

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
ÁREA: CLÍNICA MÉDICA, CLÍNICA CIRÚRGICA E
REPRODUÇÃO EM GRANDES ANIMAIS

Aluno: Antonio Joaquim de Sousa Junior
Orientador: M.V. Amauri Correia Tomazinho
Profº Dr. Ed Hoffmann Madureira
Supervisor: Profº Pedro Henrique Nicolau Pinto

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das
exigências para a conclusão do
Curso de Graduação em
Medicina Veterinária da
Universidade Federal do Paraná

PALOTINA – PR
Janeiro de 2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DE PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
COMISSÃO ORIENTADORA DE ESTÁGIOS



**ATA DE DEFESA DE RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA REALIZADA POR
Antonio Joaquim de Sousa Junior**

Às 14:00 horas do 15 de Fevereiro de 2013, reuniu-se na sala 12 do Bloco III da Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, a Banca Examinadora infra nomeada para proceder ao julgamento e arguição do relatório de estágio apresentado pelo aluno **Antonio Joaquim de Sousa Junior**, supervisionado pelo Prof. **Pedro Henrique Nicolau Pinto**, como um dos requisitos parciais para concluir o curso de graduação em Medicina Veterinária. Iniciado os trabalhos, o supervisor e Presidente da Banca concedeu a palavra ao aluno, para a exposição do seu relatório. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca, os quais passaram a arguir o aluno. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao candidato as seguintes notas: Prof. **Dr. Roberto Rochadelli**, nota: 9,0 (nove), Prof. **Dr. André Luis Filadelpho**, nota: 9,0 (nove), e Prof. **Pedro Henrique Nicolau Pinto**, nota: 9,0 (nove). A nota final do aluno, após a média aritmética dos três examinadores, foi 9,0 (nove). As considerações e sugestões feitas pela Banca Examinadora deverão ser atendidas pelo aluno sob acompanhamento de seu supervisor. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada foi assinada pelo Presidente e demais membros da Banca Examinadora.

Prof Dr. Roberto Rochadelli
Membro da Banca

Prof. Dr. André Luis Filadelpho
Membro da Banca

Prof. Pedro Henrique Nicolau Pinto
Supervisor

FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO

1ª Parte

Local de estágio: Replan, Ariquemes – Rondônia.

Carga horária cumprida: 152 horas

Período de realização do estágio: 06/08/2012 a 30/08/2012

Área: Clínica médica e cirúrgica, reprodução com grandes animais.

Orientador: M.V. Amauri Correi Tomazinho

Supervisor: Prof.º Dr. Pedro Henrique Nicolau Pinto

2ª parte

Local de estágio: Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal (VRA), Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal

Carga horária cumprida: 232 horas

Período de realização do estágio: 03/09/2012 a 12/10/2012

Área: Reprodução de Grandes Animais

Orientador: Prof.º Dr. Ed Hoffmann Madureira

Supervisor: Prof.º Pedro Henrique Nicolau Pinto

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por ter me dado força, perseverança, superação e saúde para chegar até aqui. Minha família, que é a minha base e meu refúgio. Meus pais, Antonio e Neide, e minha irmã Simone, que sempre me incentivaram, dando total apoio na minha jornada e sempre fazendo o possível e o impossível para que eu chegasse até esse momento.

Aos amigos com quem morei na durante a faculdade: Yuri, Giancarlo (R2), Diogo (Romelândia), Marcos, Alceu (juninho foz) e o Ciro. Aos vizinhos do condomínio Madre Paulina, em especial: Guilherme, José Carlos Jr, Caio, Monise, Jeocassia, Maria. Aos membros do PCC (Primeiro Comando Caipira), o timaço da turma e demais amigos da XVI Turma de Medicina Veterinária.

À Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, por toda a infraestrutura oferecida durante minha graduação. Todos os professores e funcionários que contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Ao meu orientador, Professor Pedro Henrique Nicolau Pinto, que me ajudou nesse último trabalho da graduação.

