

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ

EMILY DIAS MATTOS

**BIOTECNOLOGIA APLICADA À REPRODUÇÃO DE EQUÍDEOS NA
REGIÃO DE LONDRINA-PR**

LONDRINA

2019

INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ
EMILY DIAS MATTOS

**BIOTECNOLOGIA APLICADA À REPRODUÇÃO DE EQUÍDEOS NA
REGIÃO DE LONDRINA-PR**

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade
Relatório de Pesquisa, apresentado ao curso
Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino
Médio do Instituto Federal do Paraná.

LONDRINA

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

EMILY DIAS MATTOS

BIOTECNOLOGIA APLICADA À REPRODUÇÃO DE EQUÍDEOS NA REGIÃO DE LONDRINA-PR

Trabalho de Conclusão de Curso, modalidade Relatório de Pesquisa, apresentado ao Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio do Instituto Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Técnico em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Meneguello Limeira
Prof. Orientador

Gustavo Rafagnin Martin
Componente de Banca 1

Msc. Pedro Victor Oliveira
Componente de Banca 2

Londrina, 13 de Dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a vida e permitir que eu vivenciasse todos os momentos que me trouxeram até aqui.

A meus pais, irmã e familiares por me darem o suporte necessário em todos os momentos da minha vida e não me deixarem desistir dos meus sonhos e objetivos.

A meus amigos por todos os momentos que passamos e vivemos, pela ajuda necessária e por fazerem parte da minha história.

Ao meu orientador Prof. Daniel e co-orientadora Prof. (a) Ariela por todo o suporte, dedicação e disponibilidade na elaboração dessa pesquisa.

A todos os professores e servidores do IFPR por todo o ensinamento, disponibilidade e comprometimento.

A todos os criadores que aceitaram participar, e assim, colaborar com a pesquisa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na minha formação educacional e pessoal.

RESUMO

A biotecnologia agropecuária, em um de seus diversos campos de atuação, busca o aperfeiçoamento de técnicas para o melhoramento genético de animais. Esse melhoramento é feito através da seleção e reprodução de animais com características genéticas de interesse buscando o aumento da produtividade, diminuição do intervalo entre as gerações e aumento da resistência a fatores ambientais. As técnicas de reprodução podem ser utilizadas em animais com risco de extinção aumentando a quantidade de descendentes dessas espécies. Nos equídeos, as técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões apresentam resultados satisfatórios, pois, elas proporcionam a diminuição do caminho percorrido pelo sêmen até o encontro do oócito e permitem que a gestação de embriões, com alto valor genético, ocorra em receptoras, aumentando o número de descendentes da linhagem da égua doadora. Entretanto, algumas técnicas de reprodução possuem obstáculos que dificultam o avanço das pesquisas e, conseqüentemente, atrapalham o alcance de bons resultados. Na região comercial de Londrina-PR, prevalece a utilização das técnicas de colheita de sêmen, inseminação artificial e transferência de embriões, tendo em vista que as três podem ser interligadas e têm vasta aplicação. No quesito dos profissionais, apesar de existirem universidades que ofertam o curso de medicina veterinária ainda há uma escassez de profissionais capacitados para executarem as técnicas na região. Os profissionais que as realizam vieram, principalmente, de São Paulo. A presente pesquisa visou conhecer o cenário da biotecnologia utilizada na reprodução de equídeos na região de Londrina-PR e para tal utilizou de questionários semiestruturados que foram aplicados para os criadores desses animais.

Palavras-chave: Cavalos. ICSI. Inseminação artificial. Muares. Transferência de embriões.

ABSTRACT

Agricultural biotechnology, in one of its various fields, seeks to improve techniques for the genetic improvement of animals. This improvement is made through the selection and reproduction of animals with genetic characteristics of interest, seeking to increase productivity, decrease the generation gap and increase resistance to environmental factors. Reproduction techniques may be used on endangered animals by increasing the number of offspring of these species. In horses, the techniques of artificial insemination and embryo transfer show satisfactory results, as they provide a reduction in the pathway taken by the semen to the oocyte and allow the embryo gestation, with high genetic value, to occur at the receptors, increasing the number of offspring of the mare donor lineage. However, some reproduction techniques have obstacles that hinder the progress of research and, consequently, hinder the achievement of good results. In the commercial region of Londrina-PR, the use of semen collection, artificial insemination and embryo transfer techniques prevail, considering that the three can be interconnected and have wide application. Regarding the professionals, although there are universities that offer the veterinary medicine course, there is still a shortage of professionals able to perform the techniques in the region. The professionals who perform them came mainly from São Paulo. This research aimed to know the biotechnology scenario used in equine breeding in the region of Londrina-PR and used semi-structured questionnaires that were applied to the breeders of these animals.

Key-words: *Horses. ICSI. Artificial insemination. Muares. Embryo transfer.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF – Aspiração folicular
CE – Criopreservação espermática
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CL – Clonagem
cm – Centímetro
CS – Coleta de sêmen
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPBS – Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco
EUA – Estados Unidos da América
E2 – Estradiol-17 β
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FIV – Fertilização *in vitro*
GIFT – Transferência Intratubária de Gametas
hCG – Gonadotrofina Coriônica Humana
IA – Inseminação Artificial
ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IFPR – Instituto Federal do Paraná
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ml – Mililitro
mmHg – Milímetro de mercúrio
PGF2 – Prostaglandina F2 alfa
PR – Paraná
P (1-6) – Participantes
P4 – Progesterona
RS – Rio Grande do Sul
R\$ – Real
SF – Sexagem fetal
SS – Sexagem de sêmen
TE – Transferência de embriões
TO – Transferência de oócitos
UEL – Universidade Estadual de Londrina
UI – Unidade Internacional

VA – Vagina Artificial

XIV – Século quatorze

β – Beta

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

μl – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 TEMA	9
1.2 PROBLEMA	10
1.3 OBJETIVOS	10
1.3.1 Objetivo Geral	10
1.3.2 Objetivos Específicos	10
1.4 JUSTIFICATIVA	11
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	12
2.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	16
2.3 TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS.....	19
2.4 TRANSFERÊNCIA INTRATUBÁRIA DE GAMETAS	21
2.5 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	21
2.6 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 AMOSTRAGEM, FORMAS DE COLETA E ORGANIZAÇÃO	24
3.2 ANÁLISE DOS DADOS.....	25
4 ANÁLISE DE DADOS E RESULTADOS	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 TEMA

Biotecnologia é o termo empregado para definir qualquer aplicação tecnológica que utilize organismos vivos, partes de organismos vivos ou sistemas biológicos com a intenção de produzir ou modificar processos e produtos para usos específicos (SÃO PAULO, 2014) e o conceito de biotecnologia moderna surgiu com a descoberta da estrutura do DNA, em 1953, e da tecnologia do DNA recombinante, na década de 1970, sendo utilizado para indicar o uso da informação genética obtida diretamente do DNA nos processos tecnológicos (COUTINHO, ROSÁRIO E JORGE, 2010).

Na produção animal, a biotecnologia pode ser utilizada para aumentar a qualidade dos produtos de origem animal, a eficiência dos sistemas de reprodução, a sustentabilidade do sistema e a produção de alimento. Alguns dos produtos gerados com o emprego das técnicas biotecnológicas são vacinas recombinantes para prevenção de doenças em ovinos, suínos, bovinos e aves, hormônios de crescimento e testes genéticos de DNA na seleção de animais com genótipos superiores para melhoramentos (COUTINHO; ROSÁRIO E JORGE, 2010).

O uso da biotecnologia aplicada a reprodução animal vem aumentando devido a resistência à manipulação *ex situ* (fora do lugar de origem) dos gametas e embriões, desde que esses sejam mantidos em ambientes adequados, tornando-os alvos em potencial para o desenvolvimento de processos biotecnológicos destinados a ultrapassar as limitações naturais reprodutivas das espécies, tais como inseminação artificial, fecundação *in vitro*, transferência de embriões, e outros (SÃO PAULO, 2014).

Tal aumento ocorreu devido um grande desenvolvimento nas modalidades esportivas que utilizam animais nas últimas décadas, em especial as que envolvem equinos, o que ocasionou uma necessidade no aumento da criação de tais animais. A expansão destas modalidades aconteceu em desproporcionalidade com a ampliação da quantidade de bons machos nas temporadas reprodutivas acarretando, junto com as vantagens econômicas e sanitárias, a crescente aceitação na utilização de biotécnicas ligadas à reprodução (CHALHOUN, 1996).

Diversas biotécnicas são utilizadas na reprodução animal, tais como

transferência de oócitos, produção *in vitro* e clonagem, e, entre elas, as que demonstram maior êxito em questão a viabilidade econômica e a facilidade na implantação em espécies domésticas são a inseminação artificial e a transferência de embriões (FERNANDES, 2012). Na espécie equina a técnica da inseminação artificial, para as raças que permitem o uso, apresentam altos índices de fertilidade e traz como vantagem o menor desgaste do garanhão (CHALHOUB, 1996).

1.2 PROBLEMA

Ausência de conhecimento científico a respeito do uso de biotécnicas aplicadas a reprodução de equídeos na região de Londrina-PR.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Conhecer o papel da biotecnologia aplicada à reprodução dos equídeos na região de Londrina-PR.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar as biotécnicas aplicadas, suas vantagens e desvantagens, quais são mais comumente usadas pelos criadores.
- Identificar dificuldades e/ou limitações na aplicação dessas biotécnicas.
- Compreender os fatores que levam os criadores a preferirem a utilização de algumas biotécnicas em detrimento de outra.
- Identificar a formação dos profissionais que realizam as biotécnicas.
- Realizar um levantamento dos materiais e equipamentos necessários para a realização das biotécnicas.
- Realizar um levantamento dos custos relacionados à utilização dessas biotécnicas.

