



MARIANA ANDRADE

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

**LAVRAS - MG
2019**

MARIANA ANDRADE

**RELATÓRIO DE 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
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

MARIANA ANDRADE

**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
obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 04 de Dezembro de 2019.

Dr. José Camisão de Souza - UFLA

Dr. Ana Paula Peconick - UFLA

Me. Nathália Alves - UFLA

**LAVRAS - MG
2019**

Dedico este trabalho à minha família e aos amigos pelo companheirismo, e aos mestres que prestaram sua contribuição no desenvolvimento deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que, de diversas formas, me enviou fé, força, determinação para concluir meu sonho e por sempre me conceder sabedoria nas minhas escolhas, coragem para acreditar e proteção para me amparar.

Aos meus pais, Cecília e Geraldo, por todo amor, pelo exemplo de dignidade, caráter e por terem me dado a oportunidade de realizar meu sonho, e por todo o apoio nessa caminhada. Eu amo vocês!

À minha irmã, Maysa, por toda dedicação e preocupação comigo, por ser uma irmã tão presente em meus projetos, escolhas, decisões. Obrigada por muitas vezes ter transformado minha tristeza em risadas e confiança.

Ao meu namorado, Túlio, por ser paciente em todos os meus momentos de desânimo e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu orientador, José Camisão, pela orientação e disposição em compartilhar suas experiências profissionais e por ter me dado a oportunidade de adquirir novos conhecimentos através dos seus ensinamentos. O meu sincero obrigada!

Ao meu grupo de estudo do coração, GERE, onde conheci pessoas que aprendemos juntos, presentes em muitas escalas, experimentos, onde podíamos sempre compartilhar informações, gerando conhecimento e experiência. Vocês foram de fundamental importância para meu crescimento pessoal e profissional.

Meus sinceros agradecimentos à equipe do Prof. José Domingos, onde tive o prazer de conhecer duas pessoas que possuem o dom de ensinar: a Doutoranda Lidiany e o estudante de Pós-Doutorado Faider, que nesses três meses de estágio foram essenciais no meu crescimento profissional, sempre dispostos a ensinar.

Agradeço assim, a todas as outras pessoas que participaram dessa caminhada, contribuindo sempre para o meu crescimento. Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A disciplina PRG107 é ofertada no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras e é qualificada pelo estágio supervisionado. Seu objetivo principal é tornar possível a aplicação prática e aprimoramento do conhecimento adquirido em toda a graduação. O estágio supervisionado foi realizado no setor de Reprodução do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa sob supervisão do Professor Doutor José Domingos Guimarães e orientação do Professor Doutor José Camisão de Souza. O período de estágio foi exercido do dia dois de setembro a trinta de novembro de 2019, totalizando 520 horas. Nesse relatório foram descritas atividades desenvolvidas durante esse período, inclusive a técnica de maturação in vitro de oócitos suínos e o relato de um caso de orquite traumática associada à hidrocele em garanhão da raça mangalarga marchador. O estágio é de grande importância para formação profissional dos futuros médicos veterinários.

Palavras-chave: Exame andrológico. Exame ginecológico. Hidrocele. Maturação oócitaria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Laboratório de Andrologia Animal do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.....	15
Figura 2- Sala de cultivo do laboratório de maturação de ovócitos e fecundação <i>in vitro</i> do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.....	15
Figura 3- Amostra de sêmen bovino aspecto leitoso coletado na Fazenda Brasília.....	17
Figura 4- Lâmina com sêmen bovino após técnica de preparação úmida visualizada em microscópio de fase (x1000)	18
Figura 5- Lâmina contendo sêmen bovino após a técnica de esfregaço corado em microscopia óptica (x1000)	19
Figura 6 – Sequência de fotos da castração em Suínos no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.....	20
Figura 7 – Ultrassonografia de prenhez bovina após 32 dias de Inseminação Artificial, com a visualização do embrião.....	23
Figura 8 – Retirada do dispositivo intravaginal de Progesterona.....	24
Figura 9 – Animais revelando sinais de estro no dia da inseminação artificial em Florestal – MG.....	25
Figura 10 – Inseminação Artificial.....	25
Figura 11 – Protocolo de IATF utilizando cipionato de estradiol.....	26
Figura 12 –Protocolo de IATF utilizando benzoato de estradiol.....	26
Figura 13 – Animal recém-nascido macho com aproximadamente 40kg.....	27
Figura 14 – Planta do frigorífico Saudali, Ponte Nova- MG.....	33
Figura 15 – Ovário suíno e folículos ovarianos anteriormente à aspiração folicular.....	33
Figura 16 – Ovário suíno após aspiração folicular.....	34
Figura 17 – Líquido folicular proveniente da aspiração folicular.....	34
Figura 18 – Cálice cônico contendo líquido folicular em banho maria.....	35
Figura 19 – Complexos de <i>cumulus oócitos</i> selecionados para maturação <i>in vitro</i> , apresentando células do <i>cumulus oophorus</i> intimamente ligadas entre si e ao oócito.....	36
Figura 20 - Cuba de vidro contendo solução de metanol e ácido acético (3:1)	37
Figura 21 – Oócito de suíno na metáfase II.....	39
Figura 22 – Configuração cromossômica de oócitos suínos em metáfase I e II.....	40
Figura 23 – Expansão de células do <i>cumulus oophorus</i> de oócitos suínos.....	40
Figura 24 – Oócitos suínos observados em microscópio invertido.....	41

Figura 25 – Garanhão apresentando aumento de volume na região escrotal.....	44
Figura 26 –Termografia testicular de garanhão após trauma sofrido na região escrotal.....	45
Figura 27 – Imagem ultrassonográfica do testículo esquerdo do garanhão após trauma sofrido na região escrotal.....	46
Figura 28 – Imagem ultrassonográfica do testículo direito do garanhão após trauma sofrido na região escrotal.....	47
Figura 29 – Testículo direito e esquerdo ao chegar ao Laboratório de Andrologia Animal.....	49
Figura 30 – Presença de líquido e fibrina ao realizar a incisão da túnica vaginal do testículo direito.....	49
Figura 31 – Túnica vaginal com presença de fibrina.....	50
Figura 32 – Testículo direito.....	50
Figura 33 - Testículo direito e testículo esquerdo.....	51
Figura 34 – Testículo direito e testículo esquerdo.....	51
Figura 35 – Lâmina histopatológica do testículo esquerdo com aumento de 40x.....	53
Figura 36 – Lâmina histopatológica do testículo direito com aumento de 40x.....	54
Figura 37 – Lâmina histopatológica do testículo esquerdo com aumento de 100x.....	54
Figura 38 – Lâmina histopatológico do testículo direito com aumento de 100x.....	55
Figura 39 – Lâmina histopatológica do testículo esquerdo com aumento de 400x.....	55
Figura 40 – Lâmina histopatológica do testículo direito com aumento de 400x.....	56
Figura 41 – Lâmina histopatológica do testículo esquerdo com aumento de 1000x.....	56
Figura 42 -Lâmina histopatológica do testículo direito com aumento de 1000x.....	57
Figura 43 – Alterações espermáticas.....	58
Gráfico 1 – Quantidade de oócitos expresso em porcentagem em metáfase I, metáfase II e com ausência de configuração cromossômica.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio.....	16
Tabela 2 – Relação entre aspectos seminal e concentração espermática em bovinos.....	17
Tabela 3 – Exames ginecológicos realizados por espécie durante o estágio.....	21
Tabela 4 – Diagnósticos de gestação, sexagem e confirmação na espécie bovina.....	22
Tabela 5 – Eritrograma.....	47
Tabela 6 – Leucograma.....	48
Tabela 7 – Contagem de plaquetas (microlitros).....	48
Tabela 8 – Peso, comprimento, altura e espessura de ambos os testículos do Garanhão.....	52
Tabela 9 – Alterações espermáticas observadas no relato de caso do Garanhão.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMP'c	Monofosfato cíclico de adenosina
CCOs	Complexo de <i>cumulus oophorus</i>
COC's	<i>Cumulus oócitos</i>
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
DG	Diagnóstico de gestação
ECC	Escore de condição corporal
ESAV	Escola Superior de Agricultura e Veterinária
EPV	Espaço perivitelino
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Gauge
HE	Hematoxilina e eosina
IATF	Inseminação Artificial em tempo fixo
Km	Quilômetros
KCl	Cloreto de potássio
LAA	Laboratório de Andrologia Animal
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MPF	Fator promotor da maturação
MOFIV	Maturação de ovócitos <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
µm	Micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio

NaHPO₄	Fosfato monossódico
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
OPU	<i>Ovum pick-up</i> (aspiração folicular)
OMI	Inibidor da meiose de oócito
PBS	Tampão fosfato salino
PVA	Álcool polivinílico
RNA	Ácido Ribonucléico
UFV	Universidade Federal de Viçosa
ZP	Zona pelúcida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	LOCAL DE ESTÁGIO	14
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	16
3.1	Exames Andrológicos	16
3.2	Avaliação da morfologia espermática	18
3.3	Castrações	19
3.4	Exames ginecológicos, diagnóstico de gestação e sexagem fetal	20
3.5	Protocolos de IATF (Inseminação Artificial em tempo fixo)	23
3.6	Acompanhamento de aulas	26
3.7	Distocias	27
3.8	Aspiração folicular	28
4	RELATO DE CASO – ESTUDO PILOTO DA MATURAÇÃO IN VITRO (MIV) DE OÓCITOS SUÍNOS	29
4.1	Revisão de literatura	29
4.1.1	Ovogênese	29
4.1.2	Foliculogênese	30
4.1.3	Maturação in vitro	30
4.1.4	Avaliação da maturação in vitro	31
4.2	Relato de caso	32
4.2.1	Local	32
4.2.2	Coleta de ovários	32
4.2.3	Aspiração Folicular e seleção dos complexos cumulus oócito (CCOs)	33
4.2.4	Maturação in vitro (MIV)	36
4.2.5	Avaliação da maturação oocitaria	37
4.3	Resultados e discussão	37
5	RELATO DE CASO – ORQUITE TRAUMÁTICA ASSOCIADA A HIDROCELE EM GARNHÃO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR	42
5.1	Revisão de literatura	42
5.1.1	Espermatogênese	42
5.1.2	Orquite, hidrocele e degeneração testicular	42
5.2	Relato de caso	44
5.2.1	Anamnese	44
5.2.2	Exame físico	44

5.2.4 Tratamento.....	47
5.2.5 Avaliação macroscópica	48
5.2.6 Histopatologia	52
5.2.7 Morfologia espermática	52
5.3 Resultados e discussão.....	53
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A disciplina PRG107 é realizada no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras e é denominada como estágio supervisionado. São 408 horas que devem ser cumpridas no local de estágio escolhido pelo estudante. Ao final dessas atividades, é necessário realizar um relatório de estágio como trabalho de conclusão de curso (TCC), necessário para a obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

O estágio supervisionado em questão foi realizado na Universidade Federal de Viçosa, no setor de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária. Foram realizadas nesse período atividades práticas a campo, que consistiram no acompanhamento reprodutivo dos animais da Universidade e da Região. Dentre essas atividades, está a realização de exames andrológicos, exames ginecológicos, diagnósticos de gestação e inseminação artificial convencional e em tempo fixo.