Ao Amauri, Rodrigo, Marília e a equipe da Replan, que me ensinaram com paciência e dedicação. À USP, Campus Pirassununga, ao meu orientado Prof. Dr. Ed Hoffmann, pelo exemplo pessoal e profissional, assim como toda a equipe do Setor de Reprodução Animal (VRA): docentes, pós-graduandos, estagiários e funcionários, obrigado por tudo que aprendi com vocês.

“Por quanto fizeste do Senhor o teu refúgio,
e do Altíssimo a tua habitação, nenhuma mal
te sucederá,... Porque aos seus anjos dará á
ordem a teu respeito, para te guardarem em
todos os teus caminhos. Eles te susterão
nas suas mãos, para que não tropeces em
alguma pedra.”

Salmo 90: 9-12

RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso mostra as atividades técnicas desenvolvidas no período de 06 de agosto a 12 de outubro na REPLAN (Reprodução Planejada) e na Universidade de São Paulo (USP), Campus Pirassununga, dentro da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná. As atividades desenvolvidas na Replan foram orientadas pelo Médico Veterinário Amauri Correi Tomazinho. E os procedimentos realizados na USP foram orientados pelo Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira. Ambos sob a supervisão do Prof Pedro Henrique Nicolau Pinto. Foram abordadas neste Trabalho de Conclusão de Curso as atividades de assistência técnica da REPLAN e os procedimentos diários realizados na USP. As atividades foram desenvolvidas no setor de clínica médica, clínica cirúrgica e reprodução de grandes animais. Relatando-se a estrutura, o funcionamento dos estabelecimentos e além dos procedimentos mais frequentemente executados.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01: Vista frontal da empresa de reprodução planejada – REPLAN, onde foi realizado o estágio curricular obrigatório no período de 06/08/12 a 30/08/12.....	13
FIGURA 02: Vista frontal da sala de apoio do laboratório na REPLAN.....	14
FIGURA 03: Departamento de Reprodução Animal – VRA, USP – Pirassununga. Onde foi realizado o estágio curricular obrigatório no período de 03/09/12 a 12/09/12.....	16
FIGURA 04: Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) utilizado nas fêmeas bovinas de leite durante o estágio curricular obrigatório realizado na REPLAN.....	21
FIGURA 05: Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) utilizado nas fêmeas bovinas de leite durante o estágio curricular obrigatório realizado na USP – Pirassununga.....	21
FIGURA 06: Diagnóstico de gestação com auxílio de ultrassom modelo Mindray 2200 Vet na USP – Pirassununga.....	25
FIGURA 07: Material utilizado para aspiração folicular na empresa REPLAN.....	28
FIGURA 08: Aspiração folicular sendo realizada pelo Amauri Tomazinho.....	29
FIGURA 09: Avaliação e seleção de oócitos a campo, realizado durante o estágio na REPLAN.....	30
FIGURA 10: Incubadoras com embriões produzidos durante o estágio na REPLAN.....	33
FIGURA 11: Realizando seleção dos embriões durante estágio da REPLAN.....	34
FIGURA 12: Protocolo realizado nas receptoras de embrião, utilizados durante o estágio na REPLAN.....	35
FIGURA 13: Avaliação dos testículos pelo médico veterinário Amauri Tomazinho, durante o estágio na REPLAN.....	37

FIGURA 14: Coleta de sêmen por eletroejaculação em bovinos no estágio da REPLAN.....	38
FIGURA 15: Exame andrológico a campo, realizado durante o estágio na REPLAN.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: . Número total e porcentagem das atividades reprodutivas, laboratorial e cirúrgicas acompanhadas durante o estágio curricular obrigatório realizado na REPLAN, no período de 06/08/12 a 30/08/12.....	17
TABELA 02: Atividades acompanhadas na área de reprodução animal, USP – Pirassununga, no período de 03/09/2012 a 12/10/2012.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L - Microlitro
BE - Benzoato de estradiol
CBRA - Centro de biologia em reprodução animal
CIV - Cultivo *in vitro*
CL - Corpo lúteo
CO₂ - Gás Carbônico
FD - Folículo Dominante
FIV - Fertilização *in vitro*
IA - Inseminação Artificial
IATF- Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM - Intramuscular
L - Litro
LH - Hormônio Luteinizante
MIV - Maturação *in vitro*
mL - Mililitro
mm - Milímetro
OPU - Ovum Pick Up
P4 - Progesterona
PG - Prostaglandina
PIV - Produção *in vitro*
TE - Transferência de Embrião
TETF - Transferência de Embrião em Tempo Fixo
UI - Unidade Internacional
VRA - Departamento de Reprodução Animal