1.4 JUSTIFICATIVA

A utilização da biotecnologia voltada para a reprodução equina é de grande importância na economia, visto que, segundo o MAPA (2019), a equideocultura no Brasil, em 2016, gerou 610 mil empregos diretos, 2.430 mil empregos indiretos e movimentou anualmente R\$16,15 bilhões. E segundo a FAO (2019), em 2014, o Brasil encontrava-se com o quarto maior rebanho equino do planeta (5.451 milhões de cabeças), abaixo apenas dos EUA, México e China (PARANÁ, 2017). Dentre os equinos existentes no Brasil, 280. 629 mil cabeças se encontram no estado do Paraná e, entre elas, 2.984 mil cabeças se localizam no município de Londrina (BRASIL, 2017).

2 DESENVOLVIMENTO

Em decorrência da aceitação das biotécnicas ligadas a reprodução de equídeos ocorreu a adaptação, melhoramento e criação de técnicas que pudessem ser utilizadas nessas espécies domésticas. Entre as técnicas se encontram a inseminação artificial, transferência de embrião, fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoides, transferência de oócitos e transferência intratubária de gametas.

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

“O conceito de inseminação artificial refere-se ao processo de deposição do sêmen no sistema genital feminino, através de manipulação artificial, e no momento adequado, visando à fertilização do óvulo” (BOCHIO, 2012). Essa técnica é amplamente utilizada em equinos no mundo (LOOMIS, 2006) e, segundo a história, a inseminação artificial (IA) foi realizada pela primeira vez, no século XIV, por um chefe árabe que visava obter um potro de um garanhão do chefe inimigo. Ao excitar um macho com algodão embebido com secreções de uma égua em cio, transferiu o sêmen colhido em algodão para o interior da vagina de outra égua no cio (BOCHIO, 2012).

No Brasil, o primeiro artigo à respeito da IA, intitulado “Inseminação Artificial” foi publicado em abril de 1912 pelo veterinário Epaminondas Alves de Souza que sugeriu a utilização da técnica em equinos, embasando-se nos trabalhos norte-americanos realizados numa estação de pesquisa de Oklahoma. E, em 1935, o zootecnista Paulo de Lima Corrêa, em seu livro “Criação de Cavalos” cita em poucas linhas a utilização da IA em equinos (HERMSDORFF, 1940 *apud* SEVERO, 2015).

As primeiras inseminações registradas no Brasil aconteceram em Saicã, RS, onde o Capitão Veterinário Deodato Cintra Moreno da Coudelaria do Exército Nacional realizou a inseminação de algumas éguas em caráter experimental, entre 1927-28. O método utilizado pelo capitão consistia na colheita do sêmen encontrado em uma égua recém montada para, com o auxílio de seringa e pipeta de vidro, efetuar a inseminação de outras éguas no cio (SEVERO, 2019).

A Coudelaria de Saicã forneceu reprodutores de qualidade durante muito tempo para os fazendeiros da campanha gaúcha que atendiam a demanda de

cavalos apropriados para a remonta do Exército. A necessidade de melhorias desses animais exigiu, portanto, a instalação de uma unidade experimental de IA de equinos na coudelaria (SEVERO, 2019).

O veterinário Leovigildo Pacheco Jordão que trabalhava no Departamento de Produção Animal do Estado de São Paulo publicou uma nota de esclarecimento à respeito da utilização da IA no Haras Paulista de Pindamonhangaba aos veterinários do Exército, em 1936 (CORTEZ, 1946 *apud* SEVERO, 2019), informou que foi operado um coletor de sêmen acoplado à vagina da égua que seria montada, pela primeira vez, momentos antes do salto e explicou que a inseminação era realizada com o sêmen puro e fracionado com o objetivo de atender o número de éguas em cio no dia (SEVERO, 2019).

O Exército Nacional aprovou a primeira vagina artificial (VA), que foi construída pelo diretor Deodato Cintra Moreno da Coudelaria de Avelar, em 1942 (Ministério da Guerra, 1957 *apud* SEVERO, 2019), onde eram criados cavalos que iriam para o Rio de Janeiro nos quartéis do Exército. Pouco tempo depois, em 1945, foi desenvolvida pelo Tenente Médico Veterinário Eurico Cortez um modelo de VA destinada a equídeos e essa foi aprovada pelo Diretor Geral de Remonta para ser empregada nos estabelecimentos de criação mantidos pelo Exército. Todos os estabelecimentos de Veterinária e Remonta do Exército Nacional estavam utilizando a IA em larga escala, em 1944, chegando a inseminar centenas de éguas (SEVERO, 2019).

Para a execução da IA é necessário realizar a colheita de sêmen e as técnicas utilizadas são a vagina artificial fechada e a VA aberta, porém, esta última é utilizada em situações especiais onde seja necessário a colheita de sêmen fracionado (TRISCHNER, 1979 *apud* CANISSO *et al.*, 2008). E Samper (2007) afirma que em território nacional os modelos mais utilizados são o Hanover (modelo alemão) seguido pelo Botucatu (modelo brasileiro).

Carvalho (1992) afirma que a IA pode ser realizada de diversas formas de acordo com o tipo de tratamento que o sêmen irá receber e estas podem ser *in natura*, diluído, diluído transportado, diluído resfriado transportado e congelado, e cada uma delas apresentam suas vantagens, desvantagens e indicações. A forma mais utilizada em equinos é a do sêmen diluído resfriado transportado (LOOMIS, 2006).

Segundo Squires *et. al.* (1999) é importante realizar a separação da fração

gelatinosa do sêmen ejaculado da parte rica em espermatozoides após a colheita, pois, a primeira apresenta efeitos nocivos à célula espermática. Para realizar a separação o procedimento mais utilizado é a filtragem que é realizada através do acoplamento de um filtro ao copo coletor que retém a fração gelatinosa, parte dos contaminantes bacterianos e elementos estranhos presentes no sêmen.

De acordo com Cbra (1998) a fração rica em espermatozoides é analisada com auxílio de microscópio óptico e placa aquecedora, onde uma gota de sêmen é colocada entre a lâmina e a lamínula previamente aquecidas a 35-37 °C. As análises realizadas são, normalmente, de mobilidade, vigor e concentração dos espermatozoides, a última deve variar em sua maioria de 50-400 milhões de espermatozoides/ml de ejaculado, e morfologia espermática (LOVE, 2007). O número de espermatozoides contidos em cada dose inseminante varia na maioria dos trabalhos de 250 a 500 milhões e o valor limite superior mais utilizado mundialmente é baseado em um trabalho dos pesquisadores do Colorado (BRINSKO, 2006).

Para se obter um bom resultado na IA é preciso que a égua esteja em cio e para se detectar é verificado a rufiação, onde o garanhão sai em busca da égua para o acasalamento, e quando essa verificação não pode ser realizada é preciso efetuar uma avaliação ginecológica por palpação retal com o objetivo de identificar a presença de folículos e a consistência do útero, sendo possível determinar a fase do ciclo estral do animal (BRINSKO, VARNER, 1992 *apud* LEÃO, 2003).

“O cio da égua dura de 5 a 7 dias e a ovulação ocorre no final deste período, sendo que a inseminação deve ser realizada o mais próximo possível da ovulação” (MIES FILHO, 1987) e Ley (2006 *apud* CLAUDINO II, 2009) afirma que a ovulação ocorre entre 24 a 48 horas antes do término dos sinais do cio, porém, em alguns casos pode-se induzir a ovulação com a utilização de hormônios, como o Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) que é o mais indicado. Esse hormônio deve ser aplicado em uma dose de 2500 UI e causa, em cerca de 80% das éguas, a ovulação entre 36 a 48 horas (BRISTOL, 1992 *apud* LEÃO, 2003).

Para evitar a perda do cio é ideal que, nos programas de IA de equinos, seja realizado o controle folicular com acompanhamento ultrassonográfico, visto que, com esse controle é possível efetuar a previsão da ovulação e decidir o melhor momento para inseminar (BRINSKO, VARNER, 1992 *apud* LEÃO, 2003). Em casos da égua ser inseminada depois de 12 a 14 horas da ovulação, Ley (2006 *apud*

CLAUDINO II, 2009) afirma que, o óvulo estará muito velho para ser fertilizado e há grandes chances de ocorrer falha no desenvolvimento de um embrião viável.

Com o cio da égua detectado e o sêmen colhido é possível realizar a IA que ocorre quando é feita a deposição de sêmen dentro do útero de uma égua respeitando as técnicas de higienização, dos equipamentos e do animal (KENNEY *et al.*, 1975 *apud* OLIVEIRA, PEREIRA, 2019). “Todas as inseminações devem ser executadas com técnica de contaminação mínima: com a égua devidamente contida, com a cauda enfaixada e elevada e a área entre a base da cauda e a comissura ventral da vulva muito bem esfregada, lavada e seca” (HAFEZ, HAFEZ, 2004 *apud* OLIVEIRA, PEREIRA, 2019).

Para efetuar a inseminação artificial o inseminador coloca uma luva plástica descartável esterilizada e com os dedos protege a ponta da pipeta com o sêmen. A mão enluvada deve ser lubrificada com gel não espermicida e, em seguida, é introduzida em direção cranial a vagina. Com o dedo indicador o inseminador precisa localizar a cérvix para atravessá-la, introduzir a cerca de 1cm do útero e depositar o sêmen de maneira lenta (BRINSKO, WARNER, 1993; TAVEIROS *et al.*, 2008). Com o fim da deposição do sêmen retira-se a mão com a pipeta da via vaginal e o procedimento termina (HAFEZ, HAFEZ, 2004 *apud* OLIVEIRA, PEREIRA, 2019). A higienização da égua é de extrema importância, visto que, quando a pipeta for inserida no períneo para chegar ao útero pode carregar agentes contaminantes externos e, desse modo, acarretar numa maior chance de uma reação inflamatória acentuada intrauterina prejudicando a efetividade da técnica (OLIVEIRA, PEREIRA, 2019).

