



MARIANE ARANTES DO NASCIMENTO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA NA ÁREA DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

LAVRAS - MG

2019

MARIANE ARANTES DO NASCIMENTO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA NA ÁREA DE REPRODUÇÃO ANIMAL**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso
de Medicina Veterinária, para a obtenção do
título de Bacharel.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

LAVRAS - MG

2019

MARIANE ARANTES DO NASCIMENTO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA NA ÁREA DE REPRODUÇÃO ANIMAL**

**SUPERVISED STAGE REALIZED IN THE FEDERAL UNIVERSITY OF
VIÇOSA IN THE ANIMAL REPRODUCTION AREA**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de
Medicina Veterinária, para a obtenção do título
de Bacharel.

Aprovado em 19 de Junho de 2019

Dr. Luis David Solis Murgas

Dr. Nadja Gomes Alves

Dr. Marcos Ferrante

M.V Renata Catão Egger

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

LAVRAS-MG

2019

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar a força necessária para que eu possa correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais Luiz Carlos e Maria Aparecida por todo amor, companheirismo e por depositarem toda sua confiança em mim.

A minha família pelo apoio e torcida durante esses anos.

Ao meu namorado Felipe por ter me acompanhado desde o início dessa etapa, pelos conselhos, atenção e por tornar tudo mais fácil ao seu lado.

A todos meus amigos que, mesmo com a distância sei que estavam comigo, e a Mariana e Maria Clara, que foram os anjos que tive por perto.

Aos meus animais de estimação que tornam os meus dias mais felizes. E também aos que já se foram, mas deixaram a minha vida um pouco mais doce por seu amor e lealdade.

Agradeço ao REPRODUZ e ao NEPAD por todo conhecimento adquirido.

Agradeço a todos os Professores pelo dom de transmitir seus conhecimentos, em especial ao MV Prof. Dr. Luis David Solis Murgas pela orientação, dedicação e disponibilidade.

Agradeço a banca avaliadora por aceitarem o convite.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A disciplina PRG107 é ofertada no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras e é caracterizada pelo estágio supervisionado. Possui como objetivo aprimorar o conhecimento do aluno e tornar possível a aplicação prática do aprendizado adquirido durante toda a graduação. O estágio supervisionado foi realizado no setor de Reprodução do Departamento de Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa sob supervisão do MV Prof. Dr. José Domingos Guimarães e orientação do MV Prof. Dr. Luis David Solis Murgas. O estágio foi realizado no período de primeiro de fevereiro a 26 de abril de 2019, totalizando 456 horas. Neste relatório foram descritas as atividades desenvolvidas durante esse período, além de descrever a técnica de maturação *in vitro* de oócitos suínos e relatar um caso de orquite traumática associada a hidrocele em garanhão da raça mangalarga marchador. O estágio supervisionado é fundamental para a formação profissional dos futuros Médicos Veterinários, formados na Universidade Federal de Lavras.

Palavras-chave: Maturação *in vitro*. Orquite. Hidrocele. Exame andrológico. Exame ginecológico.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. LOCAL DE ESTÁGIO	8
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	10
3.1 Avaliação da morfologia espermática.....	11
3.2 Exames Andrológicos	12
3.3 Castrações	14
3.4 Exames ginecológicos, diagnósticos de gestação e sexagem fetal	15
3.5 Protocolos de IATF.....	18
3.6 Casos atendidos no hospital veterinário de grandes animais.....	21
3.7 Acompanhamento de aulas	22
3.8 Distocias.....	22
3.9 Aspiração folicular.....	23
4. RELATO DE CASO - ESTUDO PILOTO DA MATURAÇÃO IN VITRO (MIV) DE OÓCITOS SUÍNOS.....	24
4.1 Revisão de literatura	24
4.1.1 Ovogênese.....	24
4.1.2 Foliculogênese	25
4.1.3 Maturação <i>in vitro</i>	26
4.1.4 Avaliação da maturação <i>in vitro</i>	27
4.2 Relato de caso	28
4.2.1 Local	28
4.2.2 Coleta de ovários	28
4.2.3 Aspiração folicular e seleção dos complexos cumulus oócito (CCO's).....	29
4.2.4 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	32
4.2.5 Avaliação da maturação oocitária.....	32
4.3 Resultados e discussão.....	33

5. RELATO DE CASO - ORQUITE TRAUMÁTICA ASSOCIADA A HICROCELE EM GARANHÃO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR.....	38
5.1 Revisão de literatura	38
5.1.1. Espermatogênese	38
5.1.2 Orquite, hidrocele e degeneração testicular	38
5.2 Relato de caso	40
5.2.1 Anamnese.....	40
5.2.2 Exame físico	41
5.2.3 Exames complementares.....	41
5.2.4 Tratamento	44
5.2.5 Avaliação macroscópica	46
5.2.6 Histopatologia	49
5.2.7 Morfologia espermática	50
5.3 Resultados e discussão.....	50
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

A disciplina PRG107 é ofertada no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras e é caracterizada pelo estágio supervisionado. É constituída por 408 horas práticas que devem ser realizadas no local de estágio. Após realizadas tais atividades, deve ser elaborado um relatório de estágio como trabalho de conclusão de curso (TCC), necessário para a obtenção do título de bacharel.

O estágio supervisionado foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, na área de reprodução animal. No período de estágio foram exercidas atividades práticas a campo, que consistiram no acompanhamento reprodutivo de animais pertencentes a Universidade e a produtores da região. Dentre essas atividades, então a realização de exames andrológicos, exames ginecológicos, diagnósticos de gestação e inseminação artificial em tempo fixo.

Também foram realizadas atividades em laboratório tais como a análise da morfologia espermática, aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos. A duração do período de estágio foi do dia primeiro de fevereiro a 26 de abril de 2019, totalizando 456 horas.

O estágio supervisionado tem como objetivo aprimorar o conhecimento do aluno e tornar possível a aplicação prática do aprendizado adquirido durante toda a graduação. Dessa maneira, o estágio faz com que o estudante torne-se mais preparado para enfrentar o mercado de trabalho ou seguir a carreira acadêmica. Esse trabalho foi desenvolvido sob a orientação do MV Prof. Dr. Luis David Solis Murgas e possui como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado.

2. LOCAL DE ESTÁGIO

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) possui sede na cidade de Viçosa (MG), zona da mata mineira, a 225 km de Belo horizonte. Além disso, possui campus nas cidades de Rio Paranaíba e Florestal. Sua inauguração ocorreu no ano de 1926 como Escola Superior de Agricultura e Veterinária (ESAV) e teve sua federalização em 1969. O campus de Viçosa atualmente conta com 47 cursos de graduação, além de pós-graduação. Dentre os cursos oferecidos está o de Medicina Veterinária, que foi criado no ano de 1976 e dois anos depois iniciou-se a construção do atual Departamento de Veterinária.

O Setor de Reprodução Animal possui dois laboratórios, o Laboratório de Andrologia Animal (L.A.A) (Figura 1) que conta com 2 microscópios, onde a principal atividade é a análise

da morfologia espermática de materiais coletados em atividades a campo. O outro laboratório é de maturação de ovócitos e fecundação *in vitro* (MOFIV) que possui uma sala contendo equipamentos como pHmetro, balança, banho maria e geladeira, outra sala que contém autoclave, estufa de secagem e estufa de esterilização, uma sala destinada a lavagem dos materiais utilizados e a sala de cultivo que dispõe de uma capela de fluxo laminar, onde ocorre a seleção dos oócitos de acordo com a sua qualidade e uma estufa de CO₂ para a maturação *in vitro* (Figura 2).

Ambos laboratórios são utilizados por alunos de pós-graduação e são de responsabilidade do Professor Dr. José Domingos Guimarães. A equipe é formada por três mestrandos, cinco doutorandos e dois pós doutorandos. Além dos professores responsáveis pela reprodução, que também realizam assistência ao hospital veterinário de grandes animais.

As linhas de pesquisa atuais são com protocolos de IATF (Inseminação artificial em tempo fixo) em bovinos, MIV e FIV (Fertilização *in vitro*) em suínos, hipoplasia testicular em touros da raça Gir e biometria testicular em cavalos da raça Mangalarga Marchador.

José Domingos Guimarães, supervisor do estágio, possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural da Amazônia (1986), Mestrado em Zootecnia (1993) e Doutorado em Medicina Veterinária pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (1997). Suas áreas de atuação são: criopreservação de gametas masculinos e feminino, fisiologia e morfofisiologia, produção e reprodução de bovinos, caprinos, suínos e equinos.

Figura 1- Laboratório de Andrologia Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 2- Sala de cultivo do laboratório de maturação de ovócitos e fecundação *in vitro* do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.



Fonte: Do autor (2019).

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades de estágio tiveram início no dia primeiro de fevereiro de 2019 e término dia 26 de abril de 2019, totalizando 456 horas. Esse período caracterizou-se pelo acompanhamento dos Médicos Veterinários tanto em atividades a campo quanto em laboratório. Na Tabela 1 são apresentadas as atividades desenvolvidas.

Tabela 1- Atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado

Atividades desenvolvidas	Quantidade de atividades realizadas
Análise de morfologia espermática	100
Exames andrológicos	30
Castrações	2
Exames ginecológicos	578
Diagnósticos de gestação e sexagem fetal	368
Protocolo de Inseminação artificial em tempo fixo	65
Casos atendidos no Hospital Veterinário	4
Acompanhamento de aulas	25
Distocias	1
Aspiração folicular	222

3.1 Avaliação da morfologia espermática

Para avaliação da morfologia espermática pode ser realizada a técnica de esfregaço corado ou de preparação úmida. Em campo, após realizar a coleta seminal, são depositadas gotas de sêmen em um eppendorf contendo solução formol-salina tamponada (1 mL) até que a solução atinja um aspecto turvo. Para a realização da técnica de preparação úmida, primeiramente com uma pipeta, é realizada uma leve mistura do material para que a amostra coletada não fique muito concentrada. Feito isso, é colocada uma gota da solução sobre a lâmina que em seguida é coberta por uma lamínula. Com o auxílio de um papel toalha, essa área é pressionada para que elimine o excesso de líquido, durante essa fase deve-se evitar que ocorra o deslizamento da lamínula sobre a lâmina, que pode causar danos as células espermáticas como a decapitação. Para que a preparação se conserve por mais tempo, pode-se fixar a lamínula à lâmina com o uso de esmalte para unhas. Em seguida aplica-se óleo de imersão sobre a lâmina, que é levada até um microscópio de contraste de fase (x1000) (Figura 3).

Figura 3- Lâmina contendo sêmen bovino após realização da técnica de preparação úmida, visualizada em microscópio de contraste de fase (x1000)



Fonte: Do autor (2019).

Já na técnica de esfregaço corado, após aplicar uma gota da solução sobre a lâmina, é realizado um esfregaço interrompido, em seguida a lâmina é corada com panótico. Para a

técnica da coloração, a lâmina é mergulhada durante 10 segundos em cada uma das três soluções e é analisada sob imersão, em microscopia óptica (x1000) (Figura 4). Para a avaliação da morfologia espermática são contadas no mínimo 200 células, e os defeitos são classificados de acordo com o local em que se encontram, ou seja, na cabeça ou cauda, e também podem ser identificados em defeitos menores e maiores, de acordo com BLOM (1973).

Figura 4- Lâmina contendo sêmen bovino após realização da técnica de esfregaço corado, visualizada em microscopia óptica (x1000).



Fonte: Do autor (2019).

3.2 Exames Andrológicos

Os exames andrológicos foram realizados na Fazenda Brasília Agropecuária localizada na cidade de São Pedro dos Ferros, Minas Gerais. Inicialmente realizou-se inspeção dos animais observando-se cascos e aprumos. Os animais eram colocados em troncos de contenção onde era feita a inspeção dos órgãos externos do sistema genital para verificar se havia alterações e através da palpação foi avaliada a consistência e mobilidade testicular. Feito isso, realizou-se a medida do perímetro escrotal em seu maior diâmetro utilizando-se fita métrica e com o paquímetro foi observada a altura (sentido dorso-ventral) excluindo-se a cauda do epidídimo e largura (sentido látero-lateral). O comportamento sexual não foi avaliado pois não havia fêmeas em cio. À palpação transretal foi realizada a avaliação das vesículas seminais de acordo com tamanho, simetria, consistência e lobulação. A coleta de sêmen foi realizada usando eletro

ejaculador, sendo avaliado seu volume e aspecto, de modo que os ejaculados foram coletados em tubos falcon (15 ml) acoplados a funis plásticos. O aspecto pode ser denominado aquoso, opalescente, leitoso (Figura 5) ou cremoso, sendo diretamente relacionado a concentração espermática (Tabela2). Foi colocada uma gota de sêmen em uma lâmina pré-aquecida a 37°C e em microscópio óptico com objetiva de 10x foi avaliado turbilhonamento (0-5). Em seguida, para a avaliação da motilidade (%) e vigor (0-5) depositou-se uma gota de sêmen sob uma lâmina pré-aquecida, que foi coberta com lamínula e observada em microscópio óptico com objetiva de 40x. Em um eppendorf contendo solução formol-salina tamponada (1 mL) depositou-se gotas de sêmen até atingir aspecto turvo, para realizar a análise da morfologia espermática em laboratório.

Tabela 2- Relação entre aspecto seminal e concentração espermática em bovinos

Aspecto seminal	Concentração espermática em mm³
Cremoso	> 1000 x 10 ⁶ /mm ³
Leitoso	500 a 1000 x 10 ⁶ /mm ³
Opalescente	300 a 500 x 10 ⁶ /mm ³
Aquoso	< 300 x 10 ⁶ /mm ³

Fonte: Pimentel (2008).

Figura 5- Amostra de sêmen bovino de aspecto leitoso coletado na fazenda Brasília.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 6- Expoente TE de Brasília - Grande Campeão Megaleite 2016.



Fonte: Do autor (2019).