Outras atividades também foram realizadas em laboratório, como análise de morfologia espermática, aspiração folicular provenientes de abatedouro e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos. O estágio teve o período de duração do dia dois de setembro ao dia trinta de novembro de 2019, contabilizando 520 horas.

O estágio supervisionado tem como objetivo aprimorar os conhecimentos adquiridos por toda a graduação, fazendo com que o estudante torne-se mais preparado para enfrentar o mercado de trabalho ou iniciar a carreira acadêmica.

Esse trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Professor Doutor José Camisão de Souza e tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado e a apresentação de dois relatos de caso.

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 de possuir campus nas cidade de Rio Paranaíba e Florestal. Sua fundação ocorreu no ano de 1926 como Escola Superior de Agricultura e Veterinária (ESAV) e teve sua federalização no ano de 1976, que dois anos após iniciou-se a construção do Departamento de Veterinária.

O Setor de Reprodução Animal possui dois laboratórios, o laboratório de Andrologia Animal (L.A.A), conforme apresentado na Figura 1, que conta com dois microscópios, onde a principal atividade é a análise da morfologia espermática de materiais coletados a campo e nas aulas práticas e o outro laboratório é de maturação de ovócitos *in vitro* (MOFIV) que possui uma sala que contém equipamentos como pHmetro, balança de precisão, banho Maria e geladeira, outra sala que contem 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 de oócitos de acordo com sua qualidade e uma estufa de CO₂ para maturação *in vitro* (FIGURA 2).

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

As linhas de pesquisas atuais são: Elaboração de diluentes para congelamento de sêmen de asininos; Relação entre cortisol, balanço energético negativo e o vírus BoHV-1 em novilhas leiteiras no período de transição e produção *IN VITRO* de embriões suínos.

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 do estágio tiveram início no dia dois de setembro de 2019 e término no dia trinta de novembro de 2019, totalizando 520 horas. Esse período caracterizou-se pelo acompanhamento dos Médicos Veterinários tanto em atividade a campo quanto em laboratório. Na Tabela 1 são apresentadas as atividades desenvolvidas.

Tabela 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio

Atividades desenvolvidas	Quantidade de animais ou atividades realizadas
Análise de morfologia espermática	200
Exames andrológicos	150
Castrações	6
Exames ginecológicos	250
Diagnósticos de gestação e sexagem fetal	120
Protocolo de IATF	100
Acompanhamento de Aulas	25
Distocias	5
Aspiração Folicular	25

Fonte: Do Autor (2019).

3.1 Exames Andrológicos

Os exames andrológicos foram realizados na Fazenda Brasília Agropecuária localizada na cidade de São Pedro dos Ferros, Minas Gerais. Inicialmente, realizou a inspeção dos animais observando cascos e aprumos. Os animais eram colocados em troncos de contenção onde era realizado a inspeção dos órgãos externos do sistema genital para verificar se havia alterações e por meio da palpação foi avaliada consistência e mobilidade testicular. Feito isso, avaliou-se a medida do perímetro escrotal em seu maior diâmetro, utilizando-se uma fita métrica e com o paquímetro foi observada altura (sentido dorso-ventral) excluindo-se a cauda do epidídimo e largura (sentido latero-lateral). O comportamento sexual não foi avaliado, pois não havia fêmea em cio. À palpação transretal foi realizada para avaliação das vesículas seminais de acordo com tamanho, simetria, consistência e lobulação. A coleta de sêmen foi realizada usando eletroejaculador, 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 3) ou cremoso, sendo diretamente relacionado a concentração espermática (TABELA 2). 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 avaliação de motilidade (%) e vigor (0-5) depositou-se uma gota de sêmen sobre a lâmina pré-aquecida, que foi coberta com lamínula e observada em microscópio óptico com objetiva de 40x. Em um ependorf contendo solução formol-salina tamponada (1mL) depositou-se gotas de sêmen até atingir aspecto turvo, para realizar a análise da morfologia espermática em laboratório.

Figura 3 – Amostra de sêmen bovino aspecto leitoso coletado na fazenda Brasília



Fonte: Do autor (2019)

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).

3.2 Avaliação da morfologia espermática

Para avaliar a morfologia espermática podem ser realizadas duas técnicas: esfregaço ou de preparação úmida. Após a realização de uma coleta seminal, a campo, são depositadas gotas de sêmen em um ependorf com solução formol-salina tamponada (1 mL) até que a mesma atinja um aspecto turvo. Para a técnica de preparação úmida, primeiramente, com uma pipeta é feita uma leve mistura do material para que a amostra não fique muito concentrada. Feito isso, é colocada uma gota de solução sobre a lâmina que é coberta por uma lamínula. Com auxílio de um papel toalha, essa área é pressionada para que seja retirado o excesso de líquido. Deve-se evitar o deslizamento da lamínula sobre a lâmina, pois pode resultar em danos as células espermáticas, como a decapitação. Para que a preparação conserve por mais tempo, pode-se fixar a lamínula com esmalte para unhas. Em seguida, aplica-se óleo de imersão sobre a lâmina que é levada ao microscópio de contraste de fase (x1000) (FIGURA 4).

Figura 4 – Lâmina com sêmen bovino após técnica de preparação úmida, visualizada em microscópio de contraste de fase (x1000)



Fonte: Do Autor (2019).

Já na técnica de esfregaço corado, depois de aplicar uma gota de solução sobre a lâmina, é realizado um esfregaço interrompido, em seguida é corada com panótico. Para a técnica de coloração, a lâmina é mergulhada durante 30 segundos em casa uma das três soluções e é analisada sob imersão, em microscopia óptica (x1000) (FIGURA 5). Na avaliação espermática, são contadas no mínimo 200 células e os defeitos são classificados de acordo com o local que

se encontram, na cabeça ou na cauda, e podem também serem identificados em defeitos menores ou maiores, de acordo com BLOM (1973).

Figura 5 – Lâmina contendo sêmen bovino após a técnica de esfregaço corado em microscopia óptica (x1000)



Fonte: Do Autor (2019).

3.3 Castrações

Durante o estágio foram realizadas algumas castrações em suínos pertencentes ao departamento de zootecnia da UFV. Relato a castração de um animal do sexo masculino, com aproximadamente 300 kg de peso corporal (FIGURA 6). O animal estava em jejum sólido de 24h. Foi realizada a contenção com cachimbo para a realização do procedimento anestésico. A anestesia foi realizada no seio orbital e os fármacos utilizados foram Diazepam (6 mL) e Cetamina (18 mL), administrados separadamente. Imediatamente o animal entrou em plano anestésico sendo posicionado em decúbito lateral. Para a anestesia local, utilizou-se 25 ml de lidocaína, sendo aplicada na região subcutânea entre os testículos e também intratesticular. Utilizou-se iodo e clorexidine alcoólica para antisepsia do local. Foi realizada uma incisão sobre a pele e tecido subcutâneo ao longo da rafe mediano da bolsa escrotal. Um dos testículos foi exteriorizado coberto pela camada parietal da túnica vaginal, onde foi feita uma incisão na mesma para exposição do testículo. Após foi identificado o cordão espermático, fixado com pinça hemostática e realizada a ligadura circundando suas estruturas, posteriormente, realizou-se incisão do cordão espermático com bisturi e também a incisão do ligamento da cauda do

epidídimo removendo o testículo. O mesmo procedimento foi feito com o testículo contralateral. Limpou-se a região com gaze e lavou com água e iodo. O pós-operatório foi receita do antibiótico (Penicilina) e anti-inflamatório (Flunexin Meglumine) por três dias consecutivos.

Figura 6 – Sequência de fotos da castração em Suínos no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa



Fonte: Do Autor (2019).

3.4 Exames ginecológicos, diagnóstico de gestação e sexagem fetal

Exames ginecológicos possuem como objetivo identificar a fase do ciclo estral, causas de infertilidade, distúrbios puerperais e avaliar o animal se estão apto à reprodução (FRENCH et al., 2018). É essencial ter o histórico do animal, para depois iniciar a inspeção, a qual é verificada a conformação geral do animal, escore de condição corporal (ECC) e se há presença de secreção vaginal ou alterações vulvares.