A IA com a utilização de sêmen fresco e refrigerado é amplamente realizada pela maioria dos criadores obtendo resultados satisfatórios. Conquanto, o sêmen congelado tem uma aplicação mais restrita por obter resultados inferiores aos obtidos com os outros sêmens, fresco e refrigerado, e exigir um melhor controle da ovulação da égua (SQUIRES *et al.*, 1999).

A técnica de inseminação artificial realizada em asininos são similares, visto que, em geral, esses são semelhantes em sua fisiologia reprodutiva se diferenciando em algumas demonstrações do cio da jumenta para com as observadas na égua (WILBORN, PUGH, 2011 *apud* SOUZA *et al.*, 2012). E como na égua, a IA em jumentas requer um acompanhamento ultrassonográfico utilizado para avaliar a dinâmica folicular e a ecotextura uterina que variam em decorrência das

modificações hormonais acarretadas pelo ciclo estral e o cio (SOUZA *et al.*, 2012).

A inseminação artificial em equídeos promove, portanto, a obtenção de produtos cujos reprodutores podem estar próximos, em outros países ou mortos, facilita a realização de testes de progênie, promove a reprodução de machos subfêrteis e evita doenças sexualmente transmitidas, acelerando a variabilidade genética e em determinados casos o melhoramento desses genes. Entretanto, apresenta como desvantagens variabilidade de fatores que podem alterar as características do sêmen *in natura*, diluído, resfriado e congelado (SQUIRES *et al.*, 1999).

2.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

“A Transferência de Embriões (TE) pode ser definida como um processo de remover um ou mais embriões do trato reprodutivo de uma fêmea doadora e transferi-los a uma ou mais fêmeas receptoras”(ALVAREZ, 2019). A primeira utilização da TE em mamíferos foi feita em 1890 quando, em Cambridge, foram coletados embriões do útero de uma coelha e esses foram transferidos para o útero de uma receptora que os gestou (RODRIGUES; RODRIGUES, 2009).

Um grupo de trabalho de Cambridge, em 1949, acelerou o desenvolvimento da técnica para estudar as possibilidades da utilização da TE nos programas de seleção animal. Em 1951, buscando aprimorar os métodos de estimulação ovariana, coleta, manipulação dos embriões *ex situ* e transferência de embriões, nos EUA, um grupo de pesquisadores foi responsável pelo nascimento do primeiro bezerro produto da TE (RODRIGUES; RODRIGUES, 2009).

Os primeiros experimentos utilizando TE realizados no Brasil foram com bovinos. O médico veterinário João Carlo Giudice, após voltar de uma viagem pela Europa em 1973, sintetizou seus conhecimentos a respeito da técnica e criou um programa de coletas cirúrgicas de embriões visando a obtenção de embriões viáveis. Conquanto, os obstáculos para realizar a técnica em uma propriedade rural tornou o método inviável. Em São Paulo no ano de 1978, foi feita a primeira TE onde o embrião foi coletado por meio do cérvix da doadora e através da laparotomia foi executada a transferência que resultou no primeiro bezerro brasileiro de raça holandesa (RODRIGUES; RODRIGUES, 2009). A utilização da TE em equinos só foi datada em 1986 (MEIRA, 2007).

O ciclo estral equino depende de três fatores básicos: nutrição, fotoperíodo e temperatura. As éguas possuem ciclo estral somente quando a duração do dia é maior que a da noite e as temperaturas estão mais elevadas, logo, “as éguas são animais classificados como poliéstricos estacionais, pois possuem sua estação reprodutiva na primavera e no verão” (ARRUDA *et al.*, 2001).

A TE em equinos visa recolher um embrião do útero da égua doadora, entre seis e oito dias após a ovulação, através da lavagem uterina (TAVEIROS, 2008). Para selecionar a doadora é preciso saber o potencial genético da égua, sua condição uterina, histórico reprodutivo e idade, posto que, águas com idade avançada apresentam baixa fertilidade devido a dificuldade durante o processo de fecundação, desenvolvimento embrionário intrauterino, logo, apresenta baixos resultados de recuperação embrionária se a TE for utilizada (MEIRA, 2007).

A seleção da égua receptora deve ser feita com muito critério, pois, é de suma importância que a égua esteja apta para gestar o embrião. Os fatores considerados na escolha envolvem a idade (3 a 10 anos), porte, condições uterinas e vulvares, produção de leite e habilidade materna, além de exigências da própria associação da raça (MEIRA, 2007). A receptora não pode apresentar, no exame ultrassonográfico, nenhuma evidência de secreção uterina ou dobras endometriais (CARNEVALE, 2000b).

O êxito da TE depende da sincronização do ciclo estral da receptora com a doadora. Para que ocorra a transferência a receptora deve estar no mesmo dia do ciclo da doadora, entretanto, o prazo de três dias antes da ovulação da doadora ou até um dia depois é aceitável. As éguas sincronizadas não podem apresentar alterações ovarianas e uterinas, devem estar em condições adequadas e a receptora não pode ter tido problemas com as gestações anteriores. A sincronização é necessária, dado que, “o embrião obtido vai ser colocado num fisiologicamente semelhante à do ambiente uterino que existia no momento de recuperação” (BORTOT; ZAPPA, 2013).

A TE pode ser realizada após sete ou oito dias da IA ou da monta natural através da recuperação embrionária (CARNEVALE, 2000b). A recuperação embrionária pode ser feita através do método cirúrgico ou do não cirúrgico. O método cirúrgico consiste na lavagem do oviduto e deve ser utilizado quando se visa a obtenção de embriões nos estágios iniciais do desenvolvimento. O método não cirúrgico é realizado a partir do 6º dia após a ovulação, pois, os embriões estão

migrando do oviduto em direção ao útero (BRAGA; CRUSCO, 2007). Sendo que o primeiro apresenta taxas de prenhez elevadas, mas de aplicação onerosa e o segundo taxas que oscilam bastante, mas de fácil aplicação (ARRUDA *et al.*, 2001).

Para realizar a colheita do embrião a zona vulvar da égua deve ser lavada, a calda amarrada e levantada para evitar a contaminação. Todos os equipamentos a serem utilizados são, previamente, preparados numa zona higienizada e depois levada para onde a égua se encontra (ANJO; BRAN, 2010).

Com a égua preparada, um cateter, do tipo Foley, é inserido na cérvix até chegar ao corpo uterino. O cateter possui um balão que, quando cheio de ar, impede que o cateter saia do lugar e que o meio de lavagem saia e vá para a vagina. O cateter é ligado em um circuito que apresenta duas vias, uma corresponde ao recipiente que contém o meio para a lavagem e o outro ao filtro que está protegido da luz solar (MCKINNON *et al.*, 2011). A lavagem é feita com uma solução de Ringer Lactato, que é utilizada em uma volume de 2 a 3 litros, previamente aquecida a 37-40°C (VANDERWALL; WOODS, 2007).

Com o cateter preparado e posicionado o meio de lavagem é introduzido e posteriormente retirado e, para facilitar a retirada, pode ser colocada uma mão pelo reto para massagear e elevar o corpo uterino, uma vez que, acarreta num impacto positivo na saída do meio. Caso haja dificuldade na extração é aconselhável que uma ecografia seja realizada para que se possa redirecionar o cateter para onde está o meio (MCKINNON *et al.*, 2011).

Com o fim do procedimento, a égua doadora é administrada com PGF2 para que ocorra a regressão do corpo lúteo e inicie um novo ciclo e o filtro é levado para o laboratório e o meio de lavagem residual que permaneceu no filtro, entre 20 a 30 ml, é transferido para placas de petri estéreis (MCKINNON *et al.*, 2011). Nas placas o embrião é procurado com a ajuda de uma lupa estereoscópica e, quando localizado, é aspirado com a ajuda de uma palheta de 0,25 ou 0,5 ml, que é acoplada a uma seringa de insulina, e é transferido para uma placa de petri menor contendo meio de manutenção (BORTOT; ZAPPA, 2013).

O embrião passa por uma avaliação e classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e é lavado em 10 passagens do meio de manutenção, consecutivamente, para eliminar todas as impurezas encontradas na zona pelúcida antes que o embrião seja aspirado para a palheta de inoculação (VALLECILLO *et al.*, 2007). A aspiração é feita com uma palheta de 0,25 ml com porções alternadas

de ar e solução de manutenção minimizando o movimento do embrião e garantindo a perfeita expulsão do embrião para o útero da égua receptora (MCKINNON *et al.*, 2011).

A TE possibilitou aos equinos, que por muito tempo foram considerados a espécie de menor fertilidade entre as espécies domésticas, melhor aproveitamento dos animais acelerando o aprimoramento dos cruzamentos e, conseqüentemente, das raças (LIRA, 2009). Com a possibilidade de obter embriões de éguas com idade avançada e elevado nível genético, apesar da taxa de recuperação embrionária, potras de alto valor genético no início da vida sexual sem interferência no desenvolvimento, crescimento, atividades esportivas e exposições por terem outras éguas gestando seus produtos e éguas com problemas nos membros locomotores e histórico de perdas embrionárias (SILVA; UNANIAN; ESTEVES, 1998). A utilização da TE em asininos, no entanto, apresenta baixas taxas de gestação que podem ser decorrentes do nível de sincronização da receptora com a doadora, qualidade da receptora e meio de conservação e cultivo que não mimetizam o ambiente intrauterino (CAMILLO *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de técnicas de conservação de sêmen flexibilizou a utilização da transferência de embriões por não necessitar da presença do garanhão. O aperfeiçoamento da técnica permitiu o armazenamento e transporte dos embriões para outras regiões através do resfriamento a 18°C ou congelamento a 5°C alcançando taxa de prenhez de 70% (SILVA; UNANIAN; ESTEVES, 1998).