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESCRIÇÃO GERAL DOS LOCAIS DE ESTÁGIO.....	13
2.1 REPLAN.....	13
2.2 Universidade de São Paulo (USP).....	15
3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO.....	17
3.1 Inseminação artificial em tempo fixo – IATF em bovinos de Leite	19
3.2 Diagnósticos de gestação por ultrassonografia	23
3.3 Exame ginecológico em bovinos.....	25
3.4 Tecnologia de embriões.....	26
3.4.1 Aspiração folicular guiada por ultrassom - <i>Ovum pick up</i> (OPU).....	26
3.4.2 Produção in vitro de embriões.....	31
3.4.3 Inovulação de embriões.....	33
3.5 Exame andrológico.....	35
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
5 SUGESTÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

O estágio curricular supervisionado é realizado no último semestre do curso de Medicina Veterinária. Desta maneira, o estágio proporciona ao acadêmico a oportunidade de aprimorar seus conhecimentos e práticas relacionadas à área escolhida, assim como proporciona uma visão mais ampla e a aplicação do que foi visto durante a graduação.

O rebanho de bovinos no Brasil foi de 212,798 milhões de cabeças no ano de 2011, teve 1,6% de aumento em relação ao registrado em 2010. Este rebanho encontra-se disperso por todo o Território Nacional, embora seja encontrado em maior número na Região Centro- Oeste do País (34,1%). As demais regiões apresentam os seguintes percentuais de participação: Norte (20,3%), Sudeste (18,5%), Nordeste (13,9%) e Sul (13,1%). O Estado de Mato Grosso possuía o maior efetivo de bovinos, 13,8%; seguido por Minas Gerais, com 11,2%; Goiás, com 10,2%; e Mato Grosso do Sul, com 10,1%. O gado zebu (*Bos indicus*) é predominante e isso se deve a maior adaptabilidade às condições climáticas (altas temperaturas e umidade) e a disponibilidade de alimentos (sazonalidade quali-quantitativa da produção de forrageiras) encontrados no Brasil tropical. (BEEFPOINT, 2012).

O papel da pecuária no Brasil vai muito além da geração de renda e do crescimento da economia. A atividade foi fundamental na demarcação das fronteiras nacionais e ocupação do território. Hoje o cenário é diferente. O setor se profissionalizou e está consolidado. Essa consolidação não significou aumento de renda, pelo contrário. As margens do negócio se estreitaram. Não existe espaço para erros. A importância da pecuária e as responsabilidades inerentes à sua exploração não diminuíram e são crescentes.

A pecuária atual exige máxima eficiência reprodutiva e produtiva para possibilitar o retorno econômico. Mesmo ocupando uma posição de prestígio no mercado mundial, em relação ao tamanho e importância de seu rebanho, o Brasil pode melhorar os índices zootécnicos obtidos. Nesse sentido o uso de tecnologia aplicada da reprodução, pode contribuir muito para melhorar índices

reprodutivos nas propriedades. Desde que seja aplicada de forma correta a reprodução é um elo vital no processo de produção, marcando o início da cadeia produtiva e interferindo significativamente no resultado financeiro.

As tecnologias aplicadas da reprodução mais utilizadas são: Inseminação Artificial (IA), Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), Transferência de Embriões (TE), Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF) e Fertilização *In Vitro* (FIV).