3.3 Castrações

Foram realizadas duas castrações cirúrgicas durante o período de estágio, ambas em suínos pertencentes à UFV. Os animais eram do sexo masculino e possuíam 200 kg de peso corporal. Inicialmente foi feita a contenção dos animais para a realização do procedimento anestésico. Os fármacos utilizados para a anestesia foram Quetamina (7mL) e Diazepam (7mL), ambos associados na mesma seringa e aplicados no seio orbital. Imediatamente o animal entrou em plano anestésico sendo posicionado em decúbito lateral. Para a realização da anestesia local utilizou-se 25 ml de lidocaína, sendo aplicada na região subcutânea entre os testículos e também intratesticular. Utilizou-se iodo para a antissepsia do local. Com um bisturi foi realizada uma incisão sobre pele e tecido subcutâneo ao longo da rafe mediana do escroto. Um dos testículos foi exteriorizado coberto pela camada parietal da túnica vaginal, feito isso realizou-se uma incisão na túnica vaginal expondo o testículo. Em seguida foi identificado o cordão espermático, fixado com pinça hemostática e feito uma ligadura circundando suas estruturas, posteriormente realizou-se a incisão do cordão espermático com o bisturi, e também a incisão do ligamento da cauda do epidídimo removendo assim o testículo. O mesmo procedimento foi feito com o testículo contralateral. Com o auxílio de uma gaze limpou-se a região e em seguida lavou-a com água e iodo. Como pós-operatório foi receitado antibiótico e anti-inflamatório por no mínimo três dias.

3.4 Exames ginecológicos, diagnósticos de gestação e sexagem fetal

Os exames ginecológicos possuem como objetivo identificar a fase do ciclo estral, causas de infertilidade, distúrbios puerperais e avaliar se o animal está apto à reprodução (FRENCH *et al.*, 2018). Primeiramente é importante ter conhecimento do histórico do animal, em seguida realiza-se a inspeção, na qual é verificada a conformação geral do animal, escore de condição corporal (ECC) e se há presença de secreção vaginal ou alterações vulvares.

Posteriormente é realizada a palpação transretal, utilizando-se luvas próprias para tal atividade, na qual é invertida para evitar lesões na mucosa retal do animal. Durante o exame são avaliadas as estruturas do trato reprodutivo, como cérvix, útero, tuba uterina e ovários. Tal exame é de grande importância para verificar se há alterações no trato reprodutivo possibilitando o tratamento ou descarte do animal, antes por exemplo da implementação das biotécnicas da reprodução no rebanho. Feita a palpação transretal, pode-se também utilizar a ultrassonografia.

A ultrassonografia baseia-se na emissão de ondas sonoras de alta frequência geradas pelos cristais pizoelétricos presentes no transdutor do aparelho. Ao chegar aos tecidos, essas ondas voltam para o transdutor em formato de eco. A ultrassonografia em Tempo-Real Modo-B é a utilizada na reprodução animal, ela foi desenvolvida na década de 70 na reprodução humana, sendo utilizada na medicina veterinária pela primeira vez em 1980, na espécie equina (GINTHER, 2014). Nesse modo, os ecos captados pelos cristais pizoelétricos são representados no monitor na forma de pontos em diferentes tonalidades de cinza. Cada tecido possui diferentes graus de ecogenicidade (geração de eco) o que possibilita diferenciá-los. Os transdutores utilizados para a via transretal possuem de 5,0 a 7,5 MHz (HAFEZ 2004).

O Ultrassom Veterinário utilizado durante as práticas à campo é o Mindray P/B - DP 2200 VET e o transdutor é linear, na qual resulta em uma imagem retangular (FRICKE, 2002).

Durante as visitas à campo para a realização dos exames ginecológicos foram encontrados em bovinos casos de alterações cervicais como cérvix tortuosa, uterinas como endometrites e metrites, tubárias como a salpingite e hidrossalpinge e ovarianas como cisto foliculares. Os casos recebiam o devido tratamento para que o animal entrasse no manejo reprodutivo. Em casos que não possuem tratamento como a cérvix muito tortuosa que impossibilita a prática de inseminação artificial os animais eram descartados.

Nas espécies caprina e suína os exames ginecológicos eram realizados utilizando apenas a ultrassonografia.

Tabela 3- Exames ginecológicos realizados por espécie durante o período de estágio.

Espécie	Quantidade
Bovinos	546
Suínos	20
Equinos	7
Caprinos	5

Outro grande objetivo do exame ginecológico é o diagnóstico de gestação que possui como vantagens a diminuição do intervalo entre partos, aumento dos índices produtivos do rebanho, certificação de animais para venda além do considerável valor econômico para o produtor (BALHARA *et al.*, 2013; HAFEZ, 2004).

A maior parte dos diagnósticos de gestação realizada durante o estágio foi na espécie bovina. Deve ocorrer o mais cedo possível após monta natural ou inseminação artificial para que o animal não gestante entre novamente no manejo reprodutivo, ou seja descartado, reduzindo assim o gasto econômico com animais não gestantes no rebanho (HAFEZ, 2004).

Antes do advento da ultrassonografia em tempo real modo B, os diagnósticos eram realizados através da palpação transretal. Atualmente pode-se utilizar os dois métodos, geralmente sendo utilizado primeiro a palpação transretal para em seguida empregar a ultrassonografia (SHELDON; NOAKES, 2002).

Os diagnósticos de gestação eram realizados após ocorrer a inseminação artificial, em todos os casos eram em rebanhos que utilizam a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O diagnóstico precoce era realizado de 28 a 30 dias após a inseminação artificial. Entre 55 e 60 dias após inseminação realizava-se a sexagem fetal, sendo também confirmada a gestação, e aos 90 dias ocorria a reconfirmação da gestação (Tabela 4). As confirmações eram feitas devido as maiores perdas gestacionais ocorrerem durante esse período. Quando as perdas gestacionais ocorrem até 45 dias após fertilização é denominada mortalidade embrionária, e após os 45 dias mortalidade fetal. A maioria das perdas gestacionais ocorrem ainda no período embrionário (VANROOSE *et al.*, 2000).

Já em caprinos e suínos os diagnósticos eram realizados utilizando apenas a ultrassonografia, em caprinos utilizou-se a ultrassonografia transretal, 30 dias após a cobertura. Em suínos os diagnósticos eram realizados a partir de 21 dias após a inseminação artificial, através da ultrassonografia transabdominal.

Tabela 4- Diagnósticos de gestação, sexagem e confirmação na espécie bovina em relação a dias após a inseminação artificial.

Dias após a inseminação artificial	Quantidade de diagnósticos
30*	222
60**	128
90***	18

*Diagnóstico precoce de gestação. ** Confirmação da gestação e sexagem fetal. *** Reconfirmação da gestação.

No diagnóstico precoce de gestação, observa-se durante a palpação em animais prenhes a presença de corpo lúteo no ovário, ligeira assimetria de cornos uterinos e presença de vesícula amniótica no corno ipsilateral ao corpo lúteo. Ao realizar a ultrassonografia observa-se a presença da vesícula embrionária como uma estrutura anecóica contendo em seu interior o embrião (Figura 7).

Figura 7- Embrião bovino após 32 dias de inseminação artificial.



Fonte: Reprodução UFV (2019).

A sexagem fetal é realizada através da ultrassonografia transretal, na qual observa-se a localização do tubérculo genital. O tubérculo genital é uma estrutura embrionária que dará origem ao pênis em machos e ao clitóris nas fêmeas. É uma estrutura hiperecogênica, sendo apresentado no monitor como uma estrutura bilobulada, branca e brilhante. Quando o tubérculo é observado próximo ao umbigo, na sua região caudal, significa que ele é do sexo masculino, já quando é observado abaixo da cauda, o feto é do sexo feminino (STROUD, 2005).

3.5 Protocolos de IATF (Inseminação artificial em tempo fixo)

A IATF consiste na sincronização da ovulação através da manipulação hormonal exógena. Dentre as vantagens dessa biotécnica, está a sincronização do estro de um grande número de animais, concentração do nascimento de bezerros em uma única época do ano fornecendo assim a padronização do rebanho, indução da ciclicidade em vacas em anestro e diminuição das falhas em observação de cio, que é a principal causa de insucessos na inseminação artificial (BÓ; BARUSELLI, 2014).

Os protocolos utilizados durante o período de estágio têm como objetivo promover a atresia folicular. Dois foram os protocolos empregados, em ambos se realizou primeiramente o diagnóstico de gestação (DG), na qual são selecionadas as vacas vazias para que sejam protocoladas. No mesmo dia aplicou-se 2 mL de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil) intramuscular e dispositivo intrauterino de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil). A associação desses dois hormônios provoca um feedback negativo no hipotálamo causando assim atresia folicular e emergência de uma nova onda em 3 a 4 dias. O dispositivo intravaginal de progesterona era mantido por oito dias, para evitar ovulações precoces. No dia oito retirava-se o dispositivo (Figura 8).

Figura 8- Retirada do dispositivo intravaginal de progesterona.



Fonte: Do autor (2019).

Após a retirada do dispositivo, era realizada a aplicação intramuscular de 2 ml de prostaglandina, para ocorrer a regressão do corpo lúteo e consequentemente a ovulação. Em um dos rebanhos, localizado na UFV-Campus Florestal, utilizou-se apenas 1ml de prostaglandina, com o intuito de observar se os animais respondem a essa dose inferior, diminuindo assim os custos da IATF. Os nomes comerciais mais utilizados durante o período de estágio foram Ciosin[®] (MSD Saúde Animal) e Sincrocio[®] (Ouro Fino, Brasil).

O Cipionato de estradiol (E.C.P.[®], Zoetis, Brasil) ou Benzoato de estradiol (Sincrodiol[®], Ouro Fino, Brasil) são utilizados como indutores da ovulação. O primeiro é aplicado no dia oito, diminuindo assim um dia de manejo dos animais. Já o segundo deve ser aplicado no dia nove. Em ambos a aplicação é intramuscular na dose de 1mL. No dia 10 realizava-se a inseminação artificial (Figura 9 e Figura 10).

Figura 9-Animais revelando sinais de estro no dia da inseminação artificial em Florestal-MG.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 10-Inseminação artificial.



Fonte: Do autor (2019).

Os protocolos utilizados durante o período de estágio são representados nas figuras a seguir (Figura 11 e Figura 12).

Figura 11- Protocolo de IATF utilizando cipionato de estradiol

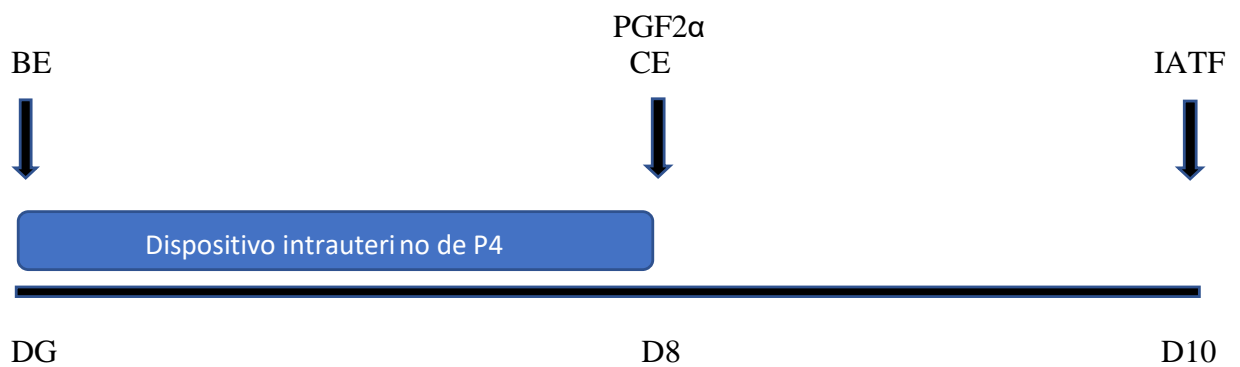
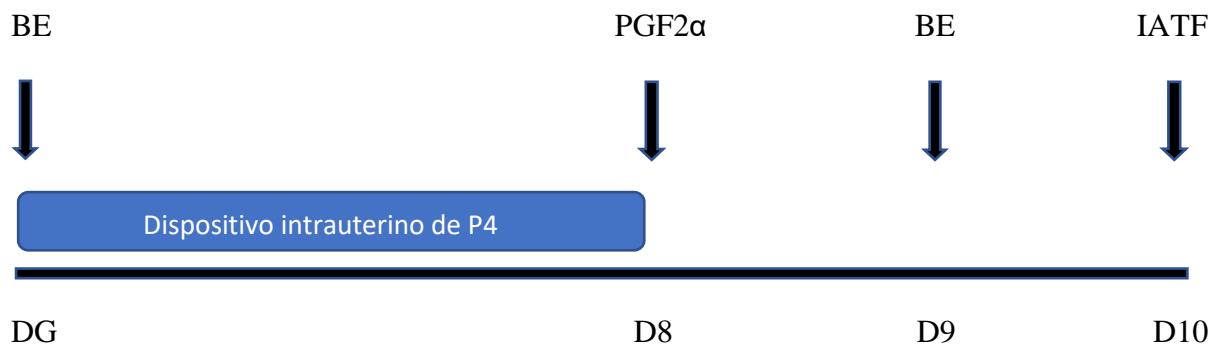


Figura 12- Protocolo de IATF utilizando benzoato de estradiol



3.6 Casos atendidos no hospital veterinário de grandes animais

Os professores responsáveis pela reprodução animal realizam atendimentos no hospital veterinário em casos relacionados com tal área. Primeiramente os animais são atendidos pelos Médicos Veterinários Residentes, na qual é realizada a anamnese e o exame físico, em seguida, é feita a avaliação reprodutiva. Dentre os animais atendidos estão uma mini vaca e uma pônei, encaminhadas ao hospital pois os proprietários desejavam que fosse realizada a avaliação do trato reprodutivo e diagnósticos de gestação. Ambas não estavam prenhes, mas não havia alterações reprodutivas. Outro caso atendido foi de um garanhão apresentando uma massa na região peniana sendo diagnosticado com sarcóide (Figura 13). Foi atendido também um caso de orquite traumática, que será descrito neste trabalho.

Figura 13- Caso de sarcóide equino atendido no hospital veterinário.



Fonte: Do autor (2019).

3.7 Acompanhamento de aulas

Durante o estágio, foram acompanhadas as aulas ministradas para alunos da graduação de Medicina Veterinária e Zootecnia. As disciplinas ofertadas são Reprodução animal I e Fisiologia da Reprodução, respectivamente. O conteúdo fornecido para ambos os cursos é semelhante. Foram acompanhadas aulas teóricas nas quais eram abordados temas sobre reprodução de fêmeas. As aulas práticas eram realizadas no setor de Zootecnia, na qual eram disponibilizadas 20 vacas de corte para as aulas de palpação transretal, e ultrassonografia. As aulas ocorreram também no setor de suinocultura onde foi apresentado o manejo reprodutivo exercido no local e também no setor de caprinos realizando diagnósticos de gestação através da ultrassonografia em Tempo-Real Modo-B.