2.3 TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS

A Transferência de Oócitos (TO) é uma técnica que baseia-se na transferência de oócitos coletados de folículos ovarianos de uma égua, doadora, para as tubas uterinas de outras éguas, receptoras, e essas serão inseminadas artificialmente para possibilitar a formação de um embrião (CARNEVALE *et al.*, 2004). Os oócitos podem ser coletados a partir de folículos imaturos ou em processo de maturação, no entanto, visto que os equinos são uma espécie monovular, ou seja, ocorre a liberação de um oócito que possivelmente irá virar um óvulo, o número de folículos é limitado (CARMO, 2001)

A coleta dos oócitos pode ser feita através de dois métodos. Num deles, a aspiração de oócitos é feita pelo flanco onde, através da palpação retal, se localiza o

ovário da égua e, utilizando um trocater, é feita uma perfuração no abdômen. O trocater entra em contato com o ovário e, ao encontrar o folículo, perfura-o com uma agulha realizando a lavagem da cavidade folicular e aspiração, com o auxílio de seringas de grande volume ou uma bomba à vácuo, para capturar o oócito. O líquido utilizado na lavagem pode ser um meio que contenha heparina para prevenir a coagulação ou um meio específico, como a solução de Dulbecco's phosphate-buffered (DPBS) modificado em uma quantidade de 50-100 ml (MCKINNON *et al.*, 1987; CARNEVALE, 2004).

Outro modo de coletar os oócitos é pela aspiração transvaginal guiada por ultrassonografia onde, através da palpação retal, se localiza o ovário e, na vulva, é introduzido um suporte plástico que contém uma probe e uma agulha. Com a utilização da probe, o suporte é posicionado no ovário permitindo que a agulha perfure-o e adentre o folículo que, ao ser adentrado, é aspirado e lavado através de uma bomba à vácuo, em uma pressão de 150 mmHg, ou por seringas de grande volume (CARNEVALE, 2004).

Após a obtenção dos oócitos eles são transferidos cirurgicamente para o oviduto de éguas receptoras através do flanco. Essas éguas foram inseminadas artificialmente 12 horas antes da transferência e deve ser feita outra inseminação 2 horas após a TO (CARNEVALE *et al.*, 2000a; 2001a). Esses oócitos devem ser maturados *in vivo* ou *in vitro*, sendo que o segundo apresenta algumas limitações pois a cultura de oócitos pode não completar a maturação (PALMER *et al.*, 1991) e isso se deve ao fato de, por ser uma célula única, o oócito é mais sensível a mudanças de temperatura, concentração osmótica e a danos físicos, se comparado a um embrião. Para amenizar esses efeitos, os equipamentos utilizados e o meio onde se encontram os oócitos devem estar a uma temperatura de 38-39°C (SILVA, 2008).

As éguas doadoras, na maioria dos casos, apresentam um alto valor zootécnico e econômico, no entanto, não apresentam bom histórico reprodutivo através da TE, evidenciam patologias nas tubas, cornos e corpo uterinos e alta incidência de falhas de ovulação. Outro caso de doadoras são éguas de idade avançada pois seus oócitos expressam um baixo índice de fertilidade (SILVA, 2008). A TO é utilizada, portanto, para ampliar a disseminação do material genético, visto que, os oócitos utilizados podem ser coletados de éguas vivas, que morreram naturalmente ou são encaminhadas para o abatedouro (CARNEVALE, 2004).

As éguas receptoras podem ser cíclicas, onde os ciclos estrais são normais e há a necessidade de sincronização com a data de coleta da doadora (CARNEVALE *et al.*, 2004), e acíclicas que podem se encontrar fora do estro, no entanto, precisam ser submetidas a tratamento hormonal com progesterona (P4) e estradiol-17 β (E2) (BRINSKO *et al.*, 2011).

A TO não é muito utilizada em equinos pois, por não haver muitos locais de abate desses animais e a pouca aderência da sociedade brasileira ao consumo da carne dessa espécie, não há muitos objetos de estudo que possibilitem a adaptação dos métodos já existentes para serem aplicados nessa espécie e a criação de novos métodos que sejam eficazes (CARNEIRO *et al.*, 2001).

2.4 TRANSFERÊNCIA INTRATUBÁRIA DE GAMETAS

A Transferência Intratubária de Gametas (GIFT) clássica é uma técnica onde ocorre a deposição de oócitos maduros e espermatozoides capacitados no oviduto de uma fêmea. Nos equinos a técnica foi modificada e segue o mesmo protocolo da TO, no entanto, a inseminação ocorre em conjunto com a deposição do oócito (CARNEVALE, 2004).

A GIFT pode ser empregada com bons resultados em equinos se o sêmen utilizado for fresco e não necessita da aspiração folicular feita nas receptoras, visto que, os gametas serão inseridos no oviduto da fêmea evitando que os oócitos da égua sejam fecundados (ZÚCCARI, 2014). A técnica é indicada quando o sêmen utilizado vier de garanhões subfêrteis ou quando é necessário a utilização de poucos espermatozoides (CARNEVALE, 2007).

2.5 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

A Fertilização *in vitro* (FIV) consiste na união do oócito com o Espermatozóide no laboratório. Para que essa junção dos gametas resulte num embrião é necessário que seja efetuada a maturação folicular e a fertilização, ambas *in vitro*. O desenvolvimento embrionário é feito em laboratório até que o embrião esteja no estágio propício para que seja feita a transferência (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Os oócitos utilizados na técnica são obtidos, em sua maioria, através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (RODRIGUES; GARCIA,

2000) e, visto que são retirados dos folículos, os oócitos não se encontram aptos para a fecundação sendo necessário realizar a maturação. A maturação oocitária se divide em maturação nuclear, onde o núcleo sai da prófase I e vai para a metáfase II da primeira divisão meiótica, e maturação citoplasmática, onde ocorre a reorganização das organelas citoplasmáticas e alterações nos padrões de síntese proteica (THOMPSON *et al.*, 2000; YOUNG, 1998). É durante a maturação que acontece alterações nas células somáticas que circundam o oócito e elas são importantes para promover a passagem de nutrientes e proteínas para o oócito, além de, ajudarem na maturação nuclear e citoplasmática (NAGAI *et al.*, 2001). Para que os processos da maturação ocorram é necessário que, no laboratório, sejam utilizados todos os meios para simular as condições encontradas durante a maturação *in vivo* (SANGILD *et al.*, 2000).

Para a realização da fertilização é utilizado, em geral, uma concentração de 2×10^6 espermatozoides/ml. Os espermatozoides são colocados junto dos oócitos e ficam incubados de 12 a 20 horas (SANGILD *et al.*, 2000). É durante a incubação que deve ocorrer a fecundação e, se ocorrer, começa o processo do desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento é caracterizado pelas mudanças que o embrião passa até que esteja pronto para ser transferido. É nesse período que o genoma embrionário deve ser ativado, para que ocorra as divisões celulares e a compactação dos blastômeros no estágio de mórula (HOSHI, 2003). No 7º dia é efetuada a avaliação e seleção dos embriões para a transferência (THOMPSON *et al.*, 2000).

A FIV é uma técnica eficiente em diversas espécies domésticas e na espécie humana, no entanto, a utilização dessa técnica para a reprodução de equinos não apresenta resultados satisfatórios (CAMARGO JUNIOR, 2009). Esses resultados reforçam a dificuldade encontrada na área de pesquisa que envolve a falta de abatedouros equinos limitando a disponibilidade de ovários e oócitos (DELL'AQUILA *et al.*, 1997; LAZARRI *et al.*, 2002). A limitação de pesquisas acarreta num maior esforço para manter um sistema de cultivo *in vitro* adequado para o zigoto e para a maturação dos oócitos (HINRICHS, 2010).

2.6 INJEÇÃO INTRACITOPASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES

“A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI) é uma técnica de fertilização *in vitro*, na qual um único espermatozoide é aspirado e injetado dentro de um oócito” (HINRICHS, 2005). Os oócitos, obtidos através da aspiração folicular, podem estar maduros ou passam por um processo de maturação *in vitro* para que atinjam a metáfase II. Após a maturação, os oócitos têm a maioria das células somáticas que o circundam retiradas e o que a apresentar o primeiro corpúsculo polar, célula pequena provinda da divisão meiótica assimétrica, não funcional e que se degenera rapidamente, é utilizado (SQUIRES *et al.*, 1996).

Para ser feita a escolha do espermatozoide que será utilizado o sêmen fresco ou descongelado é lavado e colocado e misturado em um meio com polivinilpirrolidona. Uma gota de 50µl é retirada e colocada sob uma placa de Petri e um espermatozoide é aspirado para uma pipeta onde pulsos elétricos são usados para imobilizar a membrana plasmática. A pipeta é movida até chegar à zona pelúcida do oócito e através de pulsos elétricos é inserida até penetrá-lo e injeta a cabeça do espermatozoide (KUROKAWA; FISSORE, 2003).

A ICSI é uma técnica que está em desenvolvimento e é indicada para éguas que apresentam patologias uterinas, obstrução do oviduto, falhas na ovulação ou estão em idade avançada, para a utilização de sêmen de baixa qualidade, baixos números de espermatozoides, ou quando há a morte da égua doadora ou do garanhão (CARNEVALE; FRANK-GUEST; STOKES, 2010). Apresenta como vantagens o aumento da eficiência no uso do sêmen de alta ou baixa qualidade, elimina o risco de endometrite nas éguas receptoras, pois, não precisam ser inseminadas, conquanto, é preciso equipamento específico, mão de obra especializada (HINRICHS, 2005) maior tempo para ser realizada e apresenta risco de lise do oócito levando a redução da fertilização (CAMARGO JUNIOR, 2009).

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM, FORMAS DE COLETA E ORGANIZAÇÃO

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica a fim de estruturar e embasar este projeto que foi submetido a apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa do IFPR (CEP) e, somente após a aprovação, foram aplicados, aos criadores, questionários semiestruturados com questões relativas ao uso da biotecnologia aplicada à reprodução de equídeos (APÊNDICE 1).