Desta maneira, do estágio curricular obrigatório foi realizado a primeira parte na assistência REPLAN - Reprodução Planejada, localizada no município Ariquemes-RO. A segunda parte na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, Pirassununga, na área de reprodução animal. Ambas com infra-estrutura disponível à realização das práticas, além de contar com profissionais especializados na área de escolha do estágio

2 DESCRIÇÃO GERAL DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

2.1 REPLAN

A empresa foi fundada em junho de 2005 por dois médicos veterinários, o Sr. Amauri Tomazinho e a Sra Marília Leite de Oliveira, um zootecnista, Rodrigo Ferri, com o objetivo de prestar assistência técnica nas áreas de bovinocultura de corte e leite. Conta com a representação da Alta Genetics, uma das maiores e mais respeitadas centrais de touros do Brasil e do mundo, na região de Ariquemes. Com o andamento das atividades a campo e pela necessidade de um conhecimento prático na administração de propriedades rurais, integrou-se aos membros da empresa um técnico em agropecuária. Hoje conta com três veterinários, um zootecnista, um técnico agrícola e um secretário.



Figura 1 : Vista frontal da empresa de reprodução planejada – REPLAN, onde foi realizado o estágio curricular obrigatório no período de 06/08/12 a 30/08/12.

Está localizada na Av. Capitão Silvio, Nº 4320, no bairro Grande Áreas na cidade de Ariquemes-RO. O expediente de trabalho da empresa é das 8h:00min às 11h:30min e das 14h:00min às 18h:00min de segunda a sexta e

aos sábados 8h:00min às 12h:00min. Os animais atendidos pela empresa eram bovinos de corte e leite, dando maior ênfase à bovinocultura de corte pela representatividade da exploração na região.

A loja da REPLAN possuía três escritórios, um depósito de produtos veterinários para reprodução animal, duas geladeiras, um banheiro, uma lavanderia, dispensa para armazenamento de equipamentos como ultrassom, microscópio de campo, botijão de sêmen, descongeladores de sêmen, eletroejaculadores, materiais de consumo, entre outros e um laboratório equipado com estufas, microscópio, geladeira, ar condicionado, centrífuga, autoclave e outros equipamentos. O laboratório era credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para realização de exames de brucelose, tuberculose e fertilização *in vitro* – FIV. A REPLAN utilizava o laboratório para fertilização *in vitro* e exames de brucelose e andrológico.



Figura 2 : Vista frontal da sala de apoio na REPLAN.

O veterinário Amauri Correi Tomazinho era responsável pela aspiração folicular (OPU), inovulação de embriões, escolher os protocolos das IATF e atendimentos clínicos e cirúrgico. O veterinário Vítor Côrte Coelho realizava os protocolos das IATF nas propriedades, exames ginecológicos e diagnósticos de gestação. A veterinária Marília Leite de Oliveira era responsável pela parte

da fertilização in vitro. Já o zootecnista Rodrigo Ferri fica responsável pelas vendas dos protocolos e sêmens.

2.2 Universidade de São Paulo (USP)

A segunda parte foi na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga, no Departamento de Reprodução Animal (VRA), mais especificamente no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), criado em 1990.

O Campus de Pirassununga é o maior dos Campos da USP em extensão territorial. É uma fazenda com área total de 2.269 ha ou 937 alq., com 67.595,76m² de área edificada. O Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) está localizado em área aproximada de 21 ha, com área construída de 2.000m². Envolve os laboratórios de fisiologia e endocrinologia molecular, biotecnologia do sêmen e andrologia, biotecnologia de ovinos e caprinos, sala para colheita de sêmen e embriões, curral aberto para manuseio em tronco de contenção de oito animais concomitantemente, quatro salas para docentes e sala para aulas teóricas, 12 piquetes (12.000m²), 6 pastos (176.000m²) e capineiras (20.000m²). Há, também, uma casa de 250 m², que serve de alojamento para docentes, pós-graduandos, estagiários e monitores, quando em atividades de ensino, pesquisa ou prestação de serviços à comunidade.