3.8 Distocias

Um dos Médicos Veterinários do setor de reprodução foi chamado até uma propriedade para o atendimento de uma vaca de leite que havia entrado em trabalho de parto durante a madrugada. O responsável pelo manejo dos animais relatou que houve rompimento da bolsa alantóica e amniótica, mas que aparentemente o animal não realizava a força necessária para a expulsão fetal. Relatou também que chegou a realizar palpação vaginal e observou que o feto apresentava amolecimento dental e que a previsão de parto era apenas 26 dias depois. Durante a palpação transretal o veterinário avaliou a viabilidade fetal, onde foi verificado que havia ocorrido um abortamento. Sua apresentação e atitude estavam corretas, ou seja, apresentação longitudinal anterior e membros e cabeça estendidos. Porém, a posição era cérvico púbica. Foi realizada a rotação do feto, para a posição cérvico sacra e em seguida a tração forçada até que o feto fosse eliminado. O animal era do sexo masculino e possuía aproximadamente 40 quilogramas (kg) (Figura 14). Aplicou-se na vaca Terramicina[®] (Zoetis, Brasil) na dose de 1 mL para cada 10 kg de peso corporal por dois dias e flunixin meglumine (Banamine[®], MSD Saúde Animal) na dose de 2 mL a cada 45 kg de peso corporal durante três dias. Além disso foi fornecido Drench Reviva Farm-O-San para reposição hidroeletrolítica.

Figura 14- Animal do sexo masculino com aproximadamente 40 kg.



Fonte: Do autor (2019).

3.9 Aspiração folicular

Para a realização da aspiração folicular, duas técnicas foram utilizadas. Em bovinos utilizou-se a aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU-Ovum pick-up) que possibilita a recuperação de oócitos de fêmeas vivas, e em suínos foi realizada a aspiração *in vitro*, na qual utilizou-se ovários coletados em abatedouro.

Para a realização da OPU, as fêmeas bovinas eram colocadas em tronco de contenção, e em seguida a região perineal era lavada com água em sabão. Posteriormente, era feita a anestesia epidural com 4 mL de lidocaína 2%. Foi utilizada uma guia de aspiração, na qual era acoplado o transdutor microconvexo, além de possuir em sua extremidade um local onde era inserida uma sonda contendo a agulha 18 Gauge (G). A agulha era conectada ao sistema de aspiração que continha um tubo falcon de 50 mL com 7 mL de soro fisiológico e heparina. Utilizou-se uma bomba a vácuo com pressão de 60 a 80 mmHg. Para a realização da aspiração a guia era inserida pelo Médico Veterinário na vagina do animal ao mesmo tempo que com o braço oposto realizava-se a palpação transretal. O ovário era localizado e posicionado na frente do transdutor, sendo possível vê-lo no monitor do ultrassom. Feito isso, a sonda que possuía a agulha foi acoplada na guia de aspiração e ao chegar no folículo a bomba a vácuo era ligada. A aspiração era feita quando a agulha entrava em contato com o folículo, posteriormente a sonda era rotacionada (90 graus) para ambos os lados fazendo com que ocorresse a aspiração.

Em seguida, o tubo falcon era retirado do sistema, os ovócitos eram lavados com solução fisiológica e classificados em Grau I (citoplasma homogêneo, cumulus contendo mais de 3 camadas de células) Grau II (citoplasma homogêneo e cumulus contendo até 3 camadas de células), Grau III (citoplasma heterogêneo, contendo apenas uma camada ou não recobrimdo totalmente o oócito), e Grau IV (desnudo, ou seja, células do cumulus ausentes). Durante a classificação, os oócitos eram mantidos em meio de manutenção contendo PBS (tampão fosfato-salino) e Soro fetal Bovino. Os oócitos grau I, II e III foram congelados em nitrogênio líquido.

4. RELATO DE CASO – ESTUDO PILOTO DA MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS SUÍNOS

4.1 Revisão de literatura

4.1.1 Ovogênese

Durante a vida fetal inicial, as ovogônias se multiplicam através de divisões mitóticas. Em seguida, elas iniciam o processo de divisão meiótica, se transformando em oócitos primários, inclusos em folículos primordiais, que possuem uma camada de células foliculares achatadas (HARDY *et al.*, 2000).

Ainda durante a vida fetal, os oócitos permanecem na fase de diplóteno da primeira prófase meiótica até o início da puberdade, sendo esse estágio conhecido como vesícula germinativa. Durante essa fase, os oócitos aumentam de diâmetro e acumulam proteínas e RNA mensageiros (mRNAs), que serão utilizados posteriormente durante a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (FISSORE *et al.*, 2002; GOSDEN; TELFER, 1987). Um dos fatores responsáveis por esse bloqueio da meiose é o inibidor da meiose do oócito (OMI) presente no fluido folicular. Além disso o bloqueio meiótico também é causado pela presença de Monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), que assim como o OMI é produzido pelas células da granulosa e chegam ao oócito através das junções gap. A alta concentração de AMPC causa inibição do fator promotor da maturação (MPF) (KAWAMURA *et al.*, 2004).

Durante o crescimento oocitário, as células que se encontram ao seu redor, denominadas células do cumulus oophorus então intimamente ligadas entre si e ao oócito através de junções gap. Essas células possuem projeções que atravessam a zona pelúcida até atingirem o oolema

promovendo assim a transferência de moléculas como proteínas, substratos energéticos, enzimas e aminoácidos (ANDERSON; ALBERTINI, 1976; RICHARDS *et al.*, 2002).

Na puberdade ocorre um pico pré ovulatório de hormônio luteinizante (LH), que promove expansão das células do cumulus e quebra das junções intercelulares, interrompendo assim a comunicação com o oócito. Dessa maneira ocorre a diminuição das concentrações de OMI e AMPc resultando na quebra da vesícula germinativa e retorno da meiose. Ao completar a primeira meiose acontece a liberação do oócito, sendo agora uma célula haplóide chamado de oócito secundário e do primeiro corpúsculo polar que é constituído de cromossomos e organelas como grânulos corticais, ribossomos e mitocôndrias. O oócito permanece em metáfase II sendo liberado nesse estágio, e a divisão meiótica só tem continuação se houver fecundação. Nesse período que compreende entre o pico pré ovulatório de LH e a ovulação ocorre a maturação oocitária (FISSORE *et al.*, 2002; RICHARDS *et al.*, 2002)

A maturação oocitária compreende uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares. A maturação citoplasmática constitui-se de alterações que tornam possível a ocorrência da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Dentre essas alterações estão a redistribuição das organelas celulares, reorganização dos microtúbulos e redistribuição dos grânulos corticais dentro do citoplasma. Já a maturação nuclear consiste na saída do oócito do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica atingindo o estágio de metáfase II (ANGUITA *et al.*, 2007).

4.1.2 Foliculogênese

Durante o desenvolvimento folicular, a camada de células da granulosa inicialmente encontra-se achatada caracterizando assim os folículos primordiais, que são transformados em folículos primários em que as células ao seu redor tornam-se cuboides (HULSHOF, 1994). Em seguida, ocorre um aumento da quantidade de camadas de células, e início da formação da zona pelúcida e da teca sendo denominado folículo secundário (BASSO; ESPER, 2002). Ambos são classificados como folículos pré antrais, durante essa fase, não há dependência das gonadotrofinas hipofisárias para ocorrer o crescimento folicular. Posteriormente são formados pequenos espaços contendo líquido que vão aumentando de tamanho até formar uma única cavidade, sendo então denominados folículos terciários ou antrais que são essencialmente dependentes de gonadotrofinas hipofisárias (BARNETT, 2006).

Em seguida, ocorre a emergência folicular, na qual um grupo desses folículos antrais é recrutado devido ao aumento das concentrações plasmáticas de hormônio folículo estimulante

(FSH). Em espécies monovulatórias, dentre esses folículos recrutados, apenas um é selecionado durante a divergência folicular, na qual sofrerá a ovulação, sendo denominado folículo dominante (FORTUNE, 1994; 2001). Já em suínos ocorre a ovulação de 10 a 25 folículos em cada ciclo (HAFEZ, 2004). A taxa de fecundação é alta, porém há grandes perdas embrionárias durante a gestação.

4.1.3 Maturação *in vitro*

Como visto anteriormente, o desenvolvimento oocitário e folicular são eventos intimamente relacionados entre si. Porém apenas uma pequena parte dos oócitos chega a completar seu desenvolvimento e ser fecundada enquanto a maioria é perdida durante as fases de crescimento (AGUILLAR *et al.*, 2001; HIRAO *et al.*, 1994). Desse modo a utilização das biotecnologias da reprodução é uma ferramenta para aumentar o ganho genético em curto período.

Dentre essas biotecnologias está a Maturação *in vitro* de oócitos que possui a capacidade de resgatar uma grande parte dos oócitos imaturos presentes no ovário permitindo que atinjam a metáfase II, tornando-se viáveis para a fecundação (GILCHRIST *et al.*, 2008).

Em 1972, Mukherjee demonstrou ser possível obter embriões de camundongos em laboratório, através da maturação oocitaria, capacitação espermática e fertilização *in vitro*, fazendo com que houvesse inúmeras tentativas em outros animais. Posteriormente, em 1989, Matioli *et al.* realizaram a maturação e fertilização *in vitro* de oócitos suínos, obtendo pela primeira vez o nascimento de leitões vivos. Em pesquisas anteriores os oócitos obtidos apresentavam alterações de desenvolvimento após a fertilização *in vitro*.

A utilização de oócitos provenientes de ovários de frigoríficos constitui-se de uma fonte de baixo custo, e com grande quantidade de material para a realização da MIV (BAGG *et al.*, 2004). Estudos realizados comparando oócitos de fêmeas púberes e pré púberes indicam que ovários de fêmeas adultas possuem oócitos com maior competência de desenvolvimento em várias espécies domésticas, incluindo os suínos (MARCHAL *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2000).

O meio mais utilizado para a maturação *in vitro* é o TCM 199, que é suplementado com outras substâncias necessárias, havendo variações de protocolos entre os laboratórios. Uma das substâncias utilizadas para suplementar o meio é o FSH, visto que foi observado que não ocorre a formação do antro folicular sem a sua presença. Outra característica que influencia a

maturação oocitária é a presença das células do cumulus bem aderidas ao oócito, sendo indispensáveis para a sua maturação (HIRAO *et al.*, 1994).

Geralmente durante a MIV utiliza-se óleo mineral entre o meio para evitar a evaporação. Porém Shimada *et al* (2002) observaram que a utilização do óleo mineral reduz as taxas de maturação de oócitos suínos.

4.1.4 Avaliação da maturação *in vitro*

Um dos métodos usados para avaliar a maturação nuclear é a fixação dos oócitos em álcool e ácido e em seguida a coloração com aceto-orceína. Os oócitos maduros encontram-se em metáfase II na qual através da microscopia óptica observa-se cromossomos independentes com as cromátides-irmãs unidas por centrômeros. O estudo realizado por Somfai *et al* (2005) revelou que 91,4% dos oócitos que possuíam o primeiro corpúsculo polar já se encontravam em metáfase II, sendo a avaliação da maturação através da visualização do primeiro corpúsculo polar um método viável.

Após o período necessário para a maturação oocitária, pode-se observar a expansão das células do cumulus oophorus, que é um indicador da maturação citoplasmática (SERRET *et al.*, 2007). Além disso, oócitos que apresentam citoplasma heterogêneo após o período de maturação apresentam maior capacidade de fecundação em relação aos oócitos com citoplasma homogêneo, isso ocorre pois eles possuem uma melhor distribuição dos grânulos corticais (NAGASHIMA *et al.*, 1996).

Para uma avaliação com maior acurácia da maturação citoplasmática, observa-se a migração dos grânulos corticais e distribuição das organelas celulares através da microscopia eletrônica. Outro método utilizado é a avaliação da presença do pró-núcleo masculino em oócitos que passaram pelo processo de fertilização (MATTIOLI *et al.*, 1991).

4.2 Relato de caso

4.2.1 Local

A maturação *in vitro* de oócitos suínos foi realizada no laboratório de maturação de ovócitos e fecundação *in vitro* (MOFIV) do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2.2 Coleta de ovários

Os ovários foram obtidos de fêmeas suínas abatidas no frigorífico Saudali (Figura 15) e transportados em garrafa térmica contendo solução fisiológica acrescida de gentamicina (10mg/ml) a uma temperatura de 37° C. O frigorífico é localizado na cidade de Ponte Nova, zona da mata mineira, onde diariamente são abatidos mais de 2 mil animais e produzidos aproximadamente 240 toneladas de carne.

Após a evisceração, as vísceras eram separadas entre brancas e vermelhas e colocadas em bandejas distintas sobre uma mesa rolante. Feito isso, era realizada a identificação do sexo do animal e em seguida a coleta dos ovários, que na maioria das vezes eram de fêmeas pré-púberes. Para a realização desse trabalho foram coletados 52 ovários. O tempo de transporte entre o frigorífico e o laboratório foi em média de 50 minutos.

Figura 15- Planta do frigorífico Saudali em Ponte Nova – MG



Fonte: Frigorífico Saudali (2019).

4.2.3 Aspiração folicular e seleção dos complexos cumulus oócito (CCOs)

Ao chegar ao laboratório os ovários eram lavados com solução fisiológica (0,9 %), colocados em um Becker de vidro (1.000ml) contendo a mesma solução e mantidos em banho maria a 37° C.

Para a aspiração folicular foram utilizadas agulhas 25 x 0,8 mm, 21 G acopladas a seringas descartáveis de 3 ml (Figuras 16, 17 e 18).

Figura 16- Ovário suíno e folículos ovarianos, anteriormente a aspiração folicular.



Fonte: Do autor (2019)

Figura 17- Ovário suíno após aspiração folicular.



Fonte: Do autor (2019).

Figura 18- Líquido folicular proveniente da aspiração.



Fonte: Do autor (2019).

O líquido folicular era mantido em banho maria em um cálice cônico de vidro por um período de 5 a 10 minutos para que ocorresse a sedimentação dos oócitos (Figura 19). Após a aspiração os ovários eram contados, colocados em sacos plásticos e acondicionados em câmara fria até o descarte.

Figura 19- Cálice cônico contendo líquido folicular em banho-maria.



Fonte: Do autor (2019).

O cálice foi encaminhado até sala de cultivo, em que o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado em meio Talp Hepes contendo Cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), Fosfato monossódico (NaH₂PO₄), Lactato de sódio 50%, Bicarbonato de sódio (NaHCO₃), Vermelho fenol, Cloreto de cálcio (CaCl₂), Cloreto de magnésio (MgCl₂), HEPES e Água ultrapura Milli-Q®. Todos os meios utilizados durante o trabalho foram filtrados com filtro de seringa 0,22 µm.