As questões estiveram divididas em quatro seções. A seção 1 é referente ao criador e à criação e contempla perguntas relacionadas ao local e finalidade da criação, tamanho do rebanho e raça, tempo de experiência como criador e proporção da utilização de biotécnicas em relação à monta natural.

A seção 2 é referente às biotecnologias utilizadas na reprodução e apresenta as técnicas: inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), colheita de sêmen (CS), criopreservação espermática (CE), aspiração folicular (AF), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), transferência de oócitos (TO), sexagem de sêmen (SS), sexagem fetal (SF), clonagem (CL) e outra. Sobre as técnicas foi perguntado a frequência com que são utilizadas, baseada na escala Likert (nunca, quase nunca, às vezes, quase sempre e sempre), e a formação do profissional que a executa.

A seção 3 relativa aos custos ou ao investimento da produção contemplando uma pergunta sobre o gasto anual com as biotécnicas e a seção 4 relativa ao mercado integrando perguntas relacionadas à contratação de profissionais da região de Londrina-PR, se existe dificuldade de encontrar tais profissionais e as melhorias almejadas pelo criador.

Segundo o censo agropecuário de 2017 (IBGE, 2017), o município de Londrina conta com 219 estabelecimentos com criação de equídeos e foi objetivado entrevistar ao menos 10% destes como amostra. Como as criações encontram-se em ambiente rural, distante da cidade e o projeto não tem recursos para a realização, o deslocamento até essas regiões é dificultoso. Em virtude disso a amostra teve seu tamanho reduzido.

Um contato com um Médico Veterinário que presta serviço na reprodução de equídeos foi realizado e este forneceu o contato telefônico de onze criadores.

Segundo ele, entrevistas por meios digitais seriam inviáveis já que os criadores costumam não ser familiarizados com os ambientes digitais. Entrando em contato com esses criadores foi possível recrutá-los para a participação do projeto e agendar as datas para a aplicação dos questionários. Durante a conversa com o veterinário, foi informado que os contatos obtidos são os únicos criadores existentes na região de Londrina-PR, logo, possivelmente caracterizam 100% da população.

Os criadores indicados pelo médico veterinário fazem parte da sua clientela e, tendo em vista que, cada médico veterinário tem seus clientes, é possível que os criadores não atendidos por ele tenham ficado fora da pesquisa. Em contrapartida, ao entrar em contato com os criadores, os mesmos relataram não conhecer outros criadores na região de Londrina-PR além dos que já se tinha o contato.

O censo realizado pelo IBGE não leva em consideração somente os criadores registrados (em associações de criadores) e, portanto, o número de animais indicado refere-se a animais de diversas raças e sem raças definidas. Desta forma, há uma diferença significativa entre o censo e o número de animais pertencentes a criadores registrados. Provavelmente, somente esses últimos, fazem uso de biotecnologia para reprodução.

Criadores comerciais de equídeos da região de Londrina-PR foram contatados para responder a pesquisa. Em um primeiro momento, foi verificado se a criação é comercial, os criadores foram convidados a responder o questionário e caso aceitassem participar da pesquisa e assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2), seriam incluídos. O termo é um documento pedido pelo CEP. Foram obtidos, ao todo, seis participantes, enumerados de P1 a P6, que caracterizam 54,5% da população total.

Durante a aplicação dos questionários, era possível que o entrevistado decidisse não responder alguma das perguntas ou se sentisse inapto a responder. Neste caso, o entrevistado e os dados gerados seriam excluídos da pesquisa.

3.2 ANÁLISE DOS DADOS

Com a aplicação dos questionários foi realizada uma análise descritiva dos dados coletados de acordo com as características das informações obtidas. Por meio dessa análise, realizou-se uma caracterização da amostra obtida, organizando-se os dados por meio de um quadro.

Os dados obtidos na seção 2 foram tratados de modo que a frequência na qual a técnica foi utilizada recebeu um número de 0 (nunca) até 4 (sempre). Cada técnica teve sua frequência numerada e uma média foi retirada entre a frequência da técnica pela quantidade de participantes. Com as médias de cada técnica foi efetuada a construção de um gráfico possibilitando a análise das técnicas mais e menos utilizadas pelos criadores.

Os dados da seção 3 foram analisados e foi feita a média do custo anual dos criadores apresentando o desvio padrão, após a média foi realizada a divisão do gasto de cada criador pelo número de cabeças correspondente a matrizes e reprodutores. Os dados da seção 4 foram tratados de modo similar aos da seção 1 com o intuito de caracterizar o mercado que envolve a contratação de profissionais qualificados da região, se houve dificuldade na busca de tais profissionais e as melhorias almejadas pelos criadores apresentados em um quadro.

4 ANÁLISE DE DADOS E RESULTADOS

Os resultados obtidos na seção 1 do questionário podem ser melhor visualizados no Quadro 1, onde é apresentado a caracterização da amostra. A caracterização envolve o local da criação, tempo de experiência como criador, raça, finalidade da criação, proporção da utilização das biotécnicas em relação à monta natural e tamanho do rebanho, que foi separado em: geral, matriz (nome dado a doadora de oócitos) e reprodutor macho (ganhão).

QUADRO 1 - Caracterização da amostra

	Local	Tempo de experiência (anos)	Rebanho	Raça	Finalidade	Utilização da biotecnologia
P1	Londrina	7	geral: 16 matriz: 3 reprodutor: 1	Quarto de Milha	Esporte	95%
P2	Bela Vista do Paraíso	15	geral: 21 matriz: 12 reprodutor: 1	Quarto de Milha	Comércio e lazer	100%
P3	Londrina	17	geral: 180 matriz: - reprodutor: -	Quarto de Milha e Paint Horse	Comércio e esporte	100%
P4	Londrina	10	geral: 20 matriz: 6 reprodutor: 0	Quarto de Milha	Comércio e esporte	100%
P5	Guaraci	35	geral: 19 matriz: 16 reprodutor: 3	Quarto de Milha	Esporte	50%
P6	Londrina	15	geral: 40 matriz: 12 reprodutor: 0	Quarto de Milha	Esporte	100%

Fonte: Autoria própria

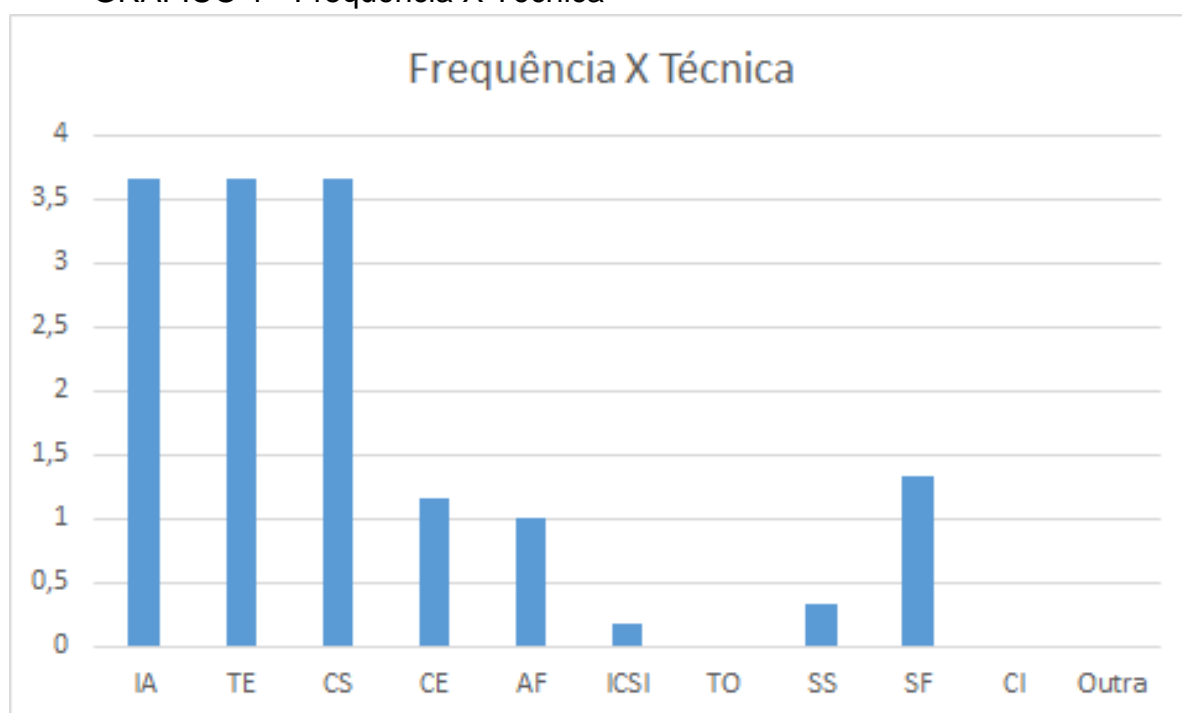
A maior parte das criações são encontradas em Londrina e os criadores apresentam um tempo de experiência que varia de sete a 35 anos. A raça predominante é Quarto de Milha e a finalidade predominante da criação é o esporte. O Quarto de Milha é uma raça que se adapta muito bem nas diversas modalidades esportivas como salto, provas de rédeas, corridas planas e, principalmente, a prova

dos três tambores (DONOFRE *et al.*, 2014), o que, possivelmente, explica o porquê da predominância desta raça.

O tamanho do rebanho variou de 16 a 180 cabeças, sendo que, de três a 16 cabeças são matrizes, de zero a três ganhões e o restante são receptoras e produtos (isto é, oriundos da aplicação de biotécnicas), potros. A proporção da utilização das biotécnicas em relação à monta natural, em sua maioria, foi de 100%, e parece estar intrinsecamente relacionada ao número baixo de reprodutores nos rebanhos. A relação entre reprodutores e as biotécnicas pode ser observada analisando-se os dados da quantidade de ganhões no rebanho pela proporção da utilização das biotécnicas de cada criador, visto que, o criador que menos utiliza as biotécnicas é o que apresenta a maior quantidade de reprodutores.