Após essa avaliação é realizado a palpação transretal, utilizando-se luvas próprias, as quais são invertidas para evitar lesões na mucosa retal do animal. Durante esse exame, são avaliadas as estruturas do trato reprodutivo: cervix, útero, tuba uterina e ovários. É um exame de grande importância, pois através dele identifica-se alterações nas estruturas, possibilitando tratamentos ou descarte do animal, antes de implementar as biotécnicas de reprodução no rebanho. Feita a palpação, como forma de melhorar o exame, utiliza 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 pizeoelétricos 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 5,0 a 7,5 MHz (HAFEZ 2004).

O ultrassom veterinário utilizado durante as práticas a campo foi o Mindray P/B – DP 2200 VET e com transdutor linear com frequência de 7,5 MHz (FRICKE, 2002).

Durante as visitas técnicas a campo para realização dos exames ginecológicos foram encontrados em bovinos casos de alterações: cervicais, tais como: cérvix tortuosa; uterinas: endometrites e metrites; tubárias: salpingite e hidrossalpinge; ovarianas: cistos foliculares. Os casos recebiam o tratamento de acordo com a patologia diagnosticada visando o seu retorno ao manejo reprodutivo. Em casos que não possuíam tratamento como a cérvix mais tortuosa que impossibilita a prática da inseminação era sugerido o descarte do animal.

Nas espécies caprinas e suína os exames ginecológicos eram realizados utilizando apenas a ultrassonografia (TABELA 3).

Tabela 3- Exames ginecológicos realizadas por espécie durante o estágio

Espécie	Quantidade de exames realizados
Bovinos	250
Suínos	400
Caprinos	40
Equinos	4

Fonte: Do Autor (2019).

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

A maior parte dos diagnósticos de gestação realizados no estágio foram na espécie bovina e na espécie suína, que deve ser realizado o mais cedo possível após a 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. (HAFEZ, 2004).

Antes da utilização da ultrassonografia em tempo real modo B, os diagnósticos eram realizados através da palpação transretal. Atualmente pode-se utilizar os dois métodos, sendo a

palpação utilizada primeiro para em seguida empregar o uso da ultrassonografia. (SHELDON; NOAKES,2002)

Os diagnósticos de gestação eram realizados após ocorrer a inseminação artificial, em todos os casos eram rebanhos que utilizam a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O diagnóstico precoce era realizado de 28 a 30 dias após a inseminação. Entre 55 e 60 dias, era realizado a sexagem fetal, sendo também confirmada a gestação, e aos 90 dias ocorria a reconfirmação da gestação (TABELA 4) para avaliar a perda gestacional nesse período. Quando a perda gestacional ocorre até 45 dias após a fertilização é denominada mortalidade embrionária, e após esses 45 dias é denominada mortalidade fetal. A maioria dessas perdas gestacionais ocorrem no período embrionário (VANROOSE et al., 2000).

Já em caprinos e suínos diagnósticos eram realizados utilizando apenas ultrassonografia, em caprinos utilizou-se a 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

Dias após a Inseminação Artificial	Quantidade de diagnósticos
30*	280
60**	160
90***	25

Legenda: *Diagnóstico precoce. ** Confirmação da gestação e sexagem fetal. ***Reconfirmação da gestação.

Fonte: Do Autor (2019).

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 a presença de vesícula amniótica no corpo ipsilateral ao corpo lúteo. Ao realizar ultrassonografia observa-se presença de vesícula embrionária como uma estrutura anecóica contendo em seu interior o embrião. (FIGURA 7).

Figura 7 – Ultrassonografia de prenhez bovina após 32 dias de Inseminação Artificial, com a visualização do embrião



Fonte: Do Autor (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 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 de nascimento de bezerros em uma única época do ano fornecendo assim 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).

Após a realização do diagnóstico de gestação (DG), iniciou-se um novo protocolo de IATF nas vacas vazias. No mesmo dia, aplicou-se dois 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 três a quatro 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 dois 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 um ml 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 (ECP, Zoetis, Brasil) ou Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil) são utilizados como indutores de ovulação. O primeiro é aplicado no dia D8, oito dias após o início do protocolo, 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 um mL. No dia D10, dia dez após o início do protocolo realizava-se a inseminação artificial (FIGURA 9 e FIGURA 10).

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



Fonte: Do Autor (2019).

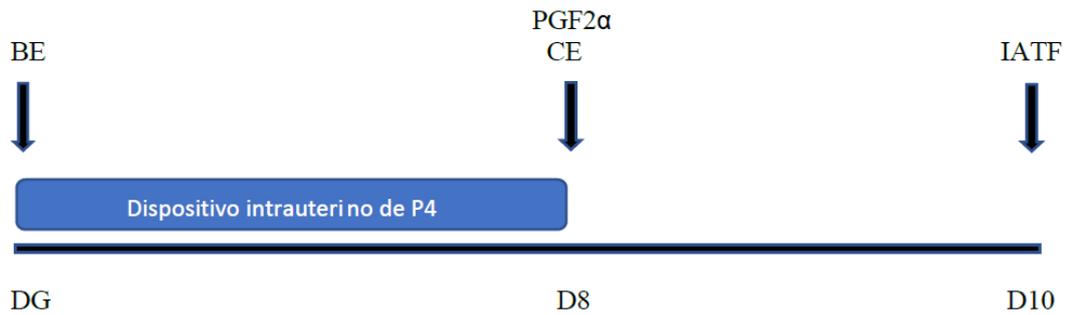
Figura 10- Inseminação Artificial



Fonte: Do Autor (2019).

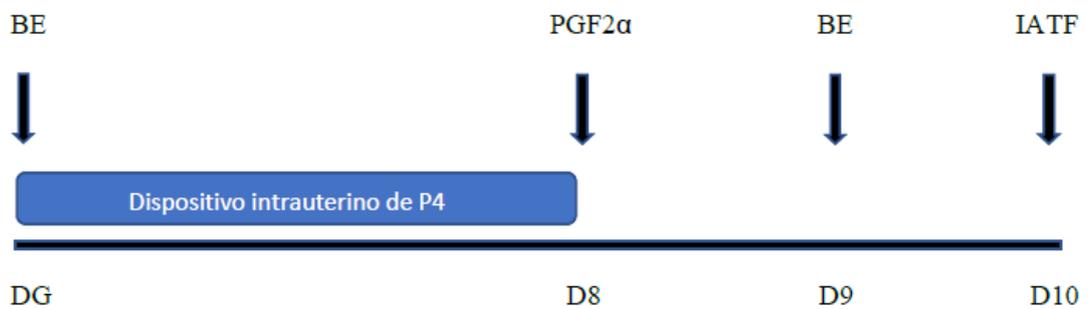
Os protocolos utilizados durante o período de estágio estão representados nas figuras a seguir (FIGURA 11 e FIGURA 12).

Figura 11 – Protocolo de IATF utilizando cipionato de estradiol



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 12 – Protocolo de IATF utilizando benzoato de estradiol



Fonte: Do Autor adaptado (2019).

3.6 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 abordadas temas sobre reprodução de machos e fêmeas e aulas práticas que eram realizadas no setor de Zootecnia, na qual eram disponibilizadas 30 vacas de cortes para aula as aulas de palpação transretal e ultrassonografia, na Suinocultura onde foi apresentado o manejo reprodutivo exercido no local e também no setor de caprinos, onde foram realizados diagnóstico de gestação através da ultrassonografia em Tempo-Real Modo-B, colheita de sêmen para avaliação de morfologia e criopreservação.

Foram acompanhadas também aulas da Pós-Graduação na disciplina Biotecnologia Aplicada a Reprodução animal, onde foram realizadas castrações em suínos, equinos e bovinos; aulas de avaliação de sêmen, resfriamento e congelamento de sêmen das espécies de produção.

3.7 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 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 parição 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 tração forçada até que o feto fosse eliminado. O animal era do sexo masculino e possuía aproximadamente 40 quilogramas (kg) (FIGURA 13). Aplicou 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 do peso corporal durante três dias. Além disso foi fornecido Drench Reviva Farm-O para reposição hidroeletrólítica.

Figura 13 – Animal do sexo masculino com aproximadamente 40kg



Fonte: Do Autor (2019).

3.8 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 aspiração *in vitro*, na qual utilizou-se ovários coletados em abatedouro.

Para realização da OPU, as fêmeas bovinas eram colocadas em tronco de contenção, e em seguida a região perineal era lavada com água e 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 7mL de soro fisiológico e heparina. Utilizou-se uma bomba a vácuo com pressão de 60 a 80 mmHg. Para 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 à 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 e cumulus contendo mais de três 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 recobrimo totalmente o oócito), e Grau IV (desnudo, ou seja, células do cumulus ausente). 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, as ovogônias se multiplicam através das 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 (mRNA), 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 de 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* estão 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 de 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 me 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 tomam 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 (AGUITA 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 cubóides (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 (AGUILAR 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 capacidade de resgatar uma grande parte dos oócitos imaturos presentes no ovário permitindo que atinjam a metáfase II, tornando-se viáveis para fecundação (GILCHIST et al, 2008).

Em 1972, Mukherjee demonstrou ser possível obter embriões de camundongos em laboratório, através da maturação oocitária, capacitação espermática e fertilização *in vitro*, fazendo com que houvesse inúmeras tentativas em outros animais. Posteriormente, em 1989, Mاتيولiet 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 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 suínos (MARCHAL et al,2001; O'BRIEN et al,2000).

O meio utilizado para a maturação *in vitro* é o TCM 199, que é suplementado com outras substâncias necessárias, havendo variações de protocolos entre laboratórios. Uma das substâncias utilizadas para suplementar o meio é o FSH, visto que foi observado que não ocorre formação do antro folicular sem 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 entro o meio para evitar a evaporação. Porém Shimada et al (2002) observaram que a utilização de 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 Somfaiet 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 14) e transportados em garrafas térmicas contendo solução fisiológica acrescida de gentamicina (10 mg/mL) a uma temperatura de 37° C. O frigorífico é localizado em Ponte Nova, zona da Mata Mineira, onde diariamente são abatidos mais de 2 mil animais e produzidos 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 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 14– Planta do frigorífico Saudali 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 Becker de vidro (1.000ml) contendo a mesma solução e mantidos em banho maria a 37°C.