Após serem lavados, os oócitos foram colocados em uma placa de petri contendo a mesma solução acima, onde ocorreu a manipulação e seleção dos complexos cumulus oócitos (COCs) (Figura 20), durante a manipulação a placa de petri era mantida em placa aquecedora a 37° C. A avaliação foi realizada utilizando estereomicroscópio, na qual selecionou-se os COCs que possuíam citoplasma homogêneo e cumulus oophorus compacto contendo no mínimo duas camadas de células. Foram selecionados um total de 150 oócitos. Observou-se que as células do cumulus oophorus apresentavam-se intimamente ligadas entre si e ao ooócito.

Figura 20- Complexos cúmulus-oócitos selecionados para a maturação *in vitro*, apresentando células do cumulus oophorus intimamente ligadas entre si e ao oócito.



Fonte: Do autor (2019).

4.2.4 Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos escolhidos foram lavados duas vezes em meio de maturação composto de TCM-199 com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) acrescido de álcool polivinílico (PVA 0,1%), D-Glicose (3,05 mM), Piruvato de sódio (0,91mM), solução pen/strep, solução LH/FSH (0,5ug/ml) e água ultrapura Milli-Q®. Dos 150 oócitos selecionados, 10 foram separados para não passarem pelo processo de fixação e serem avaliados em microscópio invertido.

Para a Maturação *in vitro* utilizou-se uma placa de petri na qual foram colocadas 5 gotas de 50 microlitros de meio de maturação, em seguida foi depositado óleo mineral entre as gotas, e elas foram recobertas com mais 50 microlitros do meio cada uma. Do grupo de 140 oócitos, foram depositados 28 em cada gota. Já os outros 10 oócitos foram depositados em uma segunda placa de petri, contendo também 100 microlitros de meio de maturação. Em seguida as placas foram acondicionadas em estufa com 5% de CO_2 e temperatura a $38,5^\circ\text{C}$, por um período de 44 horas.

4.2.5 Avaliação da maturação oocitária

Após 44 horas de incubação em estufa, com o auxílio de uma pipeta realizou-se o desnudamento dos oócitos, ou seja, remoção das células do cumulus oophorus para facilitar sua visualização. Em seguida, os 140 oócitos desnudados foram mantidos em solução hipotônica de Cloreto de Potássio (KCl - 0,045 mol/L) por um período de 5 minutos.

Posteriormente à hipotonização, utilizou-se uma lâmina previamente demarcada em formato retangular em seu centro com um cortador de vidro, na qual os oocitos eram depositados dentro da área demarcada ao lado oposto a demarcação, foram colocados 10 oócitos por lâmina, totalizando 14 lâminas. Com o auxílio de um tubo capilar, o excesso de líquido foi retirado, permitindo com que os oócitos ficassem imóveis sobre a lâmina.

Em seguida, foi aplicada uma gota (10 ul) de solução de metanol e ácido acético (2:1) sobre os oócitos e após aguardar a secagem da lâmina, a operação foi repetida. Com a lâmina seca, foram depositadas 4 gotas (40 ul) de solução de metanol e ácido acético (3:1) e após a secagem elas foram acondicionadas em uma cuba de vidro contendo a solução de metanol e ácido acético (3:1) durante 48 horas para a fixação das amostras (Figura 21).

Figura 21- Cuba de vidro contendo solução metanol e ácido acético (3:1).



Fonte: Do autor (2019).

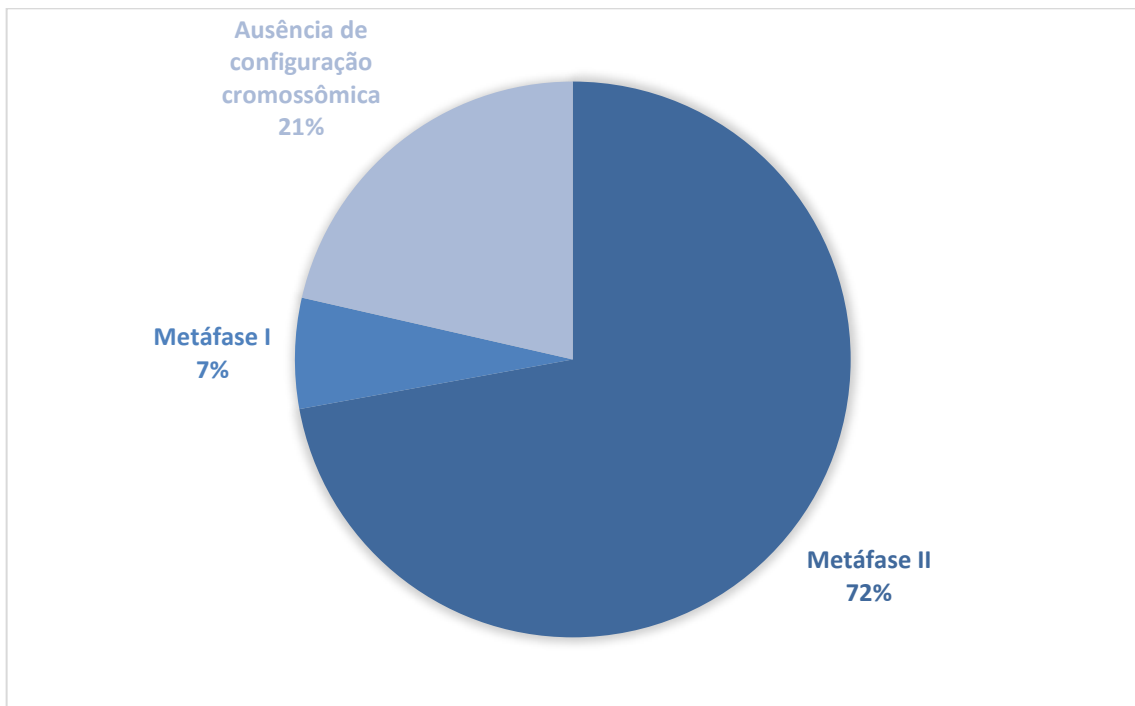
Após o período de 2 dias, as lâminas foram retiradas das cubas, secadas ao ar, coradas com orceína 1% durante 30 segundos e depois lavadas cuidadosamente. Em seguida aguardou-se as lâminas secarem ao ar e foi aplicada uma gota de óleo de imersão sobre os oócitos corados, a área foi recoberta com lamínula (22x22mm) e as margens da lamínula foi vedada com esmalte. Utilizando um microscópio óptico, os oócitos foram avaliados com óleo de imersão (x1000).

Após a avaliação das 14 lâminas, foi calculada a taxa de maturação em porcentagem. O grupo de 10 oócitos que não passaram pelo processo de fixação, foram levados até um microscópio invertido equipado com uma câmera de vídeo, na qual avaliou-se a presença do primeiro corpúsculo polar, esse procedimento foi realizado apenas como um ensaio.

4.3 Resultados e discussão

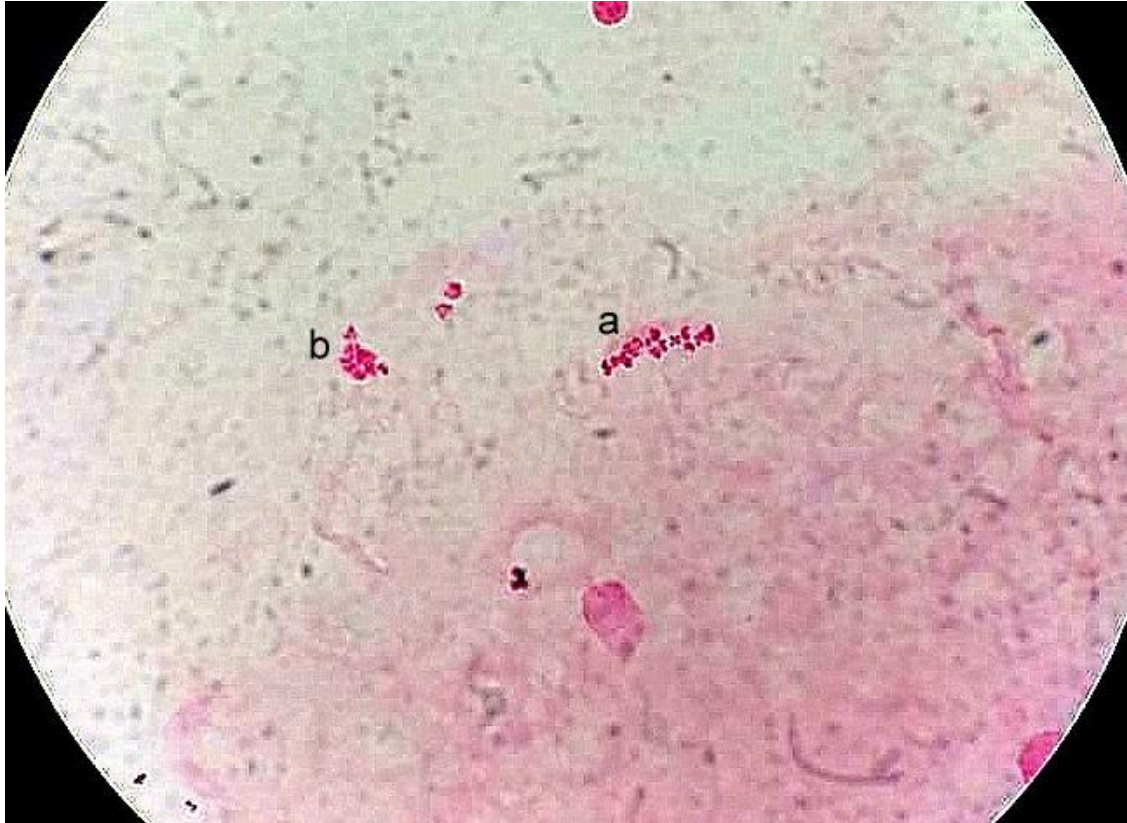
Os dados referentes a configuração cromossômica observada após o período de maturação, estão apresentados como porcentagem no gráfico abaixo (Gráfico 1):

Gráfico 1 – Quantidade de oócitos expressa em porcentagem em metáfase I, metáfase II e com ausência de configuração cromossômica.



Os resultados demonstram que houve uma taxa de 72,14% de oócitos maturados (metáfase II) (Figura 22) em um total de 140 avaliados após 44 horas de maturação. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado por Mattioli *et al* (1991) que utilizaram oócitos suínos em meio TCM 199 suplementado com FSH e LH, na qual oócitos tratados com FSH e LH obtiveram taxa de maturação de 86 e 76%, respectivamente. Enquanto os oócitos do grupo controle sem suplementação de FSH e LH obtiveram apenas 35% de taxa de maturação.

Figura 22- Oócito suíno em metáfase II.

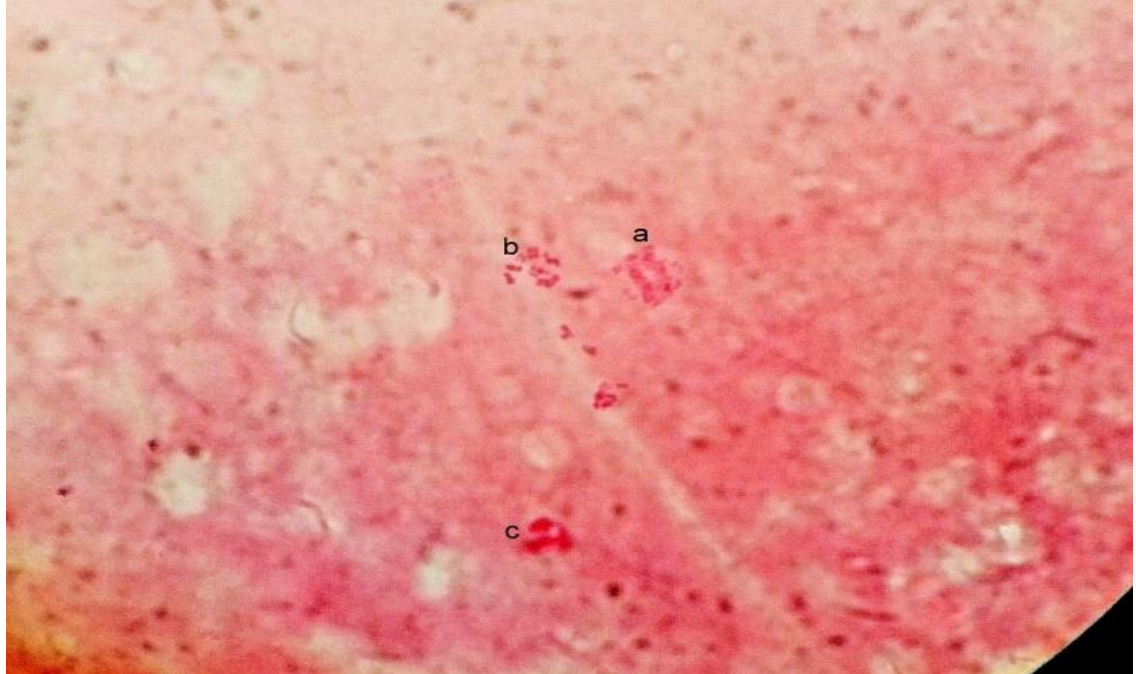


Legenda: configuração cromossômica em metáfase II (a), Primeiro corpúsculo polar (b).
Fonte: Do autor (2019).

Vignola (1994), descreveu a técnica de hipotonização, fixação e posteriormente coloração com orceína como a técnica ideal para identificação de oócitos em Metáfase I e Metáfase II, não sendo adequada para a visualização de oócitos em estágio de vesícula germinativa. Da mesma maneira, neste trabalho foi possível visualizar apenas oócitos em metáfase I e II, sendo o restante classificados como ausência de configuração cromossômica.

Dos oócitos visualizados, 6,43% encontravam-se em estágio de metáfase I (Figura 23) e em 21,43% não foi possível visualizar o conjunto cromossômico, sendo então classificados como ausência de configuração cromossômica.

Figura 23- Configuração cromossômica de oócitos suínos em metáfase I e metáfase II.



Legenda: Na figura observa-se um oócito em configuração cromossômica de metáfase I (a), e outro oócito encontra-se em metáfase II (b), juntamente com seu corpúsculo polar (c).
Fonte: Do autor (2019).

Após as 44 horas de maturação, foi observada a expansão das células do cumulus oophorus, exibida na Figura 24.

Figura 24- Expansão das células do cumulus oophorus de oócitos suínos.