Os dados da seção 2 foram utilizados para a composição do Gráfico 1 que apresenta a relação da técnica pela média da frequência da técnica. No gráfico, foram apresentadas as técnicas: inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), colheita de sêmen (CS), criopreservação espermática (CE), aspiração folicular (AF), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), transferência de oócitos (TO), sexagem de sêmen (SS), sexagem fetal (SF), clonagem (CL) e outra.

GRÁFICO 1 - Frequência X Técnica



Fonte: Autoria própria

As técnicas mais utilizadas pelos criadores são a IA, TE e CS. A relação presente entre as três técnicas pode explicar a semelhança da média, dado que, para que a IA seja executada é necessário que seja feita a colheita do sêmen (TRISCHNER, 1979 *apud* CANISSO *et al.*, 2008) e, na maioria dos casos, a TE é realizada de sete a oito dias após a inseminação artificial da égua (CARNEVALE, 2000b). A inseminação artificial é uma técnica muito utilizada em equinos, pois, apresenta resultados satisfatórios, promove a reprodução de machos subfêrteis e acelera a variabilidade genética (SQUIRES *et al.*, 1999; LOOMIS, 2006). A transferência de embriões possibilitou o melhor aproveitamento dos equinos e acelerou o aprimoramento de cruzamentos, pois, utiliza uma égua, receptora, para gestar e cuidar do embrião proveniente de uma égua, doadora, de alto valor genético (LIRA, 2009).

Dos seis participantes: cinco afirmaram usar a inseminação artificial sempre e um às vezes; três afirmaram usar a transferência de embriões sempre, um quase sempre, um às vezes e um nunca. Quanto à colheita de sêmen, três afirmaram realizar sempre, um quase nunca e dois nunca, obtendo no panorama geral a variação de quase sempre a sempre. Entretanto, relacionando os dados do Quadro 1 com os dados obtidos na seção 2 de cada participante foi possível perceber que um dos participantes que não apresenta ganho na sua criação afirmou realizar a colheita de sêmen sempre. Isto posto, o participante pode ter se confundido ou sido induzido a achar que a colheita pudesse ser a compra do sêmen, o que sugere que para pesquisas futuras será necessário que a questão seja acompanhada de uma explicação no questionário.

A SF é utilizada quase sempre por um participante, às vezes por dois participantes, quase nunca por um participante e nunca por dois participantes, em decorrência, o panorama geral da técnica varia de quase nunca a às vezes. Ainda que existam opções disponíveis para realizar a determinação do sexo fetal em águas prenhes, a técnica não é muito utilizada, pois, exige equipamentos de alto custo e profissionais experientes, restringindo a aplicação (AURICH; SCHNEIDER, 2014). A CE é empregada às vezes por três participantes, quase nunca por um participante e nunca por dois participantes. Um dos criadores que afirmou utilizar às vezes caracterizou sua frequência como sendo uma vez por ano. A utilização do sêmen congelado apresenta resultados inferiores a utilização do sêmen resfriado ou *in natura*, além de apresentar uma aplicação mais restrita (SQUIRES *et al.*, 1999),

por conseguinte, a menor adesão da criopreservação espermática pelos criadores, possivelmente, seja em consequência desses fatores.

A AF é usada quase sempre por um participante, às vezes por um participante, quase nunca por um participante e nunca por três participantes. Um dos criadores que nunca utiliza afirmou que é uma técnica muito cara. A aspiração folicular é, comumente, utilizada para coletar os oócitos que poderão ser utilizados na TO (MCKINNON *et al.*, 1987; CARNEVALE, 2004). O procedimento ainda não apresenta bons resultados e o número de folículos aspirados é limitado (CARMO, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2001), logo, é por isso, possivelmente, que a técnica apresenta um custo elevado. Por conseguinte, o panorama geral das três técnicas varia de quase nunca a às vezes.

Dentre os seis participantes, dois quase nunca utilizam a sexagem de sêmen e quatro nunca utilizaram. Um dos criadores que não utiliza a técnica afirmou que não é muito eficiente apesar do elevado custo, condizendo, com Henkel e Schill (2003) que afirma que a técnica ideal para realizar a sexagem de sêmen deve ser rápida, fácil e econômica, no entanto, nenhuma das técnicas existentes foram capazes de atingir todos os objetivos. A SS seria de grande ajuda para os criadores, pensando na finalidade das criações, uma vez que, a demanda de machos nas rédeas e leilões é maior que a de fêmeas, conquanto, as fêmeas são mais procuradas para o polo e, se forem da raça Quarto de Milha, para corridas (SAMPER *et al.*, 2012; PANARACE *et al.*, 2014). A ICSI quase nunca é utilizada e a realização da técnica foi efetuada por somente um participante. Esse criador afirmou que por ser uma técnica nova apresenta um custo muito elevado, condizendo com Camargo Junior (2009) e Carnevale, Frank-Guest e Stokes (2010) que afirmam que a ICSI ainda está em desenvolvimento e que, para a aplicação da técnica, é preciso de mão de obra e equipamento especializados, encarecendo a técnica. O panorama geral das duas técnicas varia de nunca a quase nunca.

A TO não foi utilizada por nenhum dos participantes e, como apresentado no desenvolvimento, não é realizada em razão da falta de conhecimentos sobre a maturação e cultivo *in vitro*. Isso se deve à dificuldade de obtenção de materiais para pesquisas provindos, comumente, dos abatedouros (CARNEIRO *et al.*, 2001). A CL não foi realizada por nenhum dos participantes e isso, possivelmente, ocorreu devido à ineficácia do método, uma vez que, é preciso o entendimento de uma complexa combinação de fatores biológicos e técnicos que compõem o processo

(TRECENZI; ZAPPA, 2013), esse processo envolve o cultivo de células *in vitro* e a presença de um óócito apto para receber o núcleo de outro animal. Os criadores não citaram a utilização de outra técnica além das já incluídas no questionário.

De acordo com os dados da seção 3, em média, os criadores relataram gastar 46,5 mil reais por ano. Essa média variou de zero a 100 mil reais (M= 46,5; DP= 39). Realizando a divisão dos gastos pelo número de cabeças foi notado que, possivelmente, o participante 1 é o que tem o maior investimento gastando, em sua maioria, R\$ 12.500 por ano por cabeça (matriz ou reprodutor) sendo seguido pelo P4 e P6 que gastam R\$ 6.666 e R\$ 8.333 por ano por cabeça, respectivamente. Já os participantes 2 e 3 afirmaram gastar R\$ 692 e R\$ 444 por ano, respectivamente. O P5 afirmou que não possui gastos com as biotécnicas, conquanto, declarou que a proporção da utilização de biotécnicas em relação à monta natural é de 50%, logo, deve existir algum gasto que o criador não se sentiu confortável para falar.

Ao analisar, em conjunto, os dados da seção 1 e 3 foi identificado que os participantes que apresentam os maiores investimentos por cabeça (P1, P4 e P6) apresentam maior proporção da utilização das biotécnicas em relação à monta natural variando de 95 a 100%, logo, a monta natural quase não é realizada nessas criações, tendo em vista que, somente o participante 1 afirmou ter reprodutor. Dos três, somente, o P6 afirmou utilizar as técnicas que são consideradas com custo mais elevado, como a AF e a ICSI, tendo frequência de quase sempre e quase nunca, respectivamente. Apesar do menor investimento por cabeça, os participantes 2 e 3 afirmaram utilizar a AF às vezes e quase nunca, respectivamente, mas, não utilizam a ICSI. O participante 5 não utiliza nenhuma das técnicas. Desse modo, possivelmente, a utilização dessas técnicas na região de Londrina-PR é mínima, tendo em vista que, mesmo os criadores com maiores investimentos não aplicam essas técnicas em suas criações.

Os dados provindos da seção 4 foram apresentados no Quadro 2, onde é exposta a caracterização do mercado. A caracterização envolve os profissionais, se são da região ou vieram de outro lugar, e as dificuldades e melhorias apontadas pelos criadores. Durante as entrevistas foi constatado que os profissionais contratados são médicos veterinários encontrados na região de Londrina-PR, entretanto, conforme apresentado pelos criadores, possivelmente, uma grande parcela desses profissionais se encontravam na região de São Paulo e vieram para Londrina recentemente. Os criadores afirmaram que mesmo após a vinda dos

médicos veterinários, que são os que executam as biotécnicas, ainda há uma escassez de profissionais capacitados. Os participantes disseram almejar a melhoria no custo para a realização das técnicas e sua eficiência, aumento na quantidade de profissionais e número de laboratórios.

Quadro 2 - Caracterização do mercado

	Profissionais da região	Dificuldade	Melhorias almejadas
P1	Sim	Não	Eficiência das técnicas
P2	Sim	Escassez de profissionais na região	Maior número de laboratórios
P3	Sim	Escassez de profissionais na região	Clima, custo e aumento na quantidade de profissionais
P4	Sim	Não	Custo
P5	Sim	Não	-
P6	Sim	Não	Custo e menor quantidade de animais para trabalhar

Fonte: Autoria própria

A oferta de cursos de medicina veterinária em Londrina-PR se iniciou em 1973 e hoje é possível se formar através de uma universidade pública, Universidade Estadual de Londrina (UEL) e três particulares. Na UEL, até o ano de 2013, haviam sido formados 2300 médicos veterinários (UEL, 2013) levantando um questionamento a respeito da falta desses profissionais no mercado. Essa escassez de profissionais, possivelmente, é decorrente da finalidade dos cursos ofertados, visto que, esses podem ter o propósito de formar os discentes para atuarem na área acadêmica ou em campo, com animais de pequeno ou grande porte, sem que o enfoque seja a reprodução. Se a hipótese apresentada for verdade, é aconselhável que as universidades se adequem ao panorama do mercado regional.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na região de Londrina-PR, as técnicas mais utilizadas pelos criadores são a coleta de sêmen, inseminação artificial e transferência de embriões, e apresentam um menor custo se comparada as outras técnicas. No entanto, apesar da utilização da biotecnologia aplicada a reprodução de equídeos e a presença de universidades que ofertam o curso de medicina veterinária, a região ainda carece de profissionais capacitados para executá-las, encarecendo e dificultando a utilização das técnicas.

