grau 1 e o folículo apresentou-se disforme (Figura 34) com parede anecogênica (Figura 35), interpretou-se que a ovulação estava mais próxima e então o acompanhamento ultrassonográfico passou a ser a cada 2 horas. Quando identificada a ovulação, iniciou o procedimento de inseminação artificial (IA).

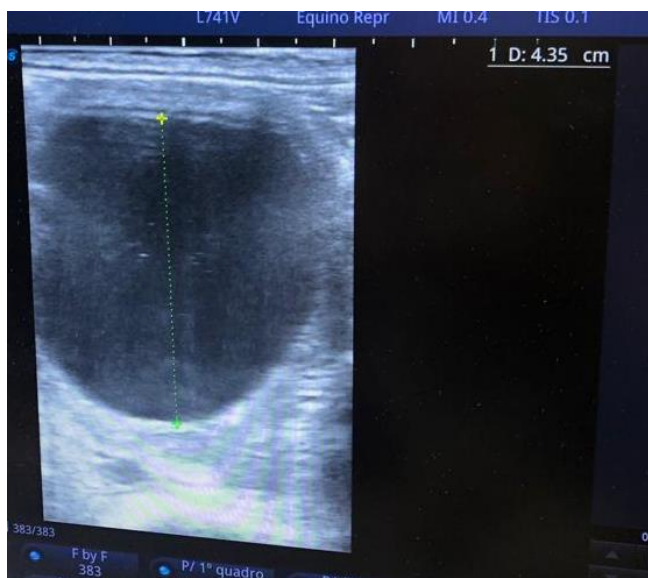


Figura 32. Folículo com tamanho



Figura 33. Útero apresentando edema grau 2.



Figura 34. Folículo com conformidade disforme.



Figura 35. Folículo apresentando camada anecogênica.

Após a realização da assepsia da região perivulvar (Figura 36), o sêmen escolhido foi retirado do botijão de nitrogênio (Figura 37) e aquecido em banho maria por volta da temperatura de 37,5°C (Figura 38). A palheta aquecida foi inserida na pipeta flexível através do mandril (Figura 39). A pipeta foi inserida na vagina com lubrificante à base de água e com o auxílio dos dedos atravessou a cérvix (Figura 40), e com o auxílio da palpação transretal, a pipeta foi direcionada lateralmente ao ovário que ovulou para a deposição seminal (Figura 41).



Figura 36. Assepsia da região perivulvar.



Figura 37. Retirada da palheta de sêmen do botijão de nitrogênio.



Figura 38. Aquecimento da palheta de sêmen em banho maria.



Figura 39. Palheta inserida na pipeta através do mandril.



Figura 40. Introdução da pipeta no útero, ultrapassando a cérvix.



Figura 41. Guiando a pipeta para o lado que se encontra o folículo ovulado através da palpação transretal.

Como relatado anteriormente, a coleta dos embriões foi realizada no nono dia após a IA (D9). A coleta foi realizada pela inserção de uma sonda na cérvix da vagina e realizada a lavagem do útero com 3 litros de solução de Ringer com Lactato (Figura 42). A solução foi infundida forçadamente para produção de um turbilhamento com o objetivo de trazer o embrião pelo fluxo do líquido. Foi então inserido o filtro coletor na extremidade externa e novamente foi realizada a palpação transretal para massagear o útero e retirar todo o líquido inserido, assim como o embrião (Figura 43).



Figura 42. Inserção da sonda no útero através da cérvix e lavagem com Ringer com Lactato



Figura 43. Passagem do lavado pelo filtro.

Após a terceira lavagem do útero, o conteúdo presente no filtro foi transferido para uma placa de Petri estéril com marcações e observado sob o aumento de 80x na lupa estereoscópica. Dois embriões foram observados (Figuras 44 e 45).



Figura 44. Observação do embrião número 1.

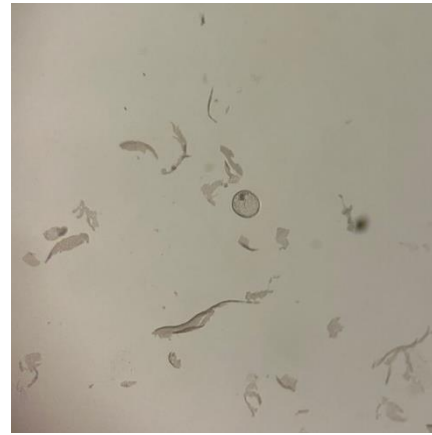


Figura 45. Observação do embrião número 2.