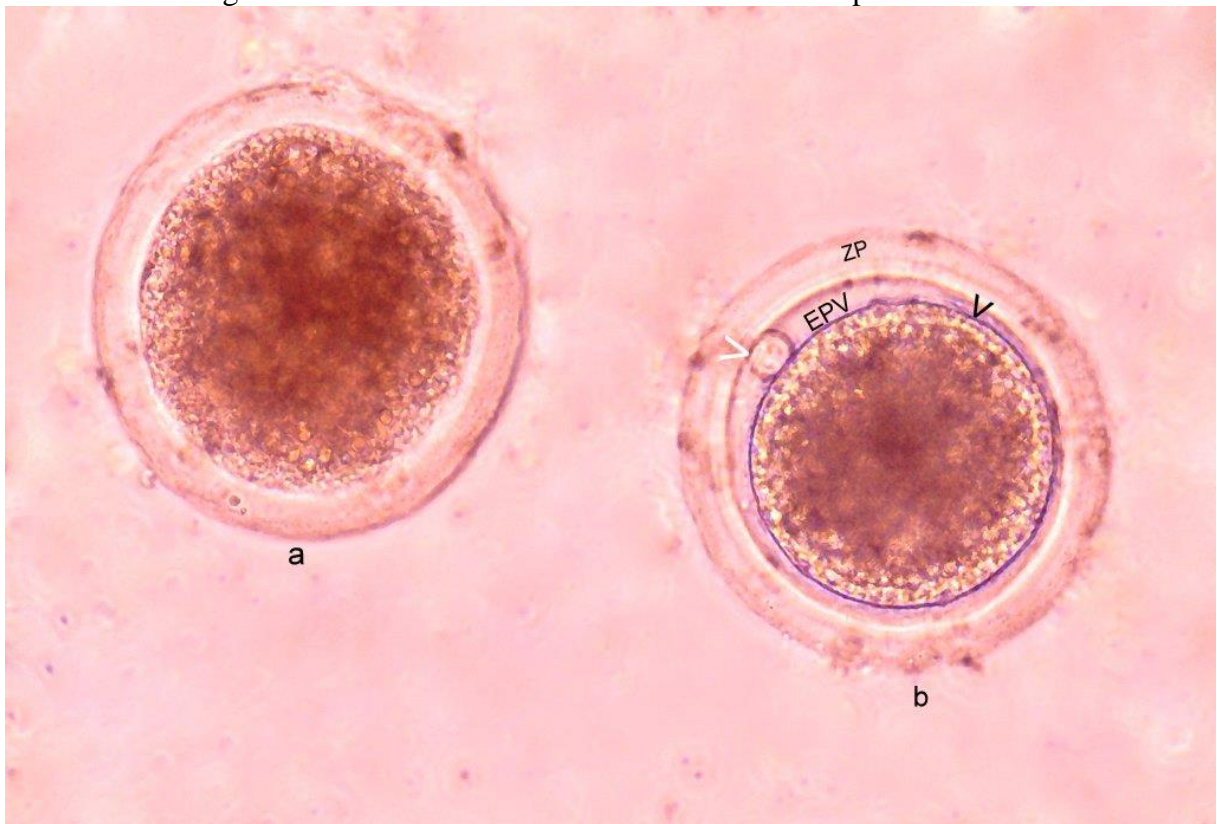


Fonte: Do autor (2019).

Serret *et al* (2007) também observaram a expansão das células do cumulus oophorus após o período necessário para a maturação, demonstrando que essa característica é um indicador da maturação citoplasmática.

Dos 10 oócitos que não passaram pelo processo de fixação, seis apresentavam o primeiro corpúsculo polar ao serem observados em microscópio invertido, o corpúsculo é observado no espaço perivitelino, um compartimento localizado entre a membrana plasmática e a zona pelúcida do oócito (Figura 25).

Figura 25- Oócitos suínos observados em microscópio invertido.



Legenda: A figura apresenta um oócito suíno que não possui corpúsculo polar (a), e um oócito com corpúsculo polar (b). Corpúsculo polar (cabeça de seta branca), membrana plasmática (cabeça de seta preta), espaço perivitelino (EPV), zona pelúcida (ZP).

Fonte: Do autor (2019).

5. RELATO DE CASO - ORQUITE TRAUMÁTICA ASSOCIADA A HIDROCELE EM GARANHÃO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

5.1 Revisão de literatura

5.1.1. Espermatogênese

Os testículos possuem função endócrina e exócrina sendo caracterizadas pela produção de hormônios e a espermatogênese respectivamente. A produção dos espermatozoides ocorre nos túbulos seminíferos, que no garanhão possuem uma média combinada de comprimento de 2.419 metros em cada testículo (VARNER *et al.*, 2007). Os túbulos seminíferos são constituídos pelas células de Sertoli e pelas células germinativas. A espermatogênese é dividida em três etapas, espermatocitogênese, meiose e espermiogênese. A espermatocitogênese consiste nas divisões mitóticas das espermatogônias. O número de gerações de espermatogônias presente no epitélio seminífero varia entre os animais, nos equinos são 5 gerações. As espermatogônias A1 se dividem para formar A2, A3, B1 (intermediária) e B2 consecutivamente. Em seguida as espermatogônias B2 se dividem para formar os espermatócitos primários (HAFEZ, 2004). As espermatogônias do tipo A também se dividem para repor a população de células tronco (A_0). Durante a meiose ocorre formação dos espermatócitos secundário e em seguida espermatídes. Na espermiogênese as espermatídes se diferenciam em espermatozoides. A espermatogênese em garanhões tem uma duração de 57 dias.

5.1.2 Orquite, hidrocele e degeneração testicular

A inflamação é caracterizada pelo conjunto de reações efetuadas pelos tecidos após uma injúria local, tendo como finalidade a defesa do organismo. Aulus Cornelius Celsus descreveu pela primeira vez o processo inflamatório, relatando o tumor, rubor, calor e a dor como seus quatro sinais, denominados sinais cardinais da inflamação. Em seguida, em 1858, o médico Rudolph Virchow acrescentou a perda de função como um sintoma clínico da inflamação (FREIRE, 2013).

A orquite é caracterizada pelo processo inflamatório nos testículos. Podendo ser de maior ou menor extensão e classificada como aguda ou crônica. Várias são suas causas, como a bacteriana devido a feridas ou disseminação hematogênica, parasitológica causada pela

migração de larvas de *Strongylus edentatus*, viral e traumática podendo apresentar-se bilateral ou unilateral (WATSON, 1997).

Outra afecção que pode ser causada pelo trauma testicular é a hidrocele. A túnica vaginal que envolve os testículos, é dividida entre camada visceral e camada parietal, entre essas camadas está a cavidade vaginal que possui uma pequena quantidade de líquido, responsável pelo deslizamento entre as túnicas. A hidrocele consiste em acúmulo anormal de fluido na cavidade vaginal sendo causada pelo desequilíbrio entre a secreção e reabsorção de líquido (RAMÍREZ, 2013). Sua causa traumática pode ser explicada pelos danos linfáticos ao longo do cordão espermático impedindo assim a drenagem linfática. Porém a hidrocele pode também ser secundária a orquite devido as alterações vasculares ocorridas durante a inflamação. Dentre essas alterações estão o aumento do calibre dos vasos, do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular resultando em exsudação de líquido para o meio extravascular. A afecção pode ser diagnosticada pela ultrassonografia, na qual é observada a presença de líquido, e o tratamento consiste em remoção da causa (WALLACE, 1960; WATSON, 1997).

Dentre as consequências da orquite, encontra-se também a degeneração testicular, que consiste em modificações do parênquima testicular, tornando o tecido menos funcional (GARCIA, 2017). A degeneração testicular pode ser causada por diversos motivos como intoxicações, neoplasias, desequilíbrios nutricionais, hormonais, torções e elevação da temperatura (CUNHA *et al.*, 2015). Para que a espermatogênese ocorra normalmente, é necessário que a temperatura dos testículos encontre-se abaixo da corporal, uma elevação dessa temperatura pode ter como consequência a degeneração testicular afetando assim a fertilidade do animal (BLANCHARD, 2001; VAN CAMP, 1997).

A degeneração testicular pode ser bilateral ou unilateral, permanente ou temporária (VAN CAMP, 1997). Inicialmente, os testículos apresentam-se com diminuição de tamanho e consistência macia, podendo evoluir para uma consistência firme devido a fibrose. Segundo Blanchard (2001), ao observar durante o exame clínico a reduzida produção de espermatozoides associada a diminuição do tamanho testicular, pode-se definir o diagnóstico de degeneração. Durante a avaliação da histologia testicular observa-se diminuição ou ausência da espermatogênese, podendo o epitélio seminífero estar ausente, as espermatogônias apresentam núcleo picnótico e citoplasma vacuolizado, pode-se observar também espermátides degeneradas e descamação do epitélio seminífero (VAN CAMP, 1997). Como consequência da degeneração, pode haver diminuição ou ausência de espermatozoides no ejaculado, e aumento de anormalidades principalmente de cabeça e peça intermediária como cita Van Camp (1997). O prognóstico para a reversão da degeneração é dependente do tempo, gravidade e causa. O

tratamento consiste na eliminação da causa, sendo a orquiectomia unilateral uma alternativa de tratamento, como descrito por Gygax (1973) em que foi atendido um garanhão que apresentava inchaço escrotal, aumento do número de espermatozoides anormais e perda de fertilidade, na qual a fertilidade voltou ao normal após a remoção do testículo mais afetado. 70 dias após a orquiectomia o animal apresentava espermatogênese normal.

5.2 Relato de caso

5.2.1 Anamnese

Foi atendido no Hospital Veterinário de Grandes Animais da Universidade Federal de Viçosa (UFV) um garanhão da raça Mangalarga Marchador, chamado Malandro RT, 6 anos de idade, pesando 365 kg, residente na cidade de Ubá – MG, localizada a 65,5 km de Viçosa. Durante a anamnese o proprietário relatou que há 15 dias o animal ficou preso em sua baia pelo escroto, provocando aumento de volume da região (Figura 26), além de manifestar sinais de dor no local. O tratamento realizado na propriedade foi de 10 ml de Flunixin Meglumine, oito dias antes de ser encaminhado a UFV. A alimentação diária do animal consistia em 1 kg de ração, além de capim picado e silagem. Ocasionalmente era fornecido sal mineral.

Figura 26- Garanhão apresentando aumento de volume na região escrotal.



Fonte: Do autor (2019).

5.2.2 Exame físico

Feita a anamnese, foi realizado o exame físico geral, no qual foi constatada frequência respiratória de 17 movimentos por minuto (valor de referência: 8-16), frequência cardíaca de 36 batimentos por minuto (valor de referência: 28-40), ausência de sinais de desidratação e de alterações de motilidade intestinal, mucosas normocoradas e temperatura retal de 37,5°C (valor de referência: (37,5-38,5)).

No exame físico específico durante a inspeção, observou-se um grande aumento de volume da bolsa escrotal, mais acentuadamente do lado direito. Na palpação foi constatado que o testículo direito se encontrava aderido à bolsa escrotal e apresentava consistência muito firme. A temperatura local encontrava-se elevada.

5.2.3 Exames complementares

Termografia testicular

A termografia por infravermelho é uma técnica que consiste na percepção da temperatura superficial de um corpo ou objeto. Todos os corpos emitem radiação infravermelha proporcionalmente a sua temperatura, essa radiação é focada por uma câmera que possui detectores sensíveis à temperatura e é convertida em sinal elétrico. Esse sinal é exibido em uma imagem que representa a divergência de temperatura, onde as áreas mais frescas são representadas nas cores azul ou preta, enquanto as regiões com maior temperatura são exibidas nas cores vermelha ou branca (EDDY *et al.*, 2001; ROBERTO; SOUZA, 2014)

A termografia surgiu devido aos estudos de Hipócrates, que observou a diferença de temperatura em diferentes áreas do corpo e determinou que a doença estava presente nas áreas mais quentes (BERZ, 2007; ROBERTO; SOUZA, 2014). Inicialmente a técnica foi utilizada por exércitos para o desenvolvimento de mísseis com detectores de calor, além de ser utilizada para localizar tropas inimigas. Na medicina humana sua aplicação iniciou-se na área de oncologia sendo posteriormente empregada na Medicina Veterinária, principalmente pelo fato de ser uma técnica não invasiva por não haver necessidade de contato físico entre a câmera e o animal (GADE; MOESLUND, 2014).

Para que a espermatogênese ocorra normalmente, a temperatura testicular deve se encontrar abaixo da corporal, isso é possível devido às glândulas sudoríparas presentes na pele

escrotal, a túnica dartos, músculo cremáster e ao plexo pampiniforme (HAFEZ, 2004). O aumento da temperatura testicular resulta em degeneração do tecido, afetando conseqüentemente na qualidade seminal. Esse aumento de temperatura pode ser ocasionado por diversos fatores, dentre eles o trauma.

Ao avaliar a imagem obtida pela câmera termográfica, observou-se que a temperatura testicular e corporal encontravam-se semelhantes, enquanto algumas regiões testiculares apresentavam temperatura superior a do corpo (Figura 27).

Figura 27- Termografia testicular de garanhão após trauma sofrido na região escrotal.



Fonte: Reprodução UFV (2019).

Ultrassonografia modo-B

A ultrassonografia em tempo-real modo B baseia-se na emissão de ondas sonoras de alta frequência geradas pelos cristais pizeoelétricos presentes no transdutor do aparelho. Ao chegar aos tecidos, essas ondas voltam para o transdutor em formato de eco, gerando uma imagem em diferentes tonalidades de cinza.

Essa técnica é uma boa ferramenta para diagnosticar distúrbios reprodutivos em fêmeas e machos, sendo utilizada pela primeira vez em garanhões em 1987, em uma avaliação das glândulas sexuais acessórias (GINTHER, 2014; POZOR, 2005).