Algumas técnicas ainda estão passando por estudos para solucionar problemas como maturação e cultivo de células *in vitro*, e a monovulação das éguas, entretanto, a falta de materiais de pesquisa vem atrasando o desenvolvimento e aprimoramento dos métodos. Os desafios contidos nessas técnicas tornam-nas menos utilizadas devido ao elevado custo.

Durante a elaboração do questionário poderiam ter sido inseridas questões referente aos custos voltados para as técnicas, para manter os animais e para contratar os profissionais, pois, essas questões colaborariam para obter dados mais precisos.

Para futuras pesquisas é aconselhável questionar os criadores a possibilidade de fornecimento de outros contatos, a fim de obter um número maior de criadores na amostra e, se possível, identificar a quantidade total de criadores presentes na região de Londrina-PR.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, Rafael Herrera. **Fatores determinantes do sucesso de um programa de Transferência de Embriões em bovinos**. Disponível em: <<http://bit.ly/325Uss1>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

ANJO, D.; BRAN, J. A. **Reprodução assistida em cavalos: novas contribuições da teoria**. Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia, 5, 56-69, 2010.

ARRUDA, R.P., *et al.* **Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultrassom e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos?** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:233-239, 2001.

AURICH, C.; SCHNEIDER, J. **Sex determination in horses-Current status and future perspectives**. Animal Reproduction Science, v. 146, n. 1–2, p. 34–41, 2014.

BRAGA, R.; CRUSCO, S. **Transferência embrionária em equinos: Método não cirúrgico baseado na técnica ultrassonográfica de injeção ultraterina**. Pubvet, São Paulo, v. 11, n. 2, p.143-148, fev. 2007. Mensal. Disponível em: <<http://bit.ly/2N1f0gP>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

BRASIL. IBGE. **Londrina: Pecuária**. 2017. Disponível em: <<http://bit.ly/2WUA1eH>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

BRINSKO, S. P. **Insemination doses: how low can we go?** Theriogenology, v. 66, n. 3, p. 543-550, 2006.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D. **Artificial insemination**. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. Equine Reproduction. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1992. Chapter 84, p.790- 797.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. **Artificial insemination**. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, Capítulo 84, 1993.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. *et al.* **Manual of equine reproduction**. Maryland Heights: Mosby Elsevier, 2011. p.302-312.

BRISTOL, F. **Synchronization of ovulation**. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. Equine Reproduction. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1992. Chapter 39, p.348-352.

BOCHIO, L; **Inseminação Artificial**; ABQM < <http://bit.ly/33DJFqj> > Acesso em 26/10/2012.

BORTOT, D.; ZAPPA, V. Aspectos da reprodução equina. **Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, 21, 1-23, 2013.

CAMILLO, F, *et al.* **Embryo recovery rate and recipients pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys**. Theriogenology; 73: 959–65, 2010.

CARMO, M.T. **Estudos da maturação oocitária de éguas superovuladas com o extrato de pituitária equina.** 2001. 150p. Dissertação (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

CARNEIRO, G. F. **The influence of insulin-like growth factor-i and its interaction with gonadotropins, estradiol and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenetic Development in Equine Oocytes.** Biol Reprod, v.65, p.899-905, 2001.

CARNEIRO, G. F. **Técnicas de Reprodução Assistida aplicadas a Equinos.** In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2012, Pernambuco. Técnicas de Reprodução Assistida aplicadas a Equinos. Fortaleza: Ciência Animal, 2012. p. 308 - 324. Disponível em: <<http://bit.ly/2PIQCbe>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

CARNEVALE, E. M. *et al.* **Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer.** Theriogenology, v.54, n.6, p.981-987, Oct. 2000a.

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

CARNEVALE, E.M. *et al.* **Use of deslorelin acetate to suppress follicular activity in mares used as recipients for oocyte transfer.** Theriogenology 55. p.358. 2001a.

CARNEVALE, E. M. *et al.* **Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipient for oocyte transfer.** Animal Science Reproduction, v.68, n.3/4, p.305-314, Dec. 2001b.

CARNEVALE, E. M. *et al.* **Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares.** Reproduction, v.128, n.5, p.623-628, Nov. 2004.

CARNEVALE, E. M. **Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare.** Animal Reproduction Science, v.82-83, p.617-624, July 2004.

CARNEVALE E. M. **Collection and transfer of oocytes in mares.** 2007. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & Mckinnon, A.O. (Eds.). Current therapy in equine reproduction. 2^o ed. p. 289-295. St. Louis, USA: Saunders Elsevier.

CARNEVALE, E.M.; FRANK-GUEST, B.L.; STOKES, J.E. **Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection.** Animal Reproduction Science, v.121, p.258-259, 2010.

CARVALHO, G. R. **Fertility of the diluted equine semen, Cold to 20°C and transported.** 1992. 87 f. Thesis (Magister Scientiae) Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.

CAMARGO JUNIOR, S. L. S. **Bioteecnologias aplicadas à reprodução de éguas velhas.** 2009. 25 f. TCC (Graduação) Curso de Medicina Veterinária, Unesp, Botucatu, 2009. Disponível em: <<http://bit.ly/2CzGUKT>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

CANISSO, I. F. *et al.* **INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado.** Revista Acadêmica: Ciência Agrária e Ambiental, Curitiba, v. 6, n. 3, p.389-398, jun. 2008. Disponível em: <<http://bit.ly/2Q85JWf>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

CHALHOUB, M. *et al.* **Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino diluído, resfriado a 20oC e transportado a diferentes momentos da ovulação.** Revista Brasileira de Reprodução Animal.1996.

CLAUDINO II, G. F. **ASPECTOS DA REPRODUÇÃO EQUINA: INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.** 2009. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://arquivo.fmu.br/prodisc/medvet/gfc.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

CBRA, COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

CORTEZ, E. **Inseminação Artificial na Espécie Equina.** Gráfica Editora Aurora, 1946, 210p.

COUTINHO, L. L.; ROSARIO, M. F.; JORGE, E. C. **Biotecnologia animal.** Estud. av., São Paulo, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010. Disponível em: <<https://bit.ly/2I9k4O7>>. Acesso em: 09 abr. 2019.

DELL'AQUILA M.E. *et al.* **Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on thefertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection.** Human Reproduction 12, 2766-2772, 1997.

DONOFRE, A. C. *et al.* **Equilíbrio de cavalos da raça Quarto de Milha participantes da modalidade de três tambores por meio de proporções corporais.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 44, n. 2, p.327-332, fev. 2014. Mensal. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v44n2/a4214cr2013-0645.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2019.

FAO. **FAO no Brasil.** Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/pt/>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

FERNANDES, C. B. **Biotécnicas avançadas em reprodução equina.** In: DEMINICIS, B. B.; MARTINS, C. B.; SIQUEIRA, J. B. Tópicos especiais em Ciência Animal I. Alegre: Caufes, 2012. p. 2-10. Disponível em: <<https://bit.ly/2I8c7tw>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

HAFEZ, B; HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal.** 7ª ed. Barueri: Manole, 2004. p.389-390.

HERMSDORFF G. E. **Inseminação artificial.** Bol Soc Bras Med Vet, v.1, p.21-55, 1940.

HENKEL, R.; SCHILL, W. **Sperm preparation for ART.** Reproductive Biology and Endocrinology, v. 1, p. 108, 2003.

HINRICHS, K. **Update on equine ICSI and cloning.** Theriogenology, v.64, p.535-541, 2005.

HINRICHS, K. **In vitro production of Equine Embryos:** the State of Art. Reproduction of Domestic Animals 45 (Suppl. 2), 3–8 (2010);77.

HOSHI, H. **In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer.** Theriogenology, v.59, p.675-685, 2003.

KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. **Minimal contamination techniques for breeding mares:** technique and preliminary findings. 1975. In Proceedings of the 22nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP): Lexington, KY, USA, 327.

KUROKAWA, M.; FISSORE, R. A. **ICSI-generated zygotes exhibit altered calcium oscillations, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 down- regulation, and embryo development.** Mol Hum Reprod., v. 9, p.523–533, 2003.

LAZZARI, G. *et al.* **Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities.** Theriogenology, v. 58, p. 709-12, 2002.

LEÃO, K. M. **Técnicas de Inseminação Artificial.** 2003. 34 f. Monografia (Especialização) Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. Disponível em: <<http://www.geocities.ws/andbt/semi03/Karen.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

LEY, M.B. **Reprodução em Éguas para veterinários de eqüinos.** 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.68-69.

LIRA, R. A., PEIXOTO, G.C.X., SILVA, A.R. **Transferência de embrião em eqüinos:** Revisão. Acta Veterinaria Brasilica, v.3, n.4, 2009, p.132-140.

LOOMIS, P. R. **Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen.** Veterinary Clinics North American Equine Practice, v. 22, n. 3, 2006, p. 663-676.

LOVE, C. C. **Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness.** In: YOUNGQUIST, R. S.; THARELFALL, W. R. Current therapy in large animal. Theriogenology. 2nd. ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.

MAPA. **Equideocultura.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

MCKINNON, A. O. *et al.* **Oocyte transfer in the mare:** preliminary observations. Equine Veterinary Science, v.6, n.6, p.306-309, 1987.

MCKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction.** John Wiley & Sons, USDA. 2011.

MEIRA, C. **Endocrinologia da Reprodução, dinâmica folicular, superovulação e transferência de embriões na espécie equina**. 2007. (Área da Reprodução) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6 a edição. Porto Alegre: Sulina, 750p,1987.

Ministério da Guerra. **Inseminação Artificial**. Manual Técnico. 1ª edição, 1957, 32p.