Duas novas placas de Petri estéreis foram utilizadas para a lavagem dos embriões. Nas novas placas foram dispostas 6 gotas de Holding Plus (Figura 46), um meio de manutenção para embriões, com uma seringa apenas de plástico e com uma seringa de insulina acoplada em uma ponteira e uma palheta de 0,25mm e 0,5mm (Figura 47), referente ao tamanho de cada embrião, os embriões foram retirados da placa anterior e passados, individualmente, por todas as 5 gotas periféricas até chegar na última gota central, trocando de palheta em cada gota (Figura 48).



Figura 46. 6 gotas de meio de manutenção na placa estéril.

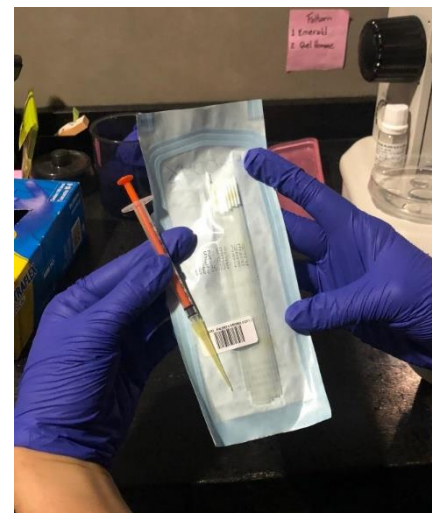


Figura 47. Seringa de insulina com ponteira que irá acoplar na palheta.

Todo esse processo foi realizado para separação do embrião de todo o debrí celular (Figuras 49 e 50), a fim de evitar maior inflamação no útero da égua que irá receber o embrião.



Figura 48. Passagem do embrião pelas 6 gotas de meio de manutenção.

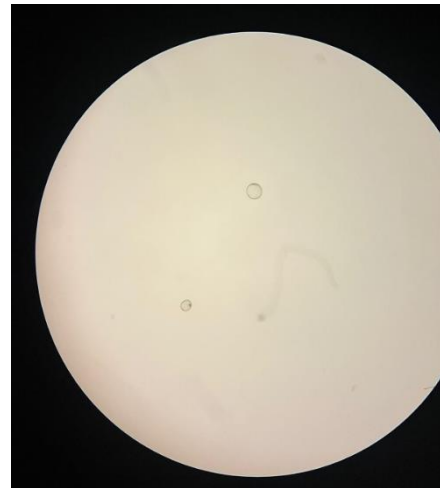


Figura 49. Visualização dos 2 embriões após a lavagem. Aumento de 40x.



Figura 50. Visualização dos 2 embriões após a lavagem à olho nu.

Para cada transferência, rotineiramente, são preparadas duas éguas com ciclo artificial. A inovulação do embrião é feita no sexto dia (D6) após a ovulação da égua

receptora, sendo necessário um planejamento prévio. Ao passo que as doadoras são palpadas diariamente, as receptoras também são, para que haja maior compatibilidade do ciclo hormonal para o embrião. Nos 3 dias que antecedem a data da transferência (D3) são realizadas administrações de cipionato de estradiol (ECP), de 1mL, 2mL e 1mL, intramuscular, para que seja mimetizada a ação do estrógeno e os sintomas de estro, como a preparação do útero e a ativação dos receptores de progesterona. No momento da transferência, as duas éguas em ciclo artificial foram palpadas transretalmente e a partir do exame ultrassonográfico foi escolhida a égua com maior resposta ao ciclo artificial (Figura 51).



Figura 51. Corpo lúteo presente na receptora D6.

Uma nova palheta então foi utilizada para inovular o embrião. A fim de que o embrião fique sempre em contato com o meio de manutenção. Na palheta foi seguida a seguinte ordem, foi aspirado o meio, em seguida ar, depois o meio contendo o embrião, e na sequência ar e meio novamente (Figura 52).