Para aspiração folicular foram utilizadas agulhas 25 x 0,8 mm, 21 G acopladas a seringas descartáveis de 3 ml (FIGURAS 15,16 e 17).

Figura 15- Ovário suíno e folículos ovarianos, anteriormente a aspiração folicular



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 16 – Ovário suíno após aspiração folicular



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 17 – 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 18). Após a aspiração os ovários eram contados, colocados em sacos plásticos e acondicionados em câmara fria até o descarte.

Figura 18- Cálice cônico contendo líquido folicular em banho maria

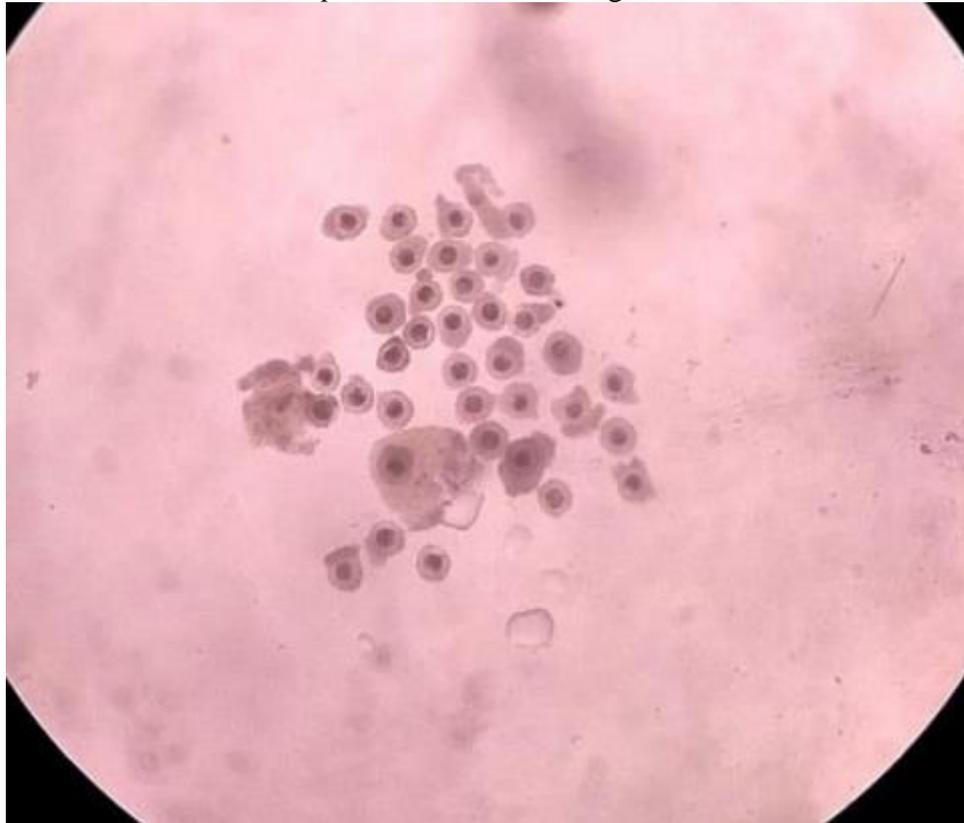


Fonte: Do Autor (2019)

O cálice foi encaminhado até a sala de cultivo, em que o sobrenadante foi descartado e o sedimento levado ao meio *TalpHepes* contendo Cloreto de sódio (NaCl), Cloreto de potássio (KCl), Fosfato monossódico (NaHPO_4), Lactato de sódio 50%, Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), Vermelho fenol, Cloreto de Cálcio (CaCl_2), Cloreto de magnésio (MgCl_2), HEPES e água ultrapura Milli-Q®. Todos os meios utilizados durante o trabalho foram filtrados com filtro 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 19), durante a manipulação a placa de petri era mantida em placa aquecedora a 37°C. A avaliação foi realizada usando 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 oócito.

Figura 19 – Complexos de *cumulus oócit* selecionados para 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 (0,91 mM), solução pen/strep, solução LH/FSH (0,5 ug/ml) e água ultrapura Milli-Q®. Dos 150 oócitos selecionados, 10(dez) foram separados para não passarem pelo processo de fixação e serem avaliados em microscópio invertido.

Para maturação in vitro utilizou-se uma placa de petri na qual foram colocadas cinco gotas de 50 microlitros de meio de maturação. Em seguida foi depositado óleo mineral entre as gotas, e estas foram recobertas com mais de 50 microlitros do meio de 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 à temperatura de 38,5°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 a hipotonização, utilizou-se uma lâmina previamente demarcada em formato retangular em seu centro com um cortador de vidro, na qual os oócitos eram depositados dentro da área demarcada ao lado oposto a demarcação, foram colocados 10 oócitos por lâmina, utilizando 14 lâminas no total. 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 aplicado uma gota (10 microlitros) de solução de metano e ácido acético (2:1) sobre os oócitos e após guardar a secagem da lâmina, a operação foi repetida. Com a lâmina seca, foram depositadas 4 gotas (40 microlitros) de solução de metanol e ácido acético (3:1) e após a secagem elas foram acondicionadas em uma cuba de vidro contendo solução de metanol e ácido acético (3:1) durante 48 horas para fixação de amostras (FIGURA 20).

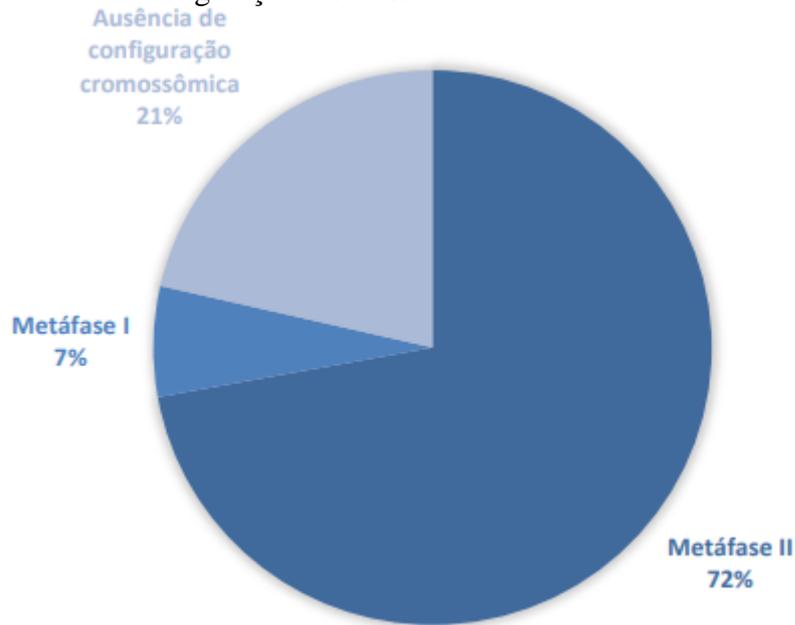
Após o período de dois dias, as lâminas foram retiradas das cubas, secadas ao ar, coradas com orceína 1% durante 30 segundos e depois lavadas cuidadosamente. Em seguida aguardou-se as lâminas secarem ao ar e foi aplicado uma gota de óleo de imersão sobre os oócitos corados, a área foi recoberta com lamínula e as margens da lamínula foi vedada com esmalte. Utilizando um microscópio óptico, os oócitos foram avaliados com óleo de imersão (1000x).

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 com ensaio.

4.3 Resultados e discussão

Os dados referentes à configuração cromossômica observada após o período de maturação estão apresentados como porcentagem no gráfico abaixo (GRÁFICO 1).

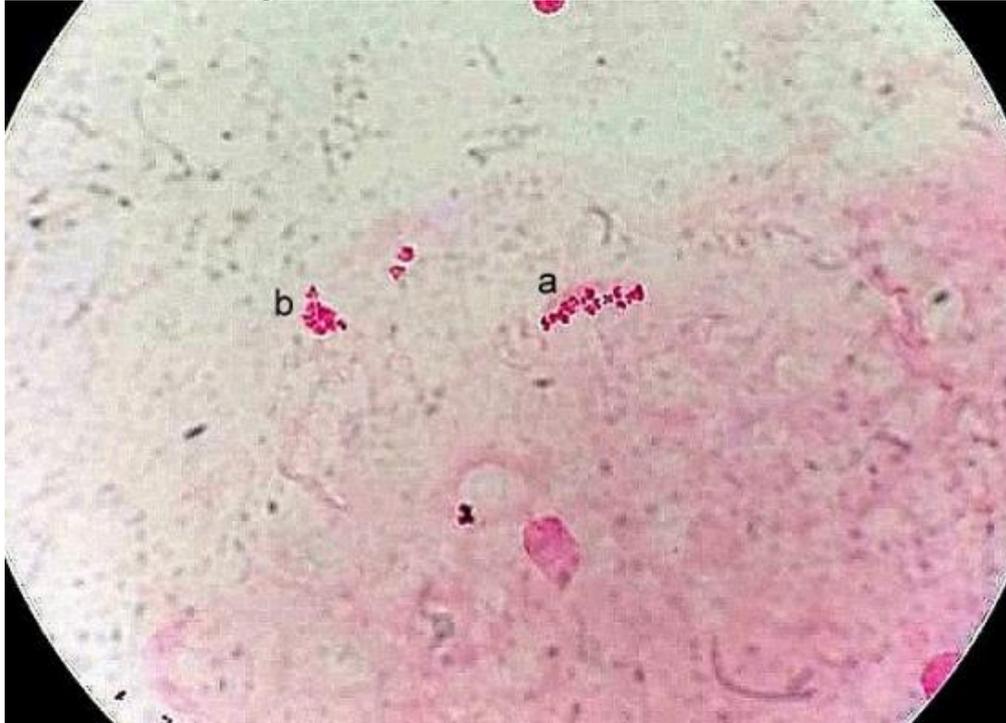
Gráfico 1 – Quantidade de oócitos expressa em porcentagem em metáfase I, metáfase II e com ausência de configuração cromossômica



Fonte: Do Autor (2019).