NAGAI, T. **The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes**. Theriogenology, v.55, p.1291-1301, 2001.

OLIVEIRA, J. N.; PEREIRA, A. T. **BIOTECNOLOGIA: TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS**. Disponível em: <<http://bit.ly/2kDe478>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

PALMER, E. *et al.* **In vitro fertilization in the horse**. A retrospective study J Reprod Fert. 44. p.375-385. 1991.

PANARACE, M. *et al.* **First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large scale embryo transfer program**. Theriogenology, v. 81, p. 520-525, 2014.

PARANÁ. R. A. S. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Equideocultura**: 15/12/2017. 2017. Disponível em: <<http://bit.ly/2ZE9iEZ>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. **Fecundação in vitro em bovinos**: aplicação comercial. Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl., v.28, p.186-187, 2000.

RODRIGUES, C. A. L. S. *et al.* **Fertilização in vitro (FIV)**: Revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça, v. 7, n. 12, p.01-04, jan. 2009. Semestral. Disponível em: <<http://bit.ly/2parGc0>>. Acesso em: 05 maio 2019.

RODRIGUES, J. L.; RODRIGUES, B. A. **Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético**. Ceres, Porto Alegre, v. 4, n. 56, p.428-436, jul. 2009. Bimestral. Disponível em: <<http://bit.ly/36ktXSR>>. Acesso em: 05 maio 2019.

SAMPER, J. C. **Techniques for artificial insemination**. In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFALL, W. R. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 37-42.

SAMPER, J. C. *et al.* **Commercial breeding with sexed stallion semen**: reality or fiction? Journal of Equine Veterinary Science, v. 32, p. 471-474, 2012.

SANGILD, P.T. *et al.* **Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos**. Biol. Reprod., v.62, p.1495-1504, 2000.

SÃO PAULO. Rafael Herrera Alvarez. Apta Regional. **Reprodução animal e Biotecnologia**. 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/2XvFNyA>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

SEVERO, N. C. **HISTÓRIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E DAS BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS NO BRASIL**. Disponível em: <<http://bit.ly/2K9tvNW>>. Acesso em: 18 abr. 2019.

SEVERO, N. C. **História da inseminação artificial no Brasil**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p.17-21, mar. 2015. Disponível em: <<http://bit.ly/2Q9hn2Z>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SILVA, A. E. D. F; UNANIAN, M. M.; ESTEVES, S. N. **Criação de Equinos: Manejo Reprodutivo e da Alimentação**. Brasília: Embrapa, 1998. 101 p. Disponível em: <<http://bit.ly/2WrnG3a>>. Acesso em: 01 abr. 2019.

SILVA, M. A. **When should a mare go for assisted reproduction?** Theriogenology, v.70, n.3, p.441-444, Aug. 2008.

SOUZA, N. L. *et al.* **FISIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ASININOS**. In: CONGRESSO NORTE NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 4 ed., 2012, Fortaleza. Palestra. Campina Grande: Edição Especial, 2012. p. 207-218. Disponível em: <<http://bit.ly/2rxsokt>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

SQUIRES, E. L. *et al.* **A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro**. Theriogenology, 1, 306. 1996.

SQUIRES, E. L. *et al.* **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999.

TAVEIROS, A. W. *et al.* **Perda de concepto em programa de inseminação artificial e de transferência de embriões em equino da raça mangalarga marchador**. Revista de Medicina Veterinária. 2(2): 28-33, 2008.

TRECENTI, A. S.; ZAPPA, V. **Clonagem Animal: Revisão de literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça, v. 20, n. 11, p.01-31, jan. 2013. Disponível em: <<http://bit.ly/34CHOIY>>. Acesso em: 18 out. 2019.

TRISCHNER, M. **Evaluation of deep-frozen semen in stallions**. Journal of Reproduction and Fertility Suppl, v. 27, p. 53-59, 1979.

THOMPSON, J.G. **In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos a decade of achievement**. Anim. Reprod. Sci, v.60-61, p.263-275, 2000.

UEL. **Medicina Veterinária 40 anos: História do Curso de Medicina Veterinária na UEL**. 2013. Disponível em: <<http://bit.ly/2JWiZct>>. Acesso em: 30 out. 2019.

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

VALLECILLO, A. *et al.* **Potencial de la transferencia embrionaria para la conservación del caballo de raza hispano-árabe.** *Archivos de Zootecnia*, 56, 581-585. 2007.

WILBORN, R; PUGH, D.G. **Donkey Reproduction.** IN: *Equine Reproduction, Second Edition*. Edited by Angus O. McKinnon, Edward L. Squires, Wendy E. Vaala and Dickson D. Varner c_ Blackwell Publishing Ltd, 2011.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. **Large offspring syndrome in caule and sheep.** *Rev. Reprod.*, v.3, p.155-163, 1998.

ZÚCCARI, C. E. S. N. *et al.* **Vantagens e desafios das biotécnicas avançadas utilizadas na reprodução equina assistida.** *B. Indústr. Animal, Nova Odessa*, v. 1, n. 71, p.84-93, jan. 2014. Disponível em: <<http://bit.ly/36UeIWu>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Questionário

Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio

Discente: Emily Dias Mattos

Professor responsável: Daniel Meneguello Limeira

Questionário - Biotecnologia aplicada à reprodução de equinos

Seção 1 - referente ao criador

1. Qual é o local da criação?

2. Há quanto tempo você está nesse ramo (como criador de equinos)?

3. Qual é o tamanho do rebanho (número de matrizes e reprodutores)?

4. Com qual (is) raça (s) você trabalha?

5. Qual é a finalidade da criação?

Seção 2 - referente à biotecnologia aplicada

6. Qual ou quais das técnicas apontadas abaixo você utiliza ou já utilizou?

Inseminação artificial

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Transferência de embriões

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Coleta de sêmen

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Criopreservação espermática

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Aspiração folicular

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Injeção intracitoplasmática de espermatozóide

Qual a frequência?

sempre quase sempre às vezes quase nunca nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Transferência de óocitos

Qual a frequência?

sempre quase sempre às vezes quase nunca nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Sexagem de sêmen

Qual a frequência?

sempre quase sempre às vezes quase nunca nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Sexagem fetal

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Clonagem

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Outra. Qual? _____

Qual a frequência?

() sempre () quase sempre () às vezes () quase nunca () nunca

Qual é a formação do profissional que realiza a técnica?

Seção 3 - referente aos custos ou ao investimento

7. Quanto você gasta por ano em biotecnologia aplicada à reprodução?

Seção 4 - referente ao mercado

8. Os profissionais que você contrata para realizar as biotécnicas são da sua região? Caso não, de onde são?

9. Você tem dificuldades para encontrar profissionais qualificados para aplicar as biotécnicas?

10. Na sua opinião, qual a maior dificuldade observada em biotecnologia reprodutiva ou o que poderia melhorar em biotecnologia reprodutiva?

Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Daniel Meneguello Limeira e Emily Dias Mattos, respectivamente, professor e aluna do Curso Técnico em Biotecnologia Integrado ao Ensino Médio, do Instituto Federal do Paraná - campus Londrina, convidamos o(a) Senhor(a), a participar de uma pesquisa intitulada Biotecnologia aplicada à reprodução de equinos na região de Londrina-PR.

- a) O objetivo desta pesquisa é realizar um levantamento das biotécnicas utilizadas para a reprodução de equinos na região de Londrina-PR.
- b) Para sua participação nesta pesquisa, será necessário responder um questionário contendo 17 questões, o que levará aproximadamente 15 minutos.
- c) Ao participar desta pesquisa, poderá ocorrer algum desconforto, principalmente relacionado à questão de número 7, referente aos custos ou ao investimento.
- d) O risco relacionado ao estudo pode ser o constrangimento. O risco será minimizado da seguinte maneira: caso sinta-se constrangido(a), não é necessário responder a questão.
- e) Os benefícios em participar da pesquisa consistem na compilação do conhecimento científico aplicado à biotecnologia na reprodução animal. A compilação, bem como a elevação desse conhecimento, podem revelar as necessidades do setor, apontando suas fragilidades e potencialidades. Tal conhecimento pode nortear políticas públicas e investimento privado para o desenvolvimento da pecuária na região de Londrina - PR. Além de poder nortear políticas públicas de maior abrangência, o participante, já com os resultados da pesquisa, poderá ser beneficiado, na medida em que será capaz de tomar decisões mais acertadas acerca de seus meios de produção com base no cenário de produção local. Ademais, este estudo fortalece o vínculo entre o participante e o curso de Biotecnologia do IFPR - Londrina.
- f) Os pesquisadores Daniel Meneguello Limeira e Emily Dias Mattos responsáveis por este estudo poderão ser localizados no IFPR Londrina, localizado à rua Alagoas, 2001 - Jardim Canadá, Londrina - PR, 86020-430, telefone 43 3878-6300 de segunda a sexta das 08:30 às 12:30 para esclarecer eventuais dúvidas que você como participante possa ter e fornecer-lhe as informações que desejar, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se o(a) Senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.
- h) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, tais como membros da banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade.
- i) O material obtido (questionário) será utilizado unicamente para essa pesquisa e será mantido por 05 anos após o término da pesquisa.

- j) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (fotocópia dos questionários e transporte) não são de sua responsabilidade e o(a) Senhor(a) não receberá qualquer outro valor em dinheiro pela sua participação.
- k) Para preservar sua identidade, quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- l) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Federal do Paraná (CEP-IFPR), pelo telefone (41) 3595-7683 e *e-mail*: cep@ifpr.edu.br

Eu, _____, li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual declaro que concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Londrina, ____ de _____ de 2019.

Nome completo e Assinatura do participante da pesquisa

Daniel Meneguello Limeira, Orientador

Emily Dias Mattos, Pesquisadora Responsável

Nome da aplicadora do TCLE: Emily Dias Mattos