Figura 52. Palheta contendo meio, ar, o embrião submerso no meio, ar e meio novamente.

A palheta foi inserida no inovulador com um mandril e o mesmo processo da IA foi realizado: após a assepsia, o inovulador foi coberto por uma camisa sanitária e inserido na vagina, com o auxílio dos dedos foi atravessada a cérvix, a camisa sanitária foi rompida e o embrião foi inovulado no útero da receptora.

Para auxiliar na manutenção do embrião, foi inserido um implante vaginal de progesterona (P4) que permaneceu por 12 dias, quando foi realizado o exame de diagnóstico de gestação (Figura 53). Após a confirmação de gestação o implante foi retirado e a suplementação exógena de P4 deixou de ser local e passou a ser sistêmica (P4-300), via intramuscular, 3mL, uma vez por semana até o quarto mês de gestação, quando a placenta já possui a capacidade de produzir P4 suficiente para manter a gestação por si.



Figura 53. Confirmação de gestação. Embrião D12.

Novos exames ultrassonográficos foram realizados para o acompanhamento inicial de gestação (Figuras 54, 55 e 56). Todos positivos, mostrando o desenvolvimento do embrião.



Figura 54. Embrião D28.



Figura 55. Embrião D36.



Figura 56. Embrião D42.
Transição de estágio
embrionário para estágio fetal.

10. DISCUSSÃO

De acordo com (Vanderwall, Woods, 2007), a TE é um procedimento fácil em relação a outros, porém, o que dificulta o sucesso de sua aplicação é a falta de organização do manejo e a sincronização das éguas. Para um resultado positivo é importante que haja receptoras disponíveis e sempre, ao menos, duas opções para cada doadora. Quando não há uma receptora adequada, o embrião pode ser encaminhado para uma central de receptoras e ser inovulado na propriedade, dentro do período de 8 horas, em temperatura ambiente.

Há também a possibilidade de congelação de embriões. As vantagens do processo de congelação incluem importação e exportação de embriões congelados e redução considerável dos custos para introdução de nova genética em outro país (Squires, 2005).

Entretanto, alguns pesquisadores relatam baixa taxa de recuperação embrionária (menor 45%) em colheitas realizadas no dia 7 após a ovulação, pois a cápsula embrionária, estrutura acelular que se forma entre os dias D6 a 7, pode interferir no processo de congelação (Boyle et al., 1989).

A coleta realizada no D9 de éguas inseminadas com sêmen congelado se dá por conta da estrutura comentada acima, que permite que o embrião consiga se locomover pelo útero da égua receptora e facilite o reconhecimento pelo endométrio que há uma gestação. Antes do D8 e D9 a cápsula ainda não é formada e pode dificultar o reconhecimento de gestação, levando à perda embrionária (Boyle et al., 1989).

Caso passe do dia da coleta, o embrião passa da fase de maturação ideal para coleta e se torna grande demais para conseguir ser manipulado e a antecipação do processo, por conta do tamanho pequeno, pode também levar à perda embrionária. (Boyle et al., 1989).

11. CONCLUSÃO

A técnica da transferência de embriões depende de três fatores, sendo eles, uma boa doadora, uma boa técnica e uma boa receptora. No presente relato todos os três quesitos foram atendidos. A ocorrência de coleta gemelar depende da qualidade exclusivamente da qualidade da doadora. Pôde ser concluído que o resultado positivo é um reflexo de todo o investimento, não apenas financeiro, mas de tempo e esforço concedidos para a realização do procedimento.

REFERÊNCIAS

ARRUDA R.P., VISINTIN J.A., FLEURY J.J., GARCIA A.R., MADUREIRA E.H., CELEGHINI E.C.C. & NEVES NETO J.R. 2001. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos? Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:233-239

BEG MA, GINTHER OJ. Follicle selection in cattle and horse: role of intrafollicular factors. Soc Reprod Fertil, v.132, p.365-377, 2006.

BOYLE MS, SANDERSON MW, SKIDMORE JA, ALLEN WR. Use of serial progesterone measurements to assess cycle length, time of ovulation and timing of uterine flushes in order to recover equine morulae. Equine Vet J Suppl, n.8, p.10-13, 1989.