Os resultados demonstram que houve uma taxa de 72,14% de oócitos maturados (metáfase II) (FIGURA 21) em um total de 140 avaliados após 44 horas de maturação. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado por Mattioliet al (1991) que utilizaram oócitos de 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 21 – Oócito de suíno na 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 a identificação de oócitos em Metáfase I e Metáfase II, não sendo adequada para 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 classificado como ausência de configuração cromossômica.

Dos oócitos visualizados, 6,43% encontravam-se em estágio de metáfase I (FIGURA 22) e em 21,43% não foi possível visualizar o conjunto cromossômico, sendo então classificados com ausência de configuração cromossômica.

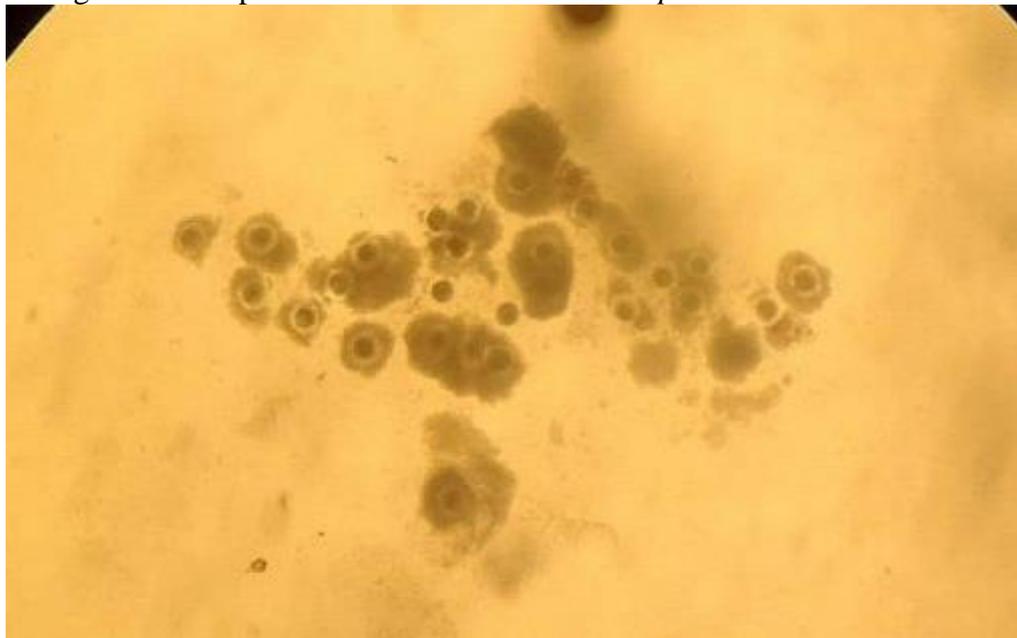
Figura 22 – Configuração cromossômica de oócitos suínos em metáfase I e II



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 44 horas de maturação, foi observada expansão das células do *cumulus oophorus*, exibida na Figura 23.

Figura 23 – Expansão de células do *cumulus oophorus* de oócitos suínos



Fonte: Do Autor (2019)

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

Dos dez oócitos que não passaram pelo processo de fixação, seis apresentavam o primeiro corpúsculo polar ao serem observados em microscópio invertido, o corpúsculo observado no espaço perivitelino, um compartimento localizado entre a membrana plasmática e a zona pelúcida do oócito (FIGURA 24).

Figura 24 - 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 da 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 caracterizada 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 2.149 metros em cada testículos (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 das gerações de espermatogônias presente no epitélio seminífero varia entre os animais, nos equinos são cinco 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 (A0). Durante a meiose ocorre formação dos espermatócitos secundários e em seguida espermátides, Na espermiogênese as espermátides se diferenciam em espermatozóides. 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 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 bactéria 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 de 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, um elevação dessa temperatura pode ter como consequência a degeneração testicular afetando assim a fertilidade do animal (BLANCHARD, 2001; VAN CAMP, 1997).

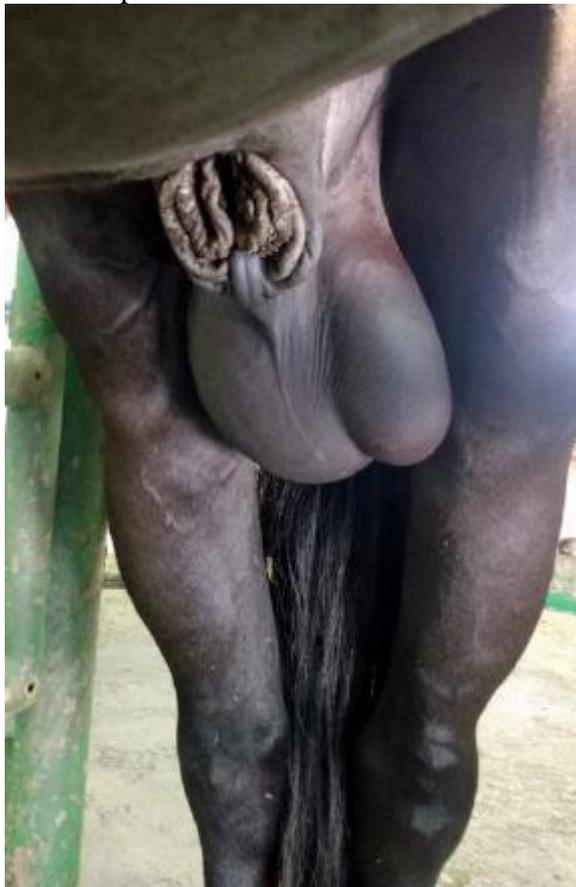
A degeneração testicular pode ser bilateral ou unilateral, permanente ou temporária (VAN CAMP, 1997). Inicialmente, os testículos apresentam-se com diminuição de tamanho e consistência macia, podendo evoluir para uma consistência firme devido a fibrose. Segundo Blanchard (2001), ao observar durante o exame clínico a reduzida produção de espermatozóides 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 (VAN CAMP, 1997). Como consequência da degeneração, pode haver diminuição ou ausência de espermatozóides 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 Gygaz (1973) em que foi atendido um garanhão que apresentava inchaço escrotal, aumento do número de espermatozóides anormais e perda de fertilidade, na qual a fertilidade voltou ao normal após 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, 6 anos de idade, pesando 365 Kg, residente da cidade de Ubá –MG, localizada a 65 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 25), 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 para 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 25 – Garanhão apresentando aumento de volume na região escrotal



Fonte: Do Autor (2019).

5.2.2 Exame físico

5.2.2.1 Termografia testicular

A termografia testicular 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 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 as glândulas sudoríparas presentes na pele escrotal, a túnica dartus, 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 26).

Figura 26 – Termografia testicular de garanhão após trauma sofrido na região escrotal



Fonte: Reprodução UFV (2019).

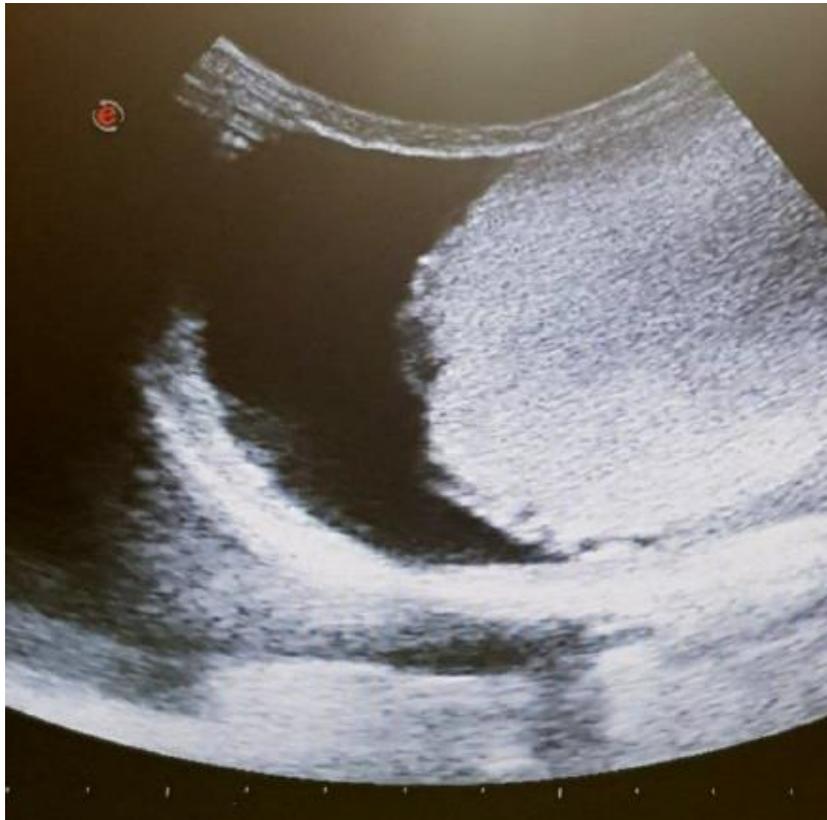
5.2.2.2 Ultrassonografia modo-B

A ultrassonografia em tempo-real modo B 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, 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).