O VRA (Figura 3) exerce no CBRA, intensa atividade de ensino, pesquisa e extensão de serviços à comunidade, proporcionando estágios curriculares a alunos desta e de outras Instituições de Ensino, orientação e execução de projetos científicos, dissertações e teses que envolvam inseminação artificial, micromanipulação, transferência de embriões, sincronização do ciclo estral e manejo reprodutivo. Além de orientação técnica dos rebanhos do "Campus" e atendimento externo na esfera reprodutiva (FMVZ-USP). O departamento é responsável por treze disciplinas profissionalizantes no curso de graduação em Medicina Veterinária, duas no curso de graduação em Zootecnia, e também por duas áreas de concentração no curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nos níveis de mestrado e doutorado.



FIGURA 3: Departamento de Reprodução Animal – VRA, USP – Pirassununga. Onde foi realizado o estágio curricular obrigatório no período de 03/09/12 a 12/10/12.

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio curricular supervisionado REPLAN, ocorreu no período de 06 de agosto a 30 de agosto de 2012 na área de clínica médica, cirurgia e reprodução de grande animais sob orientação do Médico Veterinário Amauri Correia Tomazinho e supervisão da Prof^o Dr Pedro Henrique Nicolau Pinto, totalizando 152 horas.

Os serviços veterinários eram solicitados por meio de ligações telefônicas a unidade, agendamentos (feitos pessoalmente ou por telefone) bem como revisões de consultas que eram feitas alguns dias depois ao primeiro atendimento.

Na tabela 01 estão listadas as atividades desenvolvidas, durante o estágio curricular obrigatório realizado na REPLAN, bem como suas respectivas frequências.

TABELA 01. Número total e porcentagem das atividades reprodutivas, laboratorial e cirurgias acompanhadas durante o estágio curricular obrigatório realizado na REPLAN, no período de 06/08/12 a 30/08/12.

ATIVIDADES	NÚMEROS DE CASOS	FREQUÊNCIA (%)
Diagnóstico de gestação por ultrassonografia	72	30,90
Inseminação por tempo fixo – IATF	56	24,03
Inovulação de embriões	50	21,45
Exame andrológico	29	12,44
Aspiração folicular – OPU	17	7,29
Fixação da flexura sigmóide do pênis - Rufião	6	2,57
Descorna	3	1,32
Total	233	100%

A segunda parte do estágio foi realizado no período de 03/09/2012 a 12/10/2012, sob orientação do Professor Doutor Rubens Ed Hoffman Madureira

e supervisão do Professor Pedro Henrique Nicolau Pinto, perfazendo 240 horas de atividades.

As atividades acompanhadas no período de realização do estágio VRA - USP foram, em quase sua totalidade, referentes aos projetos de pesquisa do programa de pós-graduação em reprodução animal conforme tabela 2. As práticas referentes à estação de monta se iniciariam somente no final de outubro. Portanto, a rotina prática, especificamente na área de reprodução em bovinos, encontrava-se reduzida. Embora também tenham sido acompanhadas atividades com equinos e bubalinos, o foco do estágio foi reprodução em bovinos e, dessa forma, as atividades ligadas a esta espécie estão descritas com maior ênfase.

TABELA 02. Atividades acompanhadas na área de reprodução animal, USP – Pirassununga, no período de 03/09/2012 a 12/10/2012.

ATIVIDADES	NÚMEROS DE CASOS	FREQUÊNCIA (%)
Diagnóstico de gestação por ultrassonografia	130	57,01
Avaliação ginecológica por ultrassonografia	47	20,61
Inseminação artificial em tempo fixo - IATF	21	9,21
Exame andrológico	12	5,25
Colheita de sêmen – equino	8	3,50
Diagnóstico de gestação por palpação retal - bubalino	6	2,63
Cisto ovariano		1,42
Cesária	3	1,31
	1	0,47
Total	228	100

3.1 Inseminação artificial em tempo fixo – IATF em bovinos de Leite

A pecuária atual exige máxima eficiência reprodutiva e produtiva para possibilitar retorno econômico. Nesse sentido, a utilização dos hormônios exógenos se faz muito importante no contexto de se buscar produtividade e rentabilidade (MADUREIRA E FILHO, 2012).