CÔRTE, F. D.; LUZ, I. N. C.; ALDA, J. L.; SILVA, J. H. S.; SILVA, C. A. M. Controle do desenvolvimento folicular na égua através da ultrasonografia. Ciência rural, Santa Maria, vol. 23, n. 2, p. 221-225. 5 p. 1993.

DASCANIO, J. J.; McCUE, P. M. Equine Reproductive Procedures. WILEY BLACKWEL. 578 p. 2014.

DONADEU FX, WATSON ED. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. Anim Reprod Sci, v.100, p.225-242, 2007.

DRIANCOURT MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. Theriogenology, v.55, p.1211-1239, 2001.

DUKES. Fisiologia dos animais domésticos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2017.

FARIA, D.R, GRADELA Adriana. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte, v.34, n.2, p.114-122, abr./jun. 2010.

FILHO, L. J. C. Uso da Ultrasonografia na Reprodução de Vacas e Éguas (Revisão de Literatura). Monografia (graduação), Universidade Federal de Campina Grande, campus de patos-PB. 39 p. 2010.

FRANDSON, ROWEN D. Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda / Rowen D. Frandson, W. Lee Wilke, Anna Dee Falls.– Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2014. [páginas 39-43 e 337-349]

GASTAL EL, GASTAL MO, GINTHER OJ. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to

changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. *Soc Reprod Fertil*, v.131, p.699-709, 2006.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. Southern Illinois University Carbondale, Carbondale, USA. 14 p. 2011.

GINTHER O. J, BEG MA, BERGFELT DR, DONADEU FX, KOT K. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod*, v.65, p.638-647, 2001.

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

GINTHER, O. J.; UTT, M. D.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A. Controlling interrelationships of progesterone and estradiol in mares, *Animal reproduction Science*, v. 95, p.144- 150, 2006

GURGEL, J. R.; VIANA, C.H.C.; PEREZ, E. G.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.122-132, abr./jun. 2008.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. *Reprodução Animal*. 7ª Edição. Barueri: Manole, 2004, p.36-82.

KLEIN, Bradley G. *Cunningham tratado de fisiologia veterinária*. Elsevier Editora Ltda, São Paulo, 2014. [capítulos 35-37]

KÖNIG H.E., LIEBICH H.-G. *Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido - 6ª Edição*. Artmed editora Ltda. Santana, 2016. Capítulo 11.

MARIZ T.M.A., ANJOS A.G., FLOR J.M., FLOR L.M.A.M., LIMA C.B., GIVISIEZ P.E.N. & AZEVEDO P.S. 2008. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. *Acta Veterinaria Brasilica* 2:39-43.

MOREL, M. C. G. D. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*, 2nd Edition. Institute of Rural Studies University of Wales, Aberystwyth-UK.383 P. 2003.

MOURA, J. C. A. Diagnóstico por imagem na reprodução equina “controle do útero”. *Academia Baiana de Medicina Veterinária. Ciência Animal*, 22(1), 2012 Palestra apresentada no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, Fortaleza, CE.10 P. 2012.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; McINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v. 80, n. 1, p.1-29, 2000.

PAREDEZ, M. P.; JIMÉNEZ, C.; HERNÁNDEZ, A. Estudio del intervalo interovulatorio en yeguas criollas colombianas. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. *Rev. med. vet. zoot.*, Volume 59, Issue 1, p. 33-49, 2012.

PONCHIROLLI CB. Influência dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular. In: Seminário do Curso de Pós-Graduação, 2003, São Paulo, SP. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2003. 12p.

SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo gestacional: revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 3, p.185-194, 2010.

SAMPER, J. C. *Equine breeding management and artificial insemination*, second edition. Saunders, an imprint of Elsevier Inc.304 p. 2009.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; McKINNON, A. O. *Current therapy in equine reproduction*. Saunders elsevier. 494 p. 2007.

SQUIRES EL. Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction. *Acta Sci Vet*, v.33, p.69-81, 2005.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D.. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, p. 91-104, 1999.

ULIANE, R. C. Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-b e doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista - Botucatu, 154 p, 2012.

VANDERWALL, DIRK K,WOODS, GORDON L. Embryo Transfer and Newer Assisted Reproductive Techniques for Horses. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, p. 211–218. 2007