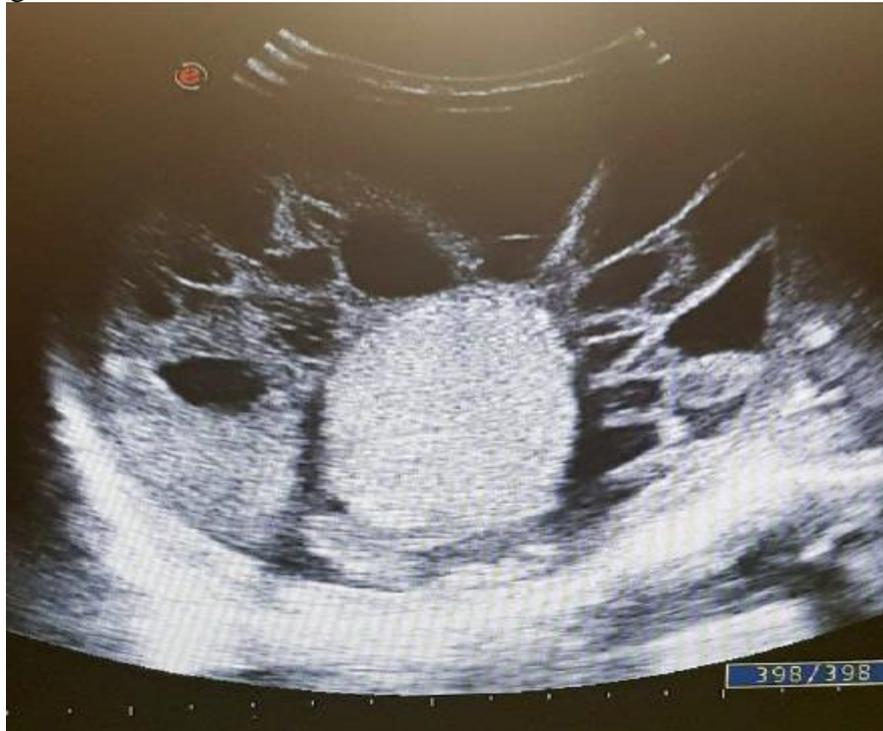
O aparelho utilizado no hospital veterinário foi o MyMyLab™30 VET GOLD (Esaote®) e transdutor convexo de 6,6 MHz. Para realização da técnica foi aplicado gel sobre o transdutor e a avaliação foi feita em ambos os testículos. O exame revelou uma grande área anecóica ao redor dos testículos, principalmente 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 27 e FIGURA 28).

Figura 27- Imagem ultrassonográfica do testículo esquerdo de garanhão após trauma sofrido na região escrotal



Fonte: Reprodução UFV (2019).

Figura 28- 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 era o mesmo da orquiectomia bilateral. Anteriormente, para avaliar se o animal poderia entrar em procedimento cirúrgico, foram realizados o eritograma (TABELA 5), leucograma (TABELA 6) e contagem de plaquetas (TABELA 7).

Tabela 5 – Eritograma

	Valores encontrados	Valores de referência
Hemácias: (10 ⁶ /μL)	7,57	6,5 – 12,5
Hemoglobinas: (g/dL)	10,9	11 – 19
Hematócrito: (%)	34,8	32 – 52
Proteína total: (g/dL)	6,2	6,0 -8,0
VCM (pg)	46,1	34 – 58
HCM (pg)	13,3	13, 3
CHCM (%)	29,5	31 – 37

Fonte: Do Autor (2019).

Tabela 6 – Leucograma

	Valores encontrados	Valores de referência
Leucócitos (células/μL)	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
Basófilos (%)	0	0-3

Fonte: Do Autor (2019).

Tabela 7 – Contagem de plaquetas (μ L)

Valores encontrados	Valores de referência
148.000	100.000 – 900.000

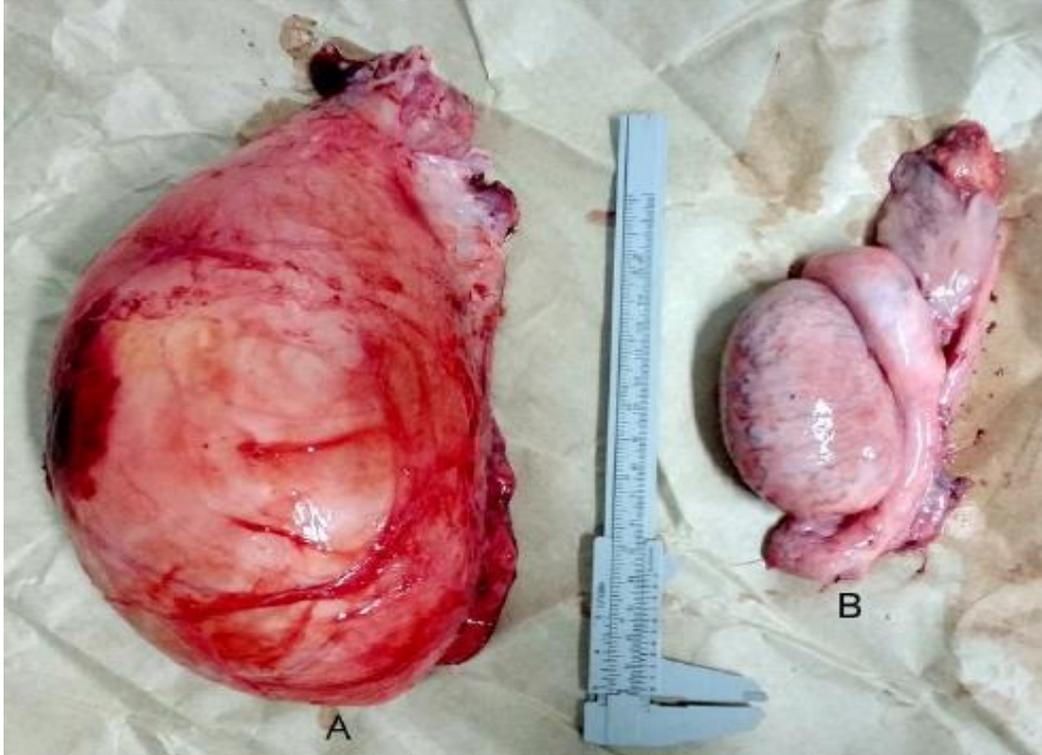
Fonte: Do Autor (2019).

Ao avaliar o hemograma completo não foram observadas alterações, permitindo assim o procedimento anestésico. Para a sedação utilizou-se detomidina intravenosa (IV) (0,02 mg/kg – 0,65 mL), em seguida foi aplicado éter gliceril guaiacol (EGG) 10% IV (volume dose efeito) e cetamina 10% IV (2 mg/kg -6,5 ml) para promover a indução anestésica. Os fármacos utilizados para manutenção anestésica foram EGG 5% IV (volume dose efeito), Xilazina 10% IV(5ml) e cetamina 10% IV(10mL). Para 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 Flunexin 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 29).

Figura 29 - Testículo direito e esquerdo ao chegar ao laboratório de andrologia animal



Legenda: Testículo direito coberto pela túnica vaginal (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 da aderência e grande quantidade de fibrina (FIGURA 30 e FIGURA 31).

Figura 30 – Presença de líquido e fibrina ao realizar a incisão da túnica vaginal do testículo direito



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 31 – 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 (FIGURA 32 e FIGURA 33), ao realizar a incisão ele apresentou coloração mais pálida quando comparado ao testículo esquerdo (FIGURA 34).

Figura 32 – Testículo direito

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



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 33 – Testículo direito e testículo esquerdo
Legenda: Testículo direito apresentando tamanho inferior(A), testículo esquerdo (B).



Fonte: Do Autor (2019).

Figura 34 – 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 (m)	4,2	5,3
Espessura (cm)	3,4	4,2

Fonte: Do Autor (2019).

Posteriormente foi realizada uma incisão da cauda do epidídimo do testículo esquerdo e feito a coleta de sêmen através de uma pipeta automática. O sêmen coletado foi depositado em um eppendorf contendo solução formol-salina tamponada (1mL) 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, fragmentados 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 micrótono 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

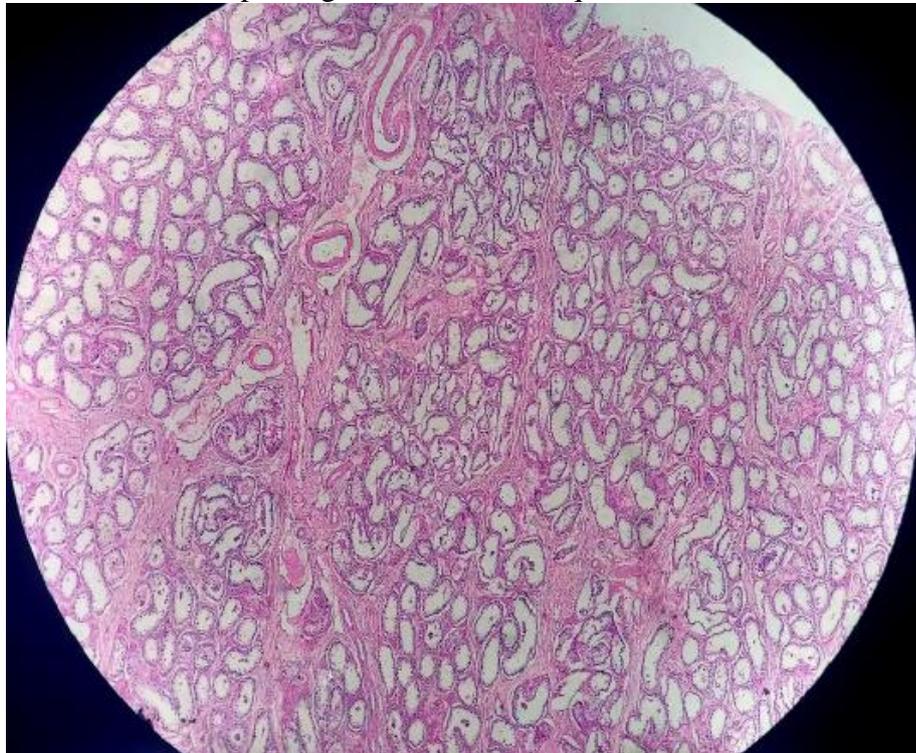
A técnica utilizada para avaliar a morfologia espermática dos sêmen proveniente da cauda do epidídimo foi a preparação úmida. Inicialmente com uma pipeta, foi realizada uma leve mistura do material presente no eppendorf para que a amostra coletada não ficasse muito concentrada. Feito isso, colocou-se uma gota de solução sobre a lâmina que em seguida foi

coberta por 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 análise, foram coletadas 200 células espermáticas, e enumeraram-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