Na década de 70, a disponibilidade das prostaglandinas do grupo F2 alfa (PG) trouxe grande avanço e sua associação com progestágenos e estrógenos, possibilitou o emprego da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Na época, os conhecimentos da área da fisiologia da reprodução eram insuficientes para proporcionar resultados economicamente interessantes. Entretanto, na década de 80, o emprego da ultra-sonografia e a disponibilidade de se quantificarem vários hormônios possibilitaram o ajuste dos protocolos de IATF e eles passaram a ser empregados em maior escala nos sistemas de produção de carne e de leite (MADUREIRA e FILHO, 2012).

Nos sistemas extensivos de criação de gado de corte, tanto no Brasil como nos EUA, observa-se que 50% das vacas encontram-se em anestro no início da estação de monta. Esta alta taxa de anestro, associada à baixa eficiência na detecção de cios, entre as vacas que estão ciclando, resulta em uma baixa taxa de serviço. É fundamental que o programa de sincronização do estro tenha a capacidade de induzir ciclicidade nas vacas em anestro, com aceitável taxa de concepção, para que apresente um custo – benefício favorável (MADUREIRA e PIMENTEL, 2005).

A utilização e o desenvolvimento da inseminação artificial (IA) são indispensáveis para o melhoramento genético e o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Programas de IATF servem para concentrar as inseminações e a parições em épocas desejáveis. Os protocolos de IATF visam controlar o crescimento das ondas foliculares, regular a função do corpo lúteo e o momento da ovulação (RIBEIRO et al., 2009).

Os protocolos hormonais estão bem ajustados e, desde que implementados de maneira correta, funcionam adequadamente. Há uma

tendência de se supervalorizar a importância dos protocolos! É de suma importância o conhecimento da fisiologia e endocrinologia básicas relacionadas, para que decisões e ajustes possam ser feitos. Realmente, existem protocolos mais adequados para novilhas ou vacas de corte, ciclando ou em anestro, ou para vacas leiteiras de alta ou baixa produção, puras ou cruzadas e isto deve ser levado em consideração nos programas de IATF. Atualmente, isto não tem sido um fator limitante dos programas de IATF, pois existe um dedicado trabalho das empresas fornecedoras dos medicamentos, que contam com profissionais capacitados e são assessoradas por pesquisadores de várias instituições. Entretanto, atribuir o sucesso ou insucesso de um programa de IATF ao emprego do produto A ou B, fabricado pela empresa A, B ou C, que utilizam o protocolo X, Y ou Z, é um exagero. As taxas de prenhez podem variar de 20 a 80%, mas em média, são atingidos resultados da ordem de 50% (MADUREIRA e FILHO, 2012).

Na empresa REPLAN os produtos mais utilizado eram da linha reprodutiva da Tecnopec® (São Paulo – SP) enquanto na universidade era da Ouro Fino® (Ribeirão Preto – SP). Os protocolos utilizados em ambos os locais associavam um implante intravaginal a base de progesterona (P4) e hormônios reprodutivos aplicados por via intramuscular (IM). Os equipamentos para execução das IATF(s) eram o mesmo nos dois locais, contavam com botijão com nitrogênio líquido, luvas descartáveis, aplicador, cortador de palhetas, tesoura, papel toalha ou higiênico, descongelador de sêmen, sêmen, bainhas descartáveis, termômetro, pinça e ficha de anotações.

As 56 vacas inseminadas pela equipe da REPLAN, eram da raça girolando numa propriedade leiteira onde o regime de criação era semi-intensivo. Os protocolos de IATF necessitavam da inserção de um dispositivo intravaginal a base de progesterona (PRIMER®) e da aplicação de 2mL de um hormônio a base de benzoato de estradiol (RIC-BE®) no dia zero (D0) ; no dia oito(D8) realizava 1,5mL de um hormônio a base de D(+) cloprostenol (Prolise®) retirada do implante intravaginal e novamente aplicado 1mL de benzoato de estradiol (RIC-BE®) e a inseminação era realizada no dia dez (D10), conforme figura 4. Todos os procedimentos foram realizados 07h30min horas da manhã:

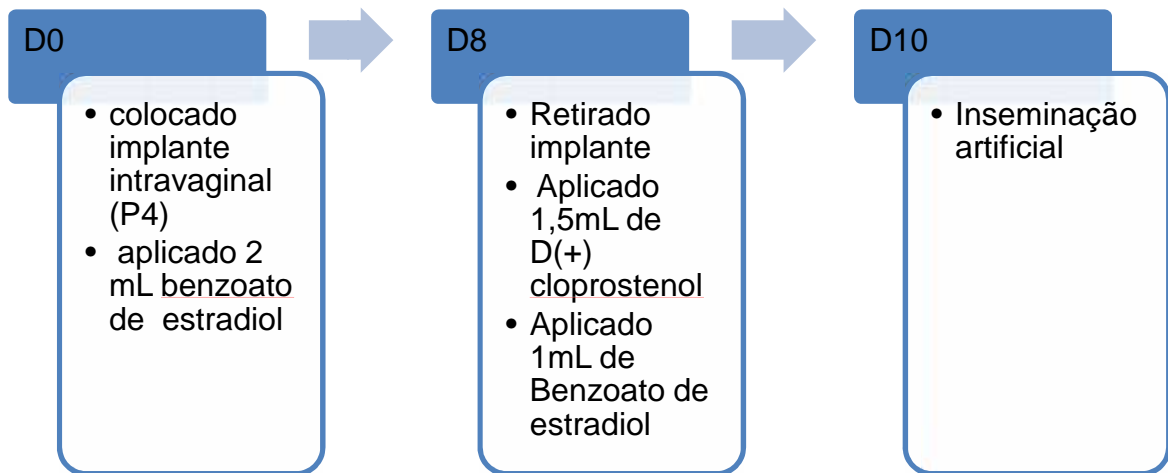


Figura 4: Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) utilizado nas fêmeas bovinas de leite durante o estágio curricular obrigatório realizado na REPLAN.

Na USP os 21 animias inseminados eram da raça holandesa, criados dentro da universidade em regime intesivo ou free stall. O protocolo utilizado foi parecido com da REPLAN, porém foi de 4 manejos. O protocolo de IATF utilizados consistia na aplicação de um dispositivo intravaginal a base de progesterona (SINCROGESTE®) e da aplicação de 2mL de um hormônio a base de benzoato de estradiol (SINCRODIOL®) no dia zero (D0); 2mL de hormônio a base de D(+) cloprostenol (SINCROCIO®) e retirada do implante intravaginal no dia sete (D7); aplicação de 1mL benzoato de estradiol (SINCRODIOL®) no dia oito (D8) e a inseminação era realizada no dia nove (D9), (Figura 5). Todos os medicamentos eram administrados às 08h00min, a inseminação era realizada às 13h00min horas.

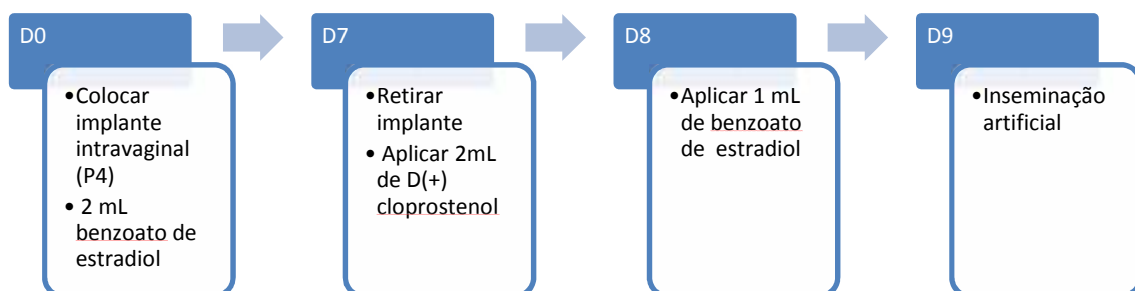


Figura 5: Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) utilizado nas fêmeas bovinas de leite durante o estágio curricular obrigatório realizado na USP – Pirassununga.