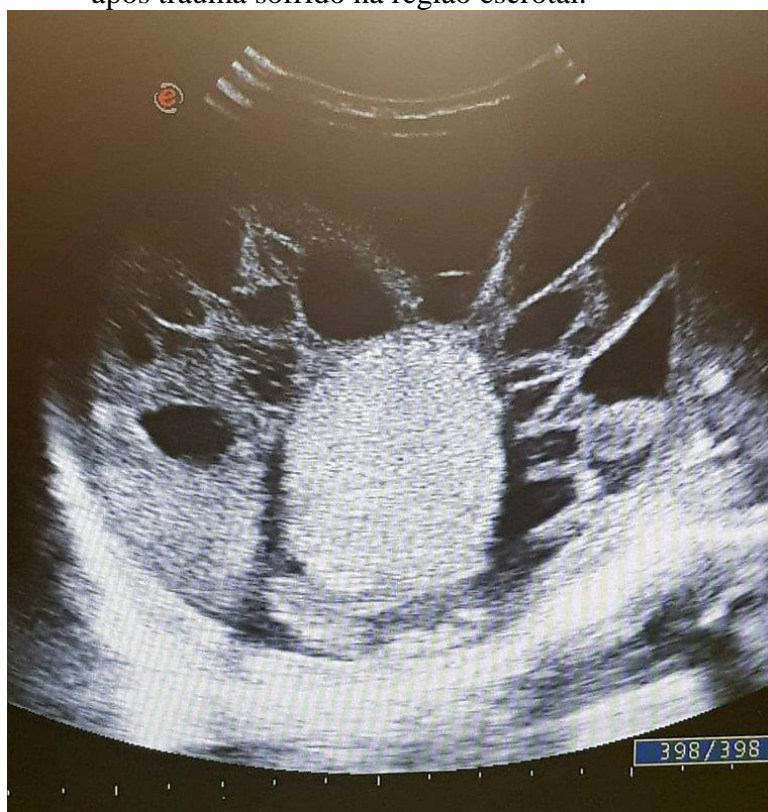
O aparelho utilizado no hospital veterinário foi o MyLab™30 VET GOLD (Esaote®) e transdutor convexo de 6,6 MHz. Para a realização da técnica foi aplicado gel sobre o transdutor e a avaliação foi feita em ambos os testículos. O exame revelou uma grande área anecóica ao redor dos testículos, principalmente o direito, indicando a presença de líquido. Além disso, foram observados feixes hiperecóticos associados ao líquido que envolvia o testículo direito, revelando a presença de septos de fibrina (Figura 28, Figura 29).

Figura 28- Imagem ultrassonográfica do testículo esquerdo de garanhão após trauma sofrido na região escrotal.



Fonte: Reprodução UFV (2019).

Figura 29- Imagem ultrassonográfica do testículo direito de garanhão após trauma sofrido na região escrotal.



Fonte: Reprodução UFV (2019).

5.2.4 Tratamento

Optou-se pela orquiectomia bilateral devido a presença de líquido ao redor de ambos os testículos e por escolha do proprietário, já que o animal não era utilizado na reprodução e o custo da orquiectomia unilateral seria o mesmo da orquiectomia bilateral. Anteriormente, para avaliar se o animal poderia entrar em procedimento cirúrgico, foram realizados o eritrograma (Tabela 5), leucograma (Tabela 6) e contagem de plaquetas (Tabela 7).

Tabela 5- Eritrograma

	Valores encontrados	Valores de referência
Hemácias: (10^6 / μ L)	7,57	6,5 - 12,5
Hemoglobina(g/dL)	10,9	11 – 19
Hematócrito (%)	34,8	32 – 52
Proteína total (g/dL)	6,2	6,0 - 8,0

	Valores encontrados	Valores de referência
VCM (pg)	46,1	34 – 58
HCM (pg)	13,3	13,3
CHCM (%)	29,5	31 – 37

Tabela 6- Leucograma

	Valores encontrados	Valores de referência
Leucócitos (células/ μ L)	12400	5500 a 12500
Blastos:	0	-
Mielócitos:	0	-
Metamielócitos	0	-
Bastonetes: (%)	0	0-2
Segmentados: (%)	64	30-65
Linfócitos: (%)	33	25-70
Eosinófilos (%)	1	0-11
Monócitos (%):	2	1-7
Basofilos: (%)	0	0-3

Tabela 7- Contagem de plaquetas (μ L)

Valores encontrados	Valores de referência
148.000	100.000 – 900.000

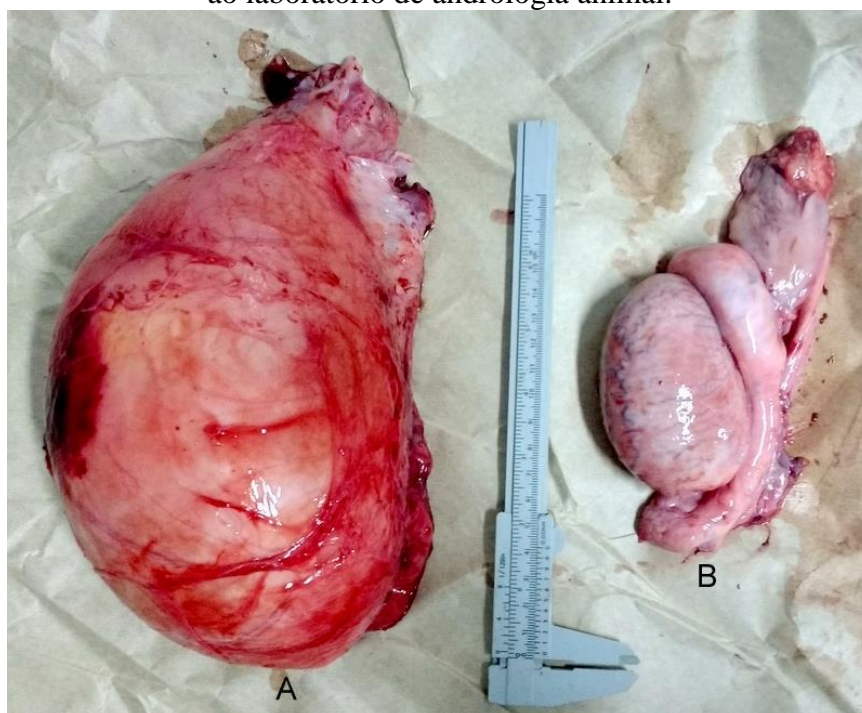
Ao avaliar o hemograma, não foram observadas alterações significativas, permitindo assim, o procedimento anestésico. Para a sedação utilizou-se detomidina intravenosa (IV) (0,02 mg/kg – 0,65ml), em seguida foi aplicado éter gliceril guaiacol (EGG) 10% IV (volume dose efeito) e Cetamina 10% IV (2mg/kg-6,5 ml) para promover a indução anestésica. Os fármacos utilizados para a manutenção anestésica foram EGG 5% IV (volume dose efeito), Xilazina 10% IV (5ml) e Cetamina 10% IV (10ml). Para a anestesia local aplicou-se 10 ml de Lidocaína 2% intratesticular e 10 ml na linha de incisão. Outros fármacos utilizados foram Penicilina

Benzatina IM (40.000 UI) que foi aplicada antes do início da cirurgia e Flunixin Meglumine IV (1,1 mg/kg) ao final do procedimento. Optou-se pela utilização da técnica fechada no testículo direito e aberta modificada no testículo esquerdo. A duração da cirurgia foi de 50 minutos.

5.2.5 Avaliação macroscópica

Logo após realizada a orquiectomia, o material foi encaminhado até o Laboratório de Andrologia Animal (L.A.A) onde o testículo direito ainda se encontrava recoberto pela túnica vaginal, devido a técnica cirúrgica realizada (Figura 30).

Figura 30- Testículo direito e testículo esquerdo ao chegar ao laboratório de andrologia animal.



Legenda: Testículo direito coberto pela túnica vagina (A) e testículo esquerdo (B).
Fonte: Do Autor (2019).

Utilizando-se um bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal da túnica vaginal evidenciando uma grande quantidade de líquido de coloração âmbar entre camada parietal e camada visceral da túnica vaginal, além de aderência e grande quantidade de fibrina (Figuras 31 e 32).

Figura 31- Presença de Líquido e fibrina ao realizar a incisão da túnica vaginal do testículo direito.



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 32- Túnica vaginal com presença de fibrina.



Fonte: Do Autor (2019).

Macroscopicamente o testículo direito apresentava-se menor e com grande quantidade de fibrina ao seu redor (Figuras 33 e 34), ao realizar a incisão ele apresentou coloração mais pálida quando comparado ao testículo esquerdo (Figura 35).

Figura 33- Testículo direito.



Legenda: Testículo direito (A), fibrina que se encontrava ao seu redor (A1).
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 34- Testículo direito e testículo esquerdo



Legenda: Testículo direito apresentando tamanho inferior (A), testículo esquerdo (B).
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 35- Testículo direito e testículo esquerdo



Legenda: Testículo direito apresentando coloração mais pálida (A), testículo esquerdo (B)
 Fonte: Do Autor (2019).

Em seguida ambos foram pesados e com um paquímetro mensurou-se o comprimento, altura e espessura (Tabela 8).

Tabela 8- Peso, comprimento, altura e espessura de ambos os testículos.

	Direito	Esquerdo
Peso (g)	88,06	117,13
Comprimento (cm)	8,3	8,5
Altura (cm)	4,2	5,3
Espessura (cm)	3,4	4,2

Posteriormente foi realizada uma incisão da cauda do epidídimo do testículo esquerdo e feita a coleta de sêmen através de uma pipeta automática. O sêmen coletado foi depositado em um eppendorf contendo solução formol-salina tamponada (1 ml) para posteriormente ser realizada a avaliação da morfologia espermática. Não foi possível realizar o mesmo procedimento com o testículo oposto, devido ao grande comprometimento do tecido.

5.2.6 Histopatologia

Com o bisturi foram realizados cortes no parênquima testicular e coletados fragmentos de aproximadamente 1,0 cm³. As amostras foram depositadas em um frasco contendo formol 10% para realizar a fixação do tecido, que consiste na interrupção do processo autolítico,

promovendo assim sua preservação. Após 24 horas, o material foi transferido para outro frasco contendo álcool 70 para ocorrer a desidratação, pois a água não é miscível em parafina, tornando-se prejudicial sua penetração no tecido. Em seguida o material foi enviado ao setor de patologia do Departamento de Veterinária da UFV.

No Laboratório de histopatologia do setor ocorreu a inclusão em parafina, os cortes foram realizados com o micrótomo e depositados em banho maria. Em seguida, foram coletados através de lâminas na qual foram coradas com Hematoxilina e eosina (H.E).

A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 40, 100, 400 e 1.000 vezes.

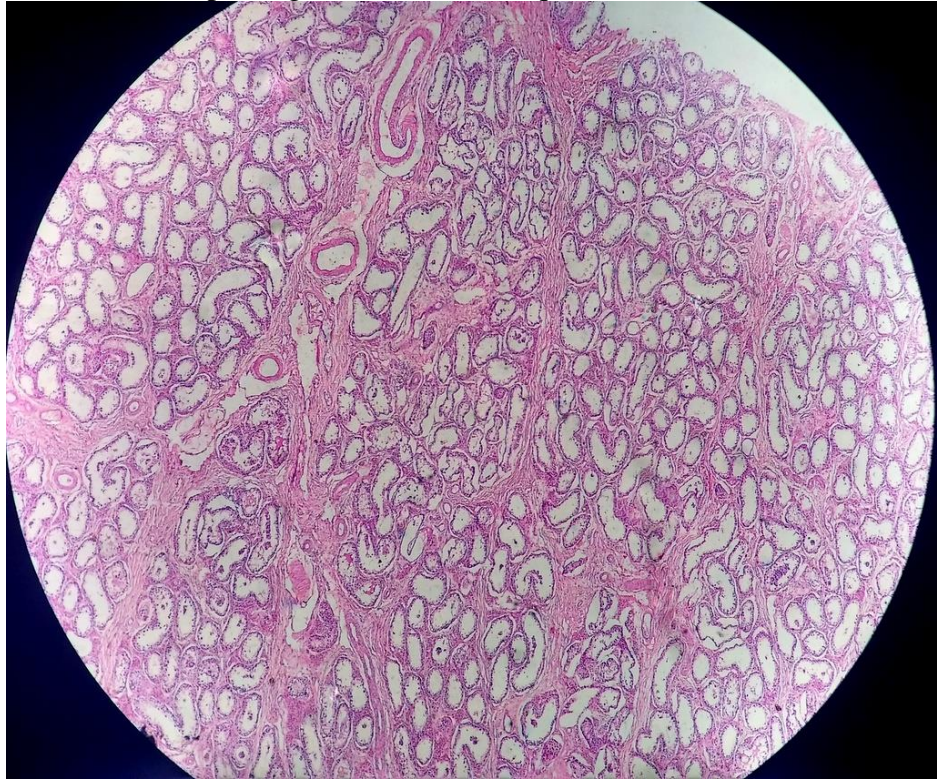
5.2.7 Morfologia espermática

A técnica utilizada para avaliar a morfologia espermática do sêmen proveniente da cauda do epidídimo foi a preparação úmida. Inicialmente com uma pipeta, foi realizada uma leve mistura do material presente no eppendorf para que a amostra coletada não ficasse muito concentrada. Feito isso, colocou-se uma gota da solução sobre a lâmina que em seguida foi coberta por uma lamínula. Com o auxílio de um papel toalha, essa área foi pressionada para eliminar o excesso de líquido. Em seguida aplicou-se óleo de imersão sobre a lâmina, que foi levada até um microscópio de contraste de fase (x1000). Para a análise, foram contadas 200 células espermáticas, e enumerou-se as patologias encontradas. De acordo com a classificação de Blom (1973) os defeitos foram divididos entre maiores e menores.

5.3 Resultados e discussão

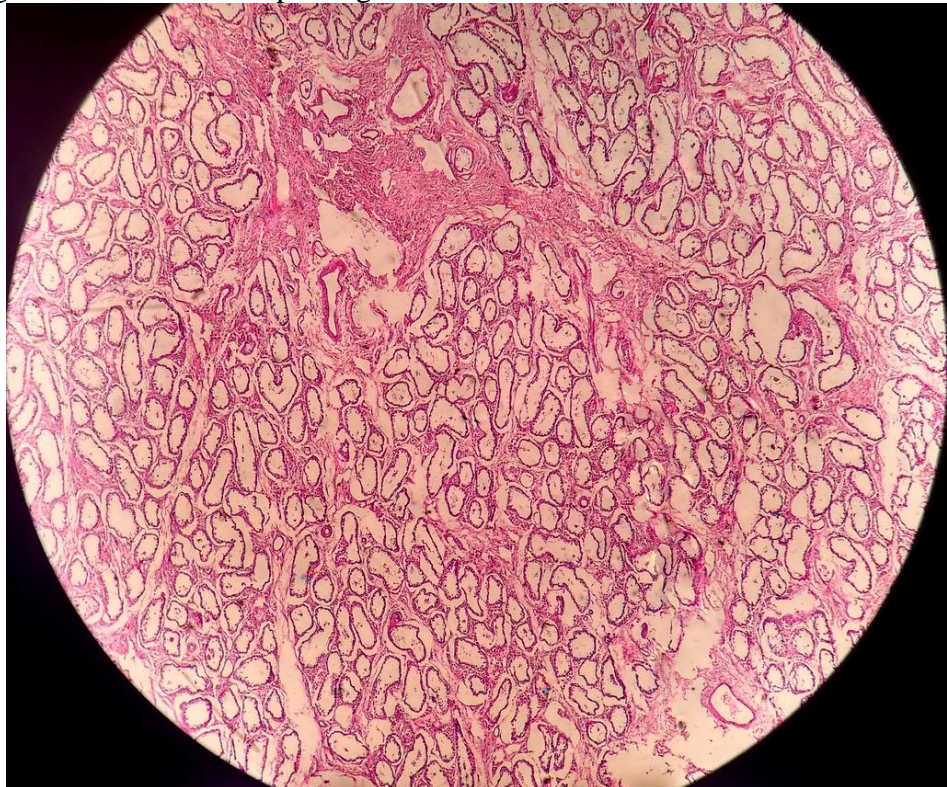
Ao avaliar as lâminas histopatológicas, observou-se que em ambos testículos houve redução das células da linhagem germinativa, diminuindo assim a altura do epitélio seminífero. Além disso em alguns túbulos foi observada a descamação do epitélio. No testículo esquerdo, em alguns túbulos foi possível observar espermátides alongadas, porém em baixa quantidade. Já no testículo direito as alterações eram mais intensificadas, na qual houve perda de várias camadas de células do epitélio germinativo, havendo apenas células de Sertoli, espermátogônias e espermátócitos no túbulo seminífero. Não encontrou-se espermatozoides nos túbulos seminíferos de ambos os testículos (Figura 36 a 43).