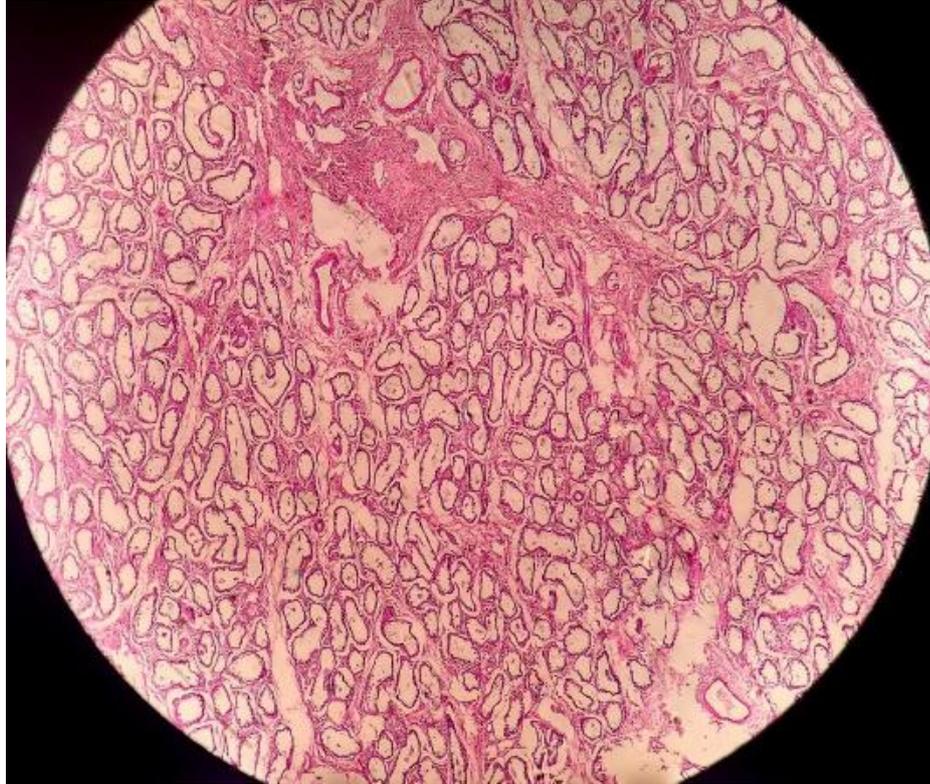
Ao avaliar as lâminas histopatológicas, observou-se que em ambos os testículos, houve redução das células da linhagem germinativa, diminuindo assim a altura do epitélio seminífero. Além disso, em alguns túbulos foi observada a descamação do epitélio. No testículo esquerdo, em alguns túbulos foi possível 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, espermatogônias e espermatócitos no túbulo seminífero. Não se encontrou espermatozóides nos túbulos seminíferos de ambos os testículos (FIGURA 35 a 42).

Figura 35- Lâmina histopatológica do testículo esquerdo com aumento de 40 vezes



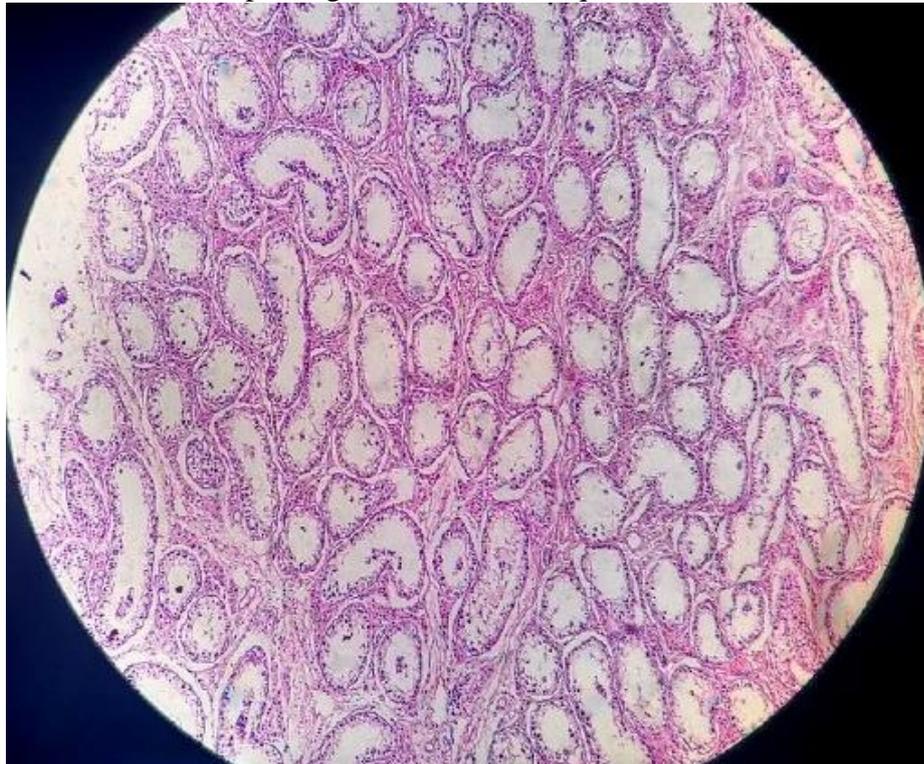
Fonte: Do Autor (2019).

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



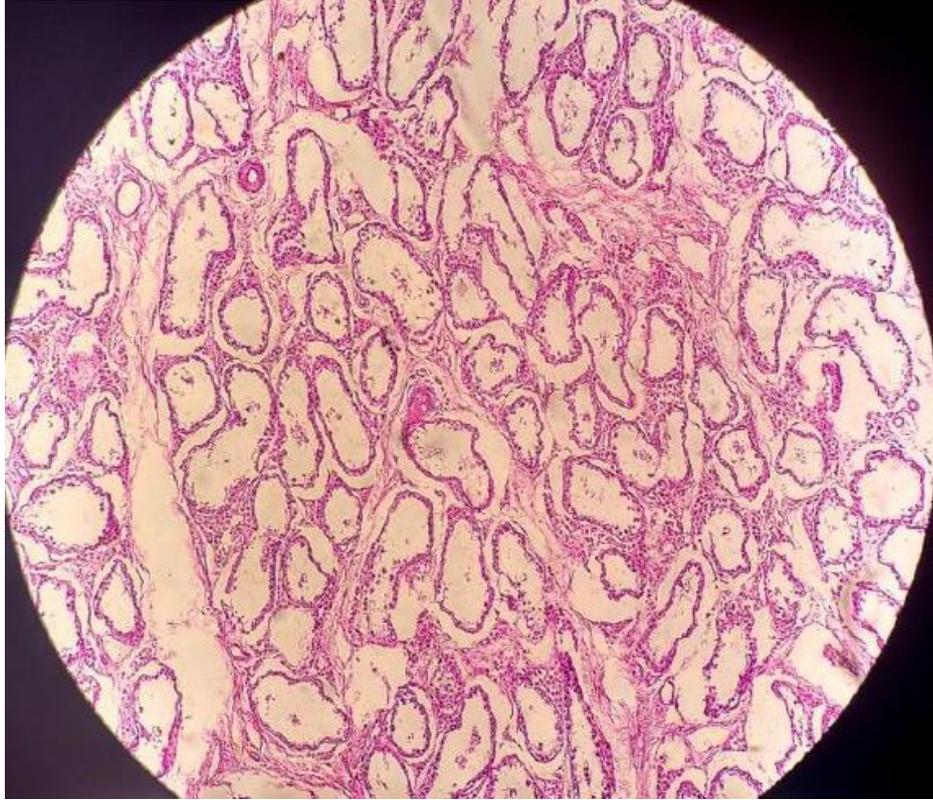
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 37- Lâmina histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 100 vezes



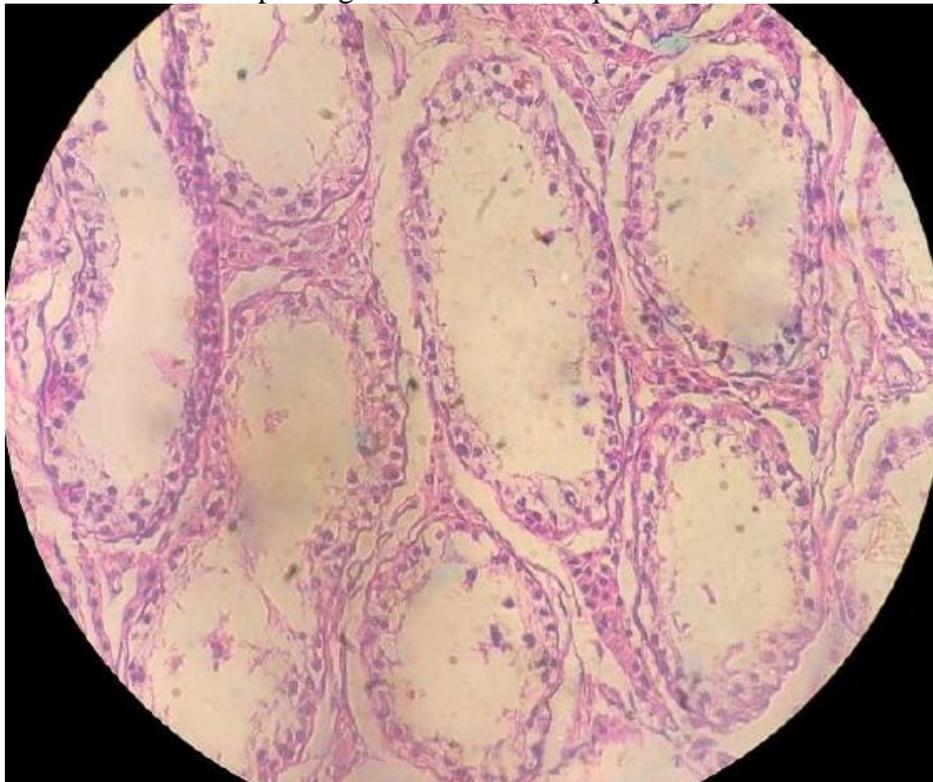
Fonte: Do Autor (2019).