Figura 36- Lâmina histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 40 vezes.



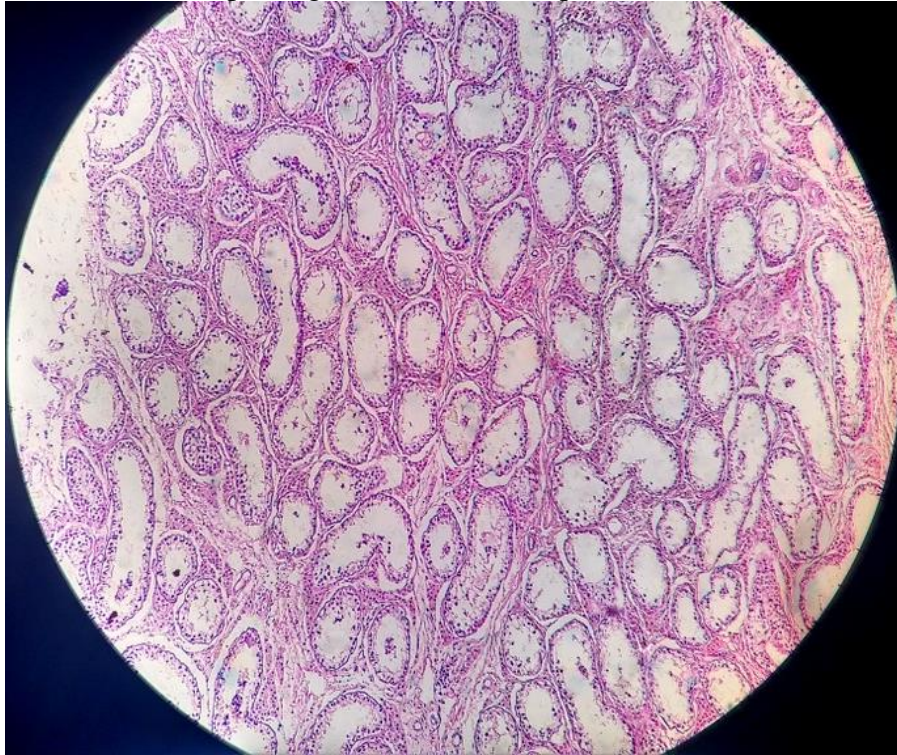
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 37- Lâmina histopatológica do testículo direito em aumento de 40 vezes.



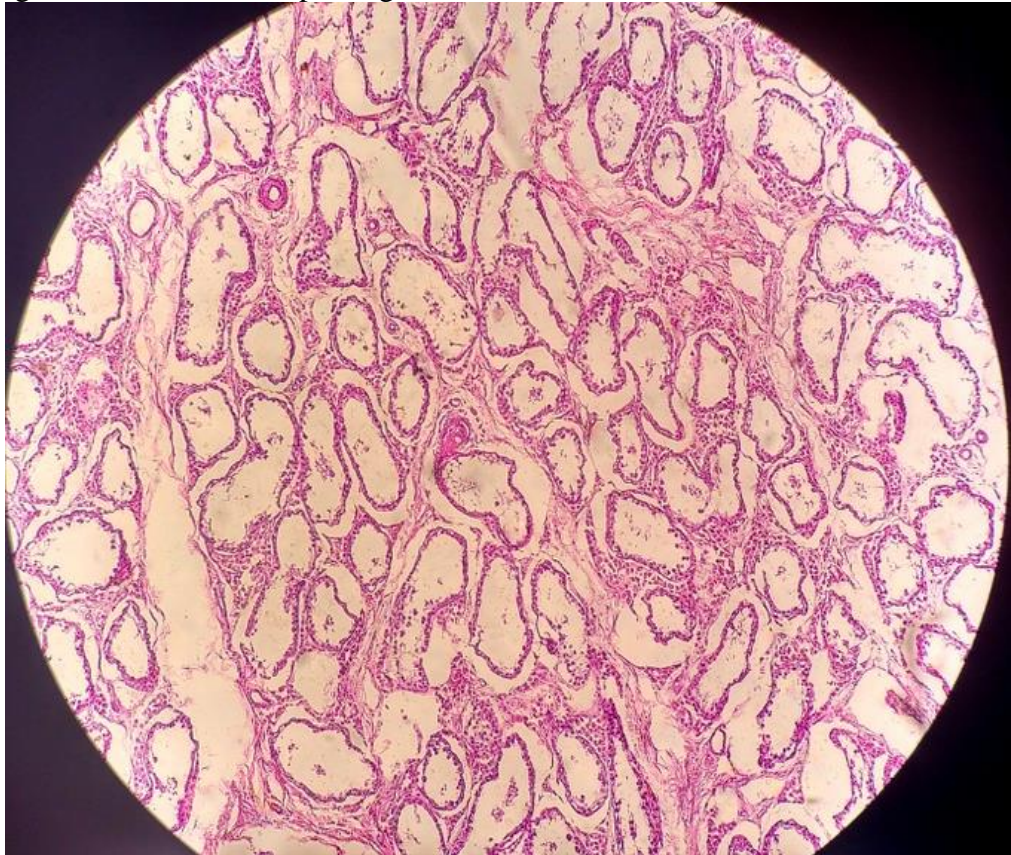
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 38- Lâmina histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 100 vezes.



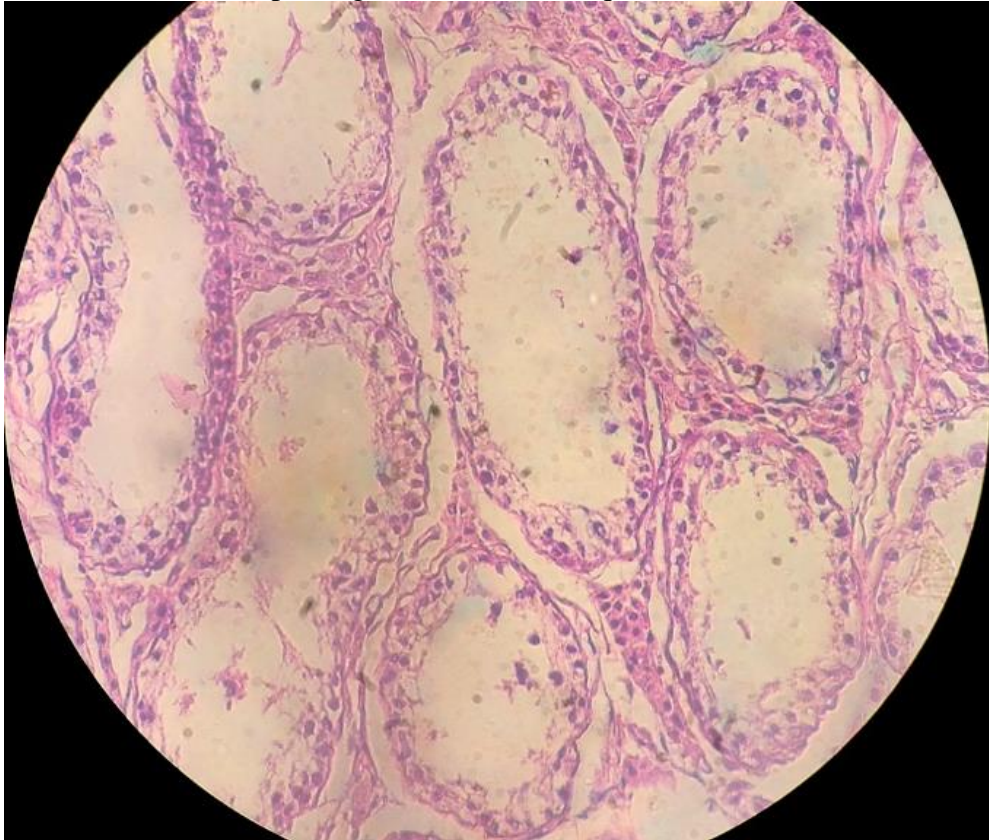
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 39- Lâmina histopatológica do testículo direito em aumento de 100 vezes.



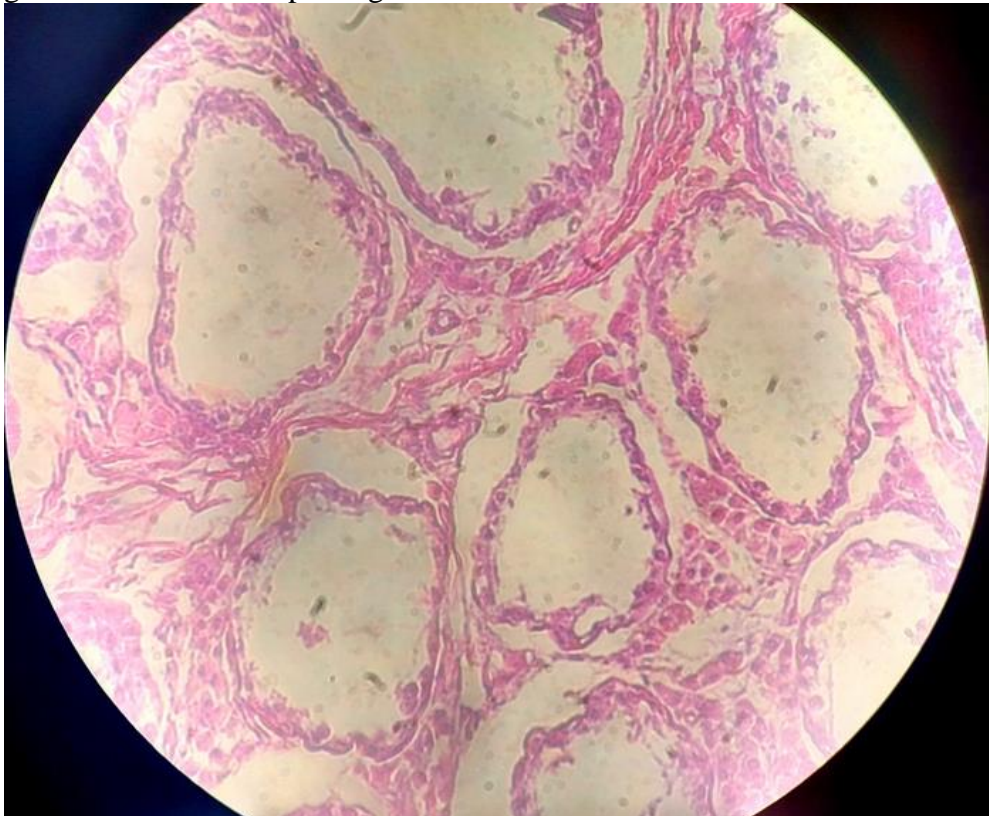
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 40- Lâmina histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 400 vezes.



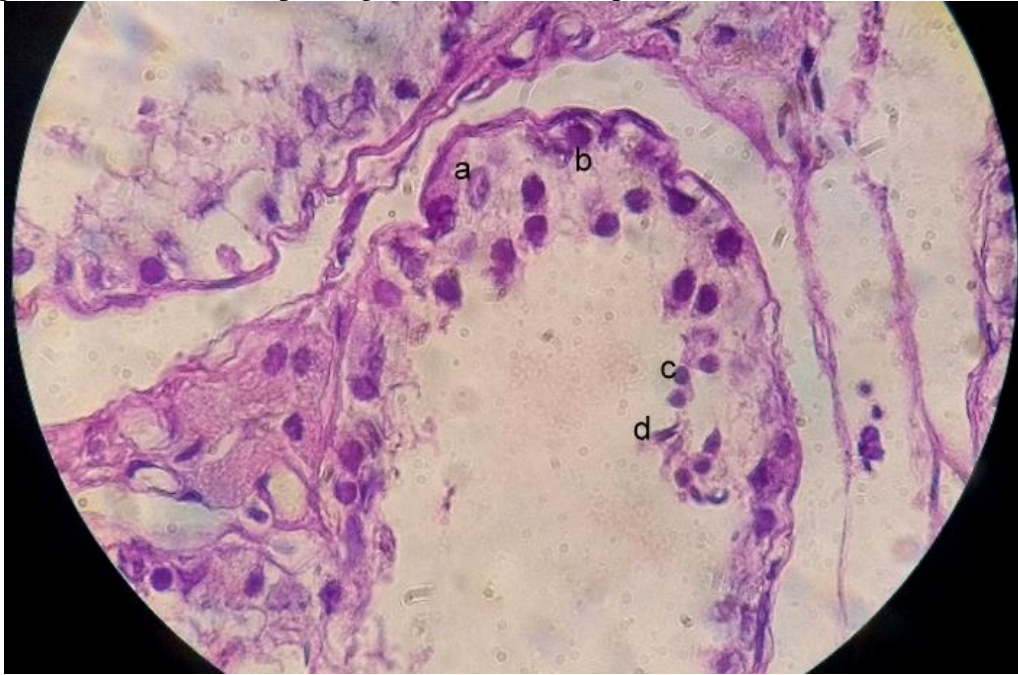
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 41- Lâmina histopatológica do testículo direito em aumento de 400 vezes.



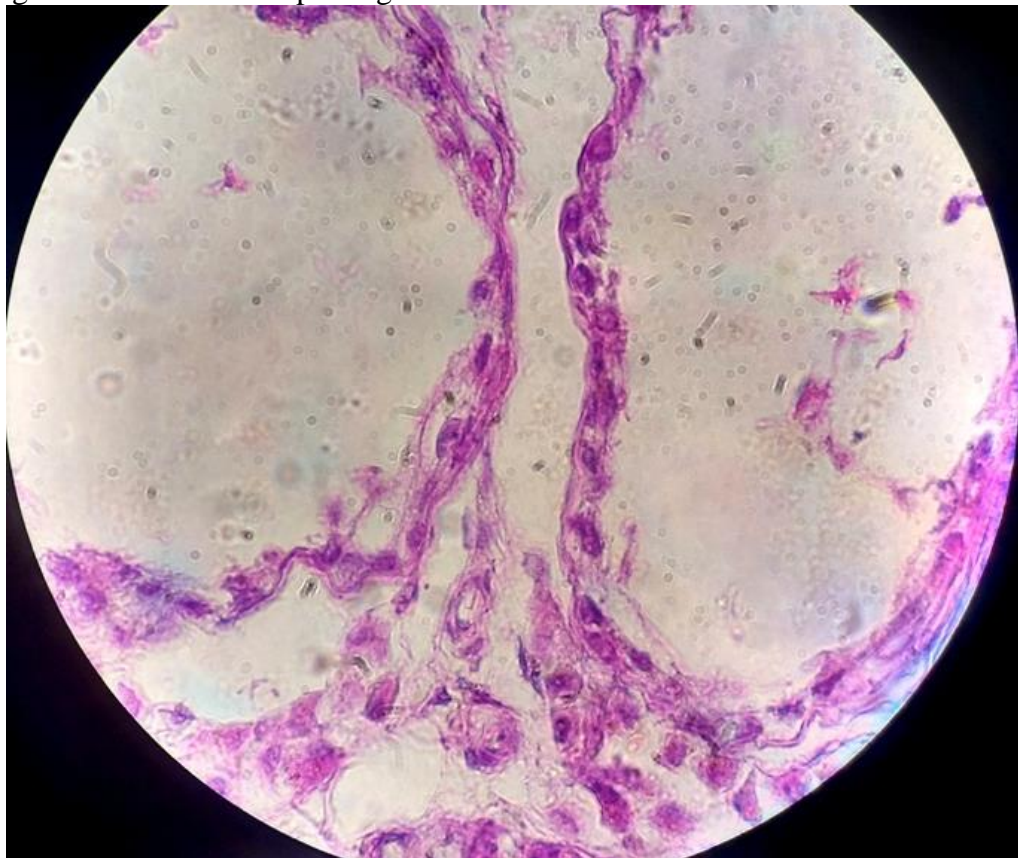
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 42- Lâmina histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 1.000vezes.



Legenda: Célula de sertoli (a), espermatogônia(b), espermatíde (c), espermatíde alongada(d)
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 43- Lâmina histopatológica do testículo direito em aumento de 1.000vezes.



Fonte: Do Autor (2019).

O resultado da avaliação da morfologia espermática encontra-se na tabela 9.

Tabela 9- Alterações espermáticas observadas neste trabalho.

Alterações espermáticas	Quantidade
Gota citoplasmática proximal	30
Cauda enrolada	9
Inserção abaxial	7
Defeitos de acrossoma	5
Cabeça isolada normal	4
Alterações de peça intermediária	3
Forma teratológica	1
Gota citoplasmática distal	1

Na figura 44 observa-se algumas alterações espermáticas encontradas neste trabalho.

Figura 44- Alterações espermáticas.



Legenda: Gota citoplasmática proximal (a), inserção abaxial entre cabeça e peça intermediária(b), edema e aplasia segmentar de peça intermediária (c) cauda dupla (forma teratológica) (d).

Fonte: Do Autor (2019).

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), o percentual de espermatozoides anormais em equinos não deve ultrapassar 30% e deve apresentar no máximo 20% de defeitos maiores. Ao realizar o cálculo da porcentagem, o resultado foi de 70% de

espermatozoides normais e 19,5 % de defeitos maiores estando dentro do padrão recomendado pelo colégio brasileiro de reprodução animal. Diferentemente do aumento de anormalidades consequente da degeneração testicular citadas por Van Camp (1997) sobretudo de cabeça e peça intermediária.

De acordo com Varner *et al* (2007), o trânsito epididimário em garanhões tem duração de 8 a 11 dias. Já França *et al* (2005) citou um período de 5 a 14 dias, o que pode explicar a ausência de maiores alterações na avaliação da morfologia espermática realizada neste caso. Além disso, a duração da espermatogênese é de 57 dias sendo necessário um período maior para observar o dano da degeneração na produção de espermatozoides, assim como mencionado por Yuan e Mc Entee (1987).

A alteração na morfologia espermática mais observada neste trabalho foi a grande quantidade de gota citoplasmática proximal, que de acordo com McEntee (2012) é um achado frequente em animais com degeneração testicular. Isso ocorre devido as alterações provocadas na espermatogênese. Assim como relatado por Pezzini *et al.*, (2006) e Hammes (1996).

A gota citoplasmática é formada no final da espermiogênese, na qual um resquício do citoplasma das espermátides é mantido durante a sua diferenciação em espermatozoides. (COOPER, 2005; HERMO *et al.*, 1994). Durante o trânsito epididimário ocorre a migração da gota citoplasmática devido aos movimentos peristálticos do epidídimo (COOPER, 2011). Portanto, na cabeça do epidídimo está presente um grande número de espermatozoides com gota citoplasmática proximal, e na cauda uma maior quantidade de gota citoplasmática distal (COOPER, 2011).

Dessa maneira, a presença da gota citoplasmática proximal pode ser causada também devido a falhas na função epididimária, como relatou Cooper (2005). Blanchard (1996) induziu o aumento de temperatura escrotal em garanhões, realizando em seguida a análise da morfologia espermática. Durante os primeiros 7 a 25 dias foi observado aumento da quantidade de gotas proximais enquanto o aumento de anormalidades acrossomais só foi observado 24 a 50 dias após insulação, mostrando que os problemas observados relacionados ao epidídimo são os primeiros a se apresentarem. No experimento realizado por Pezzini *et al* (2006) em touros, a presença de gota citoplasmática proximal foi observada apenas após 23 dias de insulação, na qual os autores consideraram que foi causada pela alteração na espermatogênese, devido ao tempo necessário para a alteração ser encontrada.

Dessa maneira, conclui-se que para avaliar a etiologia da alta taxa de gota citoplasmática proximal, é necessário levar em conta o tempo necessário para ocorrer o trânsito epididimário na espécie acometida. No presente trabalho, a grande quantidade de gota citoplasmática

proximal observada durante a avaliação morfológica associada a baixa quantidade de outros defeitos espermáticos, demonstra que a presença da gota citoplasmática pode ser explicada devido ao dano causado ao epidídimo afetando assim a maturação espermática.

6. CONCLUSÃO

O estágio supervisionado obrigatório, que é realizado no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, é de fundamental importância para a formação profissional dos alunos. Realizar o estágio em outra instituição possibilita a aquisição de novos conhecimentos, além da oportunidade de conhecer vários profissionais que atuam na área. Durante esse período o estudante aprende a lidar com diversas situações, podendo ter uma percepção de como é a rotina prática de um Médico Veterinário. O estágio supervisionado realizado na Universidade Federal de Viçosa, proporcionou uma complementação dos conhecimentos adquiridos durante a graduação na Universidade Federal de Lavras.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J. J. et al. Effect of homologous preovulatory follicular fluid on in vitro maturation of equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 56, n. 5, p. 745-758, 2001.

ANDERSON, Everett; ALBERTINI, David F. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **The Journal of cell biology**, v. 71, n. 2, p. 680-686, 1976.

ANGUITA, Begoña et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 526-536, 2007.

BAGG, M. A. et al. Changes in ovarian, follicular, and oocyte morphology immediately after the onset of puberty are not accompanied by an increase in oocyte developmental competence in the pig. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1003-1011, 2004.

BALHARA, Ashok K. et al. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 537-555, 2006.

BASSO, Andréa Cristina; ESPER, Cesar Roberto. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 311-319, 2002.

BERZ, Reinhold et al. The medical use of infrared-thermography history and recent applications. 2007.

BLANCHARD, T. L. et al. Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, n. 5, p. 195-201, 1996.

BLANCHARD, T. L. et al. Low daily sperm output per ml of testis as a diagnostic criteria for testicular degeneration in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 21, n. 1, p. 11-35, 2001.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 144-150, 2014.

COOPER, T. G. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing?. **Human reproduction**, v. 20, n. 1, p. 9-11, 2005.

COOPER, Trevor G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 1, p. 130, 2011.

CUNHA, Michel Santos et al. Degeneração Testicular em machos: dos animais ao homem. **INVESTIGAÇÃO**, v. 14, n. 6, 2015.

EDDY, A. L.; VAN HOOGMOED, L. M.; SNYDER, J. R. The role of thermography in the management of equine lameness. **The veterinary journal**, v. 162, n. 3, p. 172-181, 2001.

FISSORE, Rafael A. et al. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 124, n. 6, p. 745-754, 2002.

FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FRANÇA, Luiz R.; AVELAR, Gleide F.; ALMEIDA, Fernanda FL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300-318, 2005.

FREIRE, Marcelo O.; VAN DYKE, Thomas E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v. 63, n. 1, p. 149-164, 2013.

FRENCH, Hilari M. et al. Bovine Reproductive Palpation Training: Does the Cow Make a Difference?. **Journal of veterinary medical education**, v. 45, n. 2, p. 219-223, 2018.

FRICKE, P. M. Scanning the future—Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 8, p. 1918-1926, 2002.

GADE, Rikke; MOESLUND, Thomas B. Thermal cameras and applications: a survey. **Machine vision and applications**, v. 25, n. 1, p. 245-262, 2014.

GARCIA, Alexandre Rossetto. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema?. **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

GILCHRIST, Robert B.; LANE, Michelle; THOMPSON, Jeremy G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human reproduction update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112-125, 2014.

GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112-125, 2014.

GOSDEN, R. G.; TELFER, EVELYN. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **Journal of Zoology**, v. 211, n. 1, p. 169-175, 1987.

GYGAX, A. P.; DONAWICK, W. J.; GLEDHILL, B. L. Haematocoele in a stallion and recovery of fertility following unilateral castration. **Equine veterinary journal**, v. 5, n. 3, p. 128-130, 1973.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p

HAMMES, Anelise Maria; PIMENTEL, Cláudio Alves; FERNANDES, Carlos Eurico. FERTILIDADE EM GARANHÕES AVALIADA ATRAVÉS. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, 1996.

HARDY, Kate et al. In vitro maturation of oocytes. **British medical bulletin**, v. 56, n. 3, p. 588-602, 2000.

HERMO, Lousi; OKA, Richard; MORALES, Carlos R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. In: **International review of cytology**. Academic Press, 1994. p. 105-189.

HIRAO, Y. et al. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **Reproduction**, v. 100, n. 2, p. 333-339, 1994.

HULSHOF, S. C. J. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994

KÄHN, W. Veterinary reproductive ultrasonography. London: Mosby-Wolfe, 1994. p. 187-210.

KAWAMURA, Kazuhiro et al. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 19, p. 7323-7328, 2004.

MARCHAL, R. et al. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 17-29, 2001.

MATTIOLI, M. et al. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, v. 31, n. 6, p. 1201-1207, 1989.

MATTIOLI, M. et al. Effects of LH and FSH on the maturation of pig oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 95-105, 1991.

MCENTEE, Mark. **Reproductive pathology of domestic mammals**. Elsevier, 2012.

MUKHERJEE, Anil B. Normal progeny from fertilization in vitro of mouse oocytes matured in culture and spermatozoa capacitated in vitro. **Nature**, v. 237, n. 5355, p. 397, 1972.

NAGASHIMA, Hiroshi et al. Developmental competence of in vivo and in vitro matured porcine oocytes after subzonal sperm injection. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 45, n. 3, p. 359-363, 1996.

O'BRIEN, J. K. et al. Comparison of in vitro maturation, in vitro fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 3-4, p. 101-107, 2000.

PEZZINI, Tomaz Gelson et al. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 5, p. 863-868, 2006.

PIMENTEL, C. A. Avaliação da fertilidade masculina em bovinos. In: SIMPÓSIO DE REPRODUÇÃO EM BOVINOS, 1., 2008, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. p. 66.

POZOR, Malgorzata. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproductive tract. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 505-509, 2005.

RAMÍREZ, Alejandro Villanueva. Fisiopatología y tratamiento del hidrocele. **Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica**, v. 70, n. 608, p. 701-703, 2013.

RICHARDS, JOANNE S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent progress in hormone research**, v. 57, p. 195-220, 2002.

ROBERTO, J. V. B.; SOUZA, BB de. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 2, n. 3, p. 73-84, 2014.

SERRET, Carolina Gonçalves et al. Produção "in vitro" de embriões suínos. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 13, n. 3, p. 285-289, 2007.

SHELDON, Martin; NOAKES, David. Pregnancy diagnosis in cattle. **In Practice**, v. 24, n. 6, p. 310-317, 2002.

SHIMADA, M.; KAWANO, N.; TERADA, T. Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of in vitro maturation media. **Reproduction**, v. 124, n. 4, p. 557-564, 2002.

SOMFAI, Tamás et al. Development to the blastocyst stage of immature pig oocytes arrested before the metaphase-II stage and fertilized in vitro. **Animal reproduction science**, v. 90, n. 3-4, p. 307-328, 2005.

STROUD, Brad K. Bovine fetal sexing using ultrasound. **Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle**, p. 1-10, 2005.

VAN CAMP, Steven D. Common causes of infertility in the bull. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 203-231, 1997.

VANROOSE, Geert; DE KRUIF, Aart; VAN SOOM, Ann. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 131-143, 2000.

VARNER, Dickson D. et al. From a Sperm's Eye View: Revisiting our perception of this intriguing cell. In: **AAEP proceedings**. 2007. p. 104-177.

VIGNOLA, A. G. H. et al. Técnicas de coloração cromossômica para estágios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 3, p. 583-589, 1994.

WALLACE, ANTONY F. Aetiology of the idiopathic hydrocele. **British journal of urology**, v. 32, n. 1, p. 79-96, 1960.

WATSON, Elaine. Fertility problems in stallions. **In Practice**, v. 19, n. 5, p. 260-269, 1997.

YUAN, Yang-Dar; MCENTEE, Kenneth. Testicular degeneration, rat. In: **Genital System**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1987. p. 212-218.