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



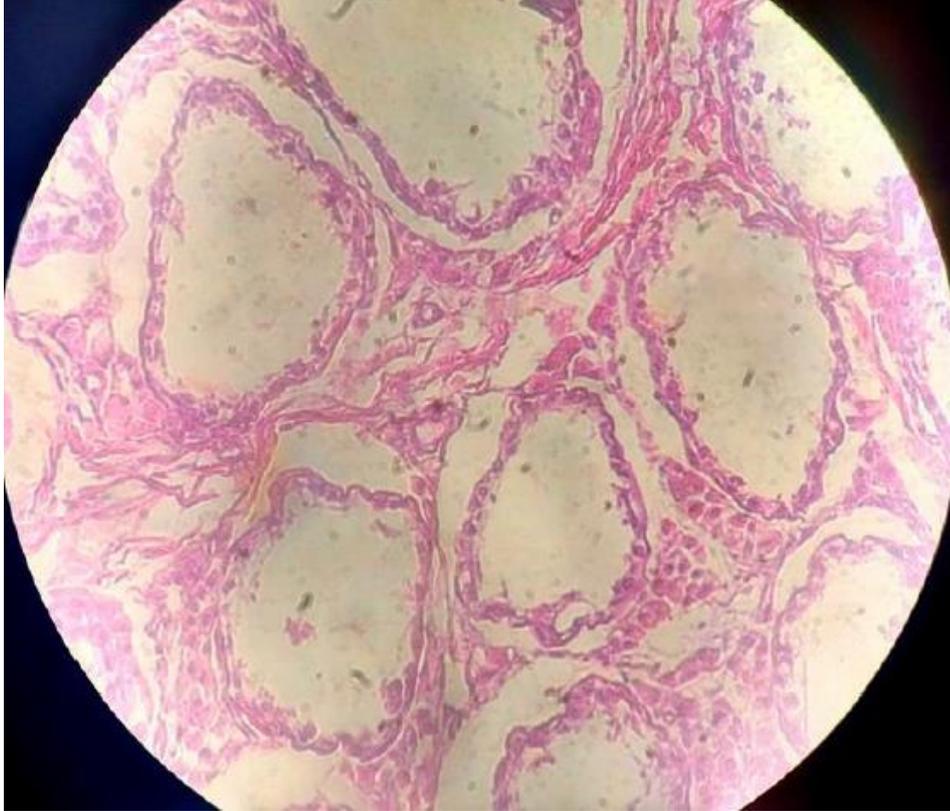
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 39- Lâminas histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 400 vezes



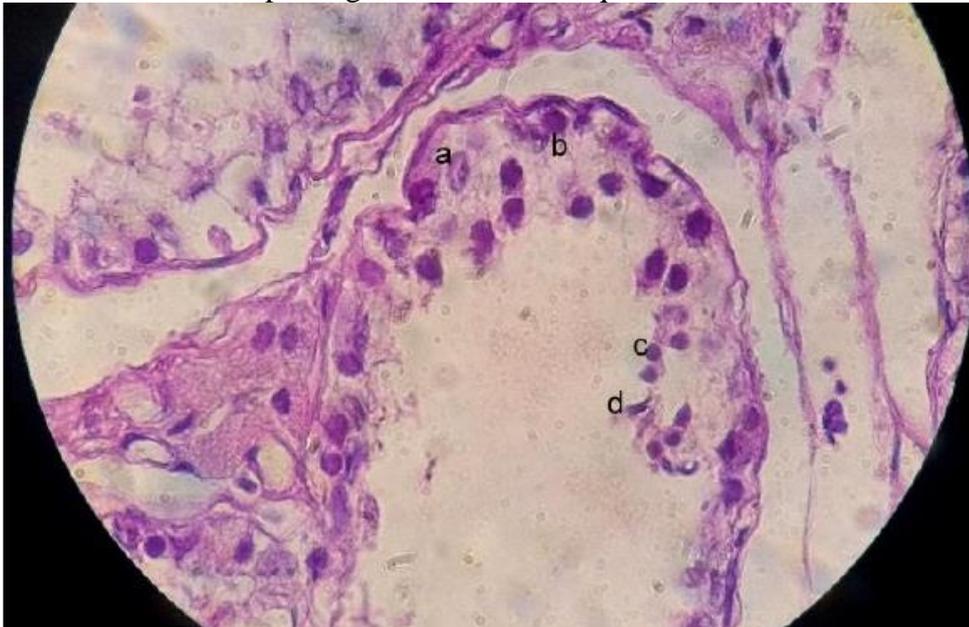
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 40- Lâminas histopatológica do testículo direito em aumento de 400 vezes



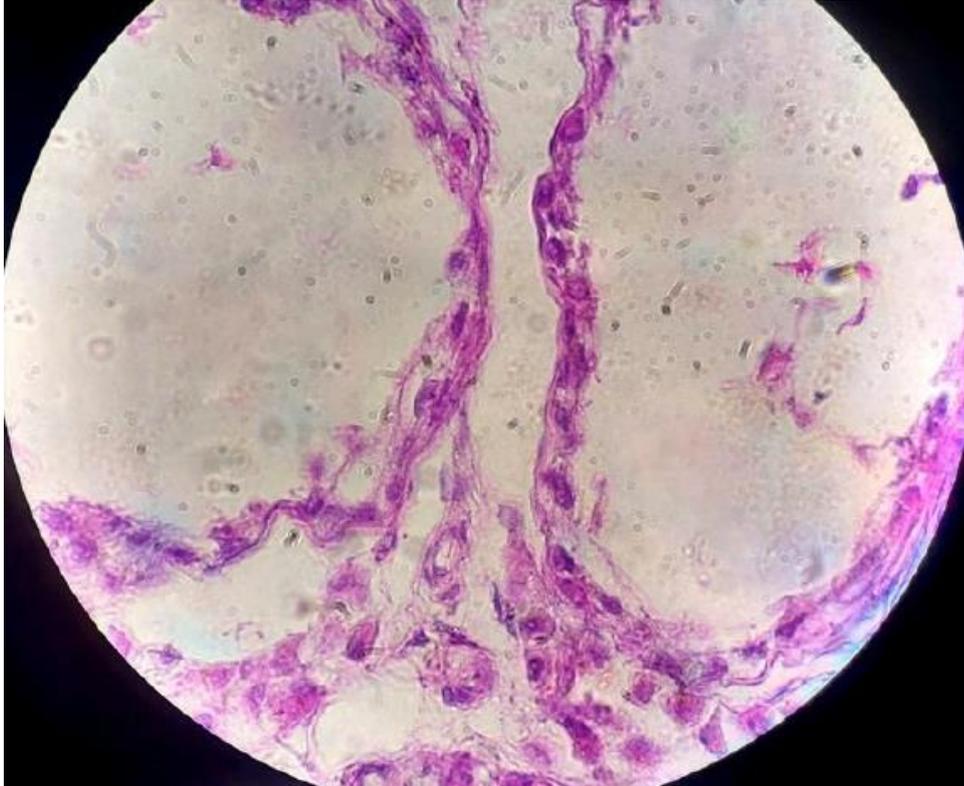
Fonte: Do Autor (2019).

Figura 41 – Lâmina histopatológica do testículo esquerdo em aumento de 1000 vezes



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

Figura 42 – Lâmina histopatológica do testículo direito em aumento de 1000 vezes



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

Na Figura 43 observa-se algumas alterações espermáticas encontradas nesse trabalho.

Figura 43 – 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: Setor Reprodução UFV (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. Diferentemente do aumento de anormalidades consequentes 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 (2006) 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 McEntee (1987).

A alteração na morfologia espermática mais observada nesse trabalho foi a grande quantidade de gota citoplasmática proximal, 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 Pezziniet al (2006) e Hammes (1996).

A gota citoplasmática é formada no final da espermiogênese, na qual, um resquício do citoplasma nas espermátides é mantido durante a sua diferenciação em espermatozoides (COOPER, 2005; Hermoet al, 1994). Durante o trânsito epididimário ocorre migração da gota

citoplasmática devido aos movimentos peristálticos do epidídimo (COOPER, 2011). Portanto, na cabeça do epidídimo está presente um grande número de espermatozóides com gota citoplasmática proximal, e na cauda uma maior quantidade de gota citoplasmática distal (COOPER 2011).

Dessa maneira, a presença de 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 um 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 Pezziniet al (2006) em touros, a presença de gota citoplasmática proximal foi observada após 23 dias de insulação, na qual autores consideram que foi causada pela alteração na espermatogênese, devido ao tempo necessário para a alteração ser encontrada.

Dessa maneira conclui-se, para avaliar a etiologia da alta taxa da gota citoplasmática proximal, é necessário levar em conta o tempo necessário para ocorrer o transito 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, o qual 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 ampliar e adquirir 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.

7 REFERÊNCIAS

- 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, embryodevelopment, 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 (*Bostaurus 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, 2001.
- 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 oostovulatory 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 invitro. **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 DEREPRODUÇÃO 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.