A aplicação do BE associado ao implante de P4 no D0 tem por objetivo, regressão de possível CL, regressão de um folículo dominante e reinício de uma nova onda folicular. Altas concentrações de estrógeno e de P4, bloqueiam as gonadotrofinas, principalmente o FSH, levando possíveis folículos dominantes a atresia (GONÇALVES et al.¹, 2008).

A PGF2 é responsável pelo tempo de vida do CL, causando sua regressão morfológica e funcional (KOTWICA, 2002) sendo que a regressão funcional precede a regressão morfológica. As prostaglandinas provocam regressão do CL somente entre o 5º e o 16º dia do ciclo, ou seja, na presença de um CL funcional (GONÇALVES ET al.¹, 2008).

Os estrógenos aplicados no D8 são indutores da ovulação. Existem várias moléculas de estrógenos disponíveis no mercado para utilização em protocolos de sincronização de cio. Os principais são: 17 estradiol, benzoato de estradiol (BE), valerato de estradiol (VE) e o cipionato de estradiol (CE). Cada um deles tem um metabolismo diferente, alterando sua meia vida. Normalmente BE induz a ovulação 24 a 32 horas após sua aplicação (Mapletoft et al., 2008).

Quando a IATF é utilizada adequadamente, aproximadamente 50% das fêmeas sincronizadas emprenham com apenas uma inseminação realizada no período pós-parto. Os animais que não conceberem a essa inseminação podem ser novamente inseminados com o uso da observação estratégica de cios (nos 18 aos 25 dias após o uso da IATF), ou colocados com touros para repasse. Dessa forma, podemos maximizar o número de vacas prenhes no primeiro mês da estação de monta. Também, vale lembrar que as vacas tratadas com progesterona/progestágenos que não se tornaram gestantes após a IATF apresentam maior taxa de serviço (aumenta o número de vacas que manifestam cio) e de prenhez durante a estação de monta, antecipando a concepção e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho (BEEFPOINT, 2006).

Durante o estágio não foi possível a realização diagnóstico de gestação dos animais que foram feito as IATF(s). Assim sendo não tenho possíveis

dados dos índices da taxa de prenhez, para poder comentar a eficácia dos protocolos usados.

3.2 Diagnósticos de gestação por ultrassonografia

A ultrassonografia baseia-se na produção de imagens pelo uso de ondas sonoras de alta frequência. As ondas acústicas do ultrassom são ondas de pressão, produzidas pela compressão e descompressão alternadas das moléculas dos tecidos adjacentes. Estas ondas de pressão são emitidas pela vibração de cristais com propriedades piezoelétricas, presentes no interior do transdutor do aparelho, quando submetidos a correntes elétricas alternadas. Estas ondas têm a propriedade de se propagar pelos tecidos orgânicos. À medida que uma onda atravessa um determinado corpo, parte é refletida na forma de um eco e parte prossegue interagindo com tecidos mais profundos. O reflexo dessas ondas é processado e projetado no monitor do vídeo. A amplitude do ponto na tela é proporcional à distância percorrida, assim, se reproduz uma imagem dos tecidos e órgãos atingidos pelo ultra-som (HAFEZ e HAFEZ, 2004)

Para fins de diagnóstico gestacional, a vesícula embrionária pode ser observada entre dezessete e o dezenove dias após a cópula ou IA, porém não se recomenda realizar o diagnóstico antes do 22º dia de prenhez, pois há presença de líquidos uterinos e o concepto nem sempre é viável (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O diagnóstico de gestação guiado por ultrassonografia é um método que tem excelente acurácia, mas depende do treinamento do manipulador do ultrassom. A acurácia é superior a 95% aos 26 dias após a fertilização e próximo de 100%, depois de 29 dias. O diagnóstico precoce permite que o veterinário proponha um novo programa de sincronização para as fêmeas que não ficaram gestantes (DESCÔTEAUX et al., 2010).

Na REPLAN, foram realizados 72 diagnósticos de gestação de vacas cruzadas que foram utilizadas como receptoras de embriões produzidos *in vitro*

ou in vivo. O veterinário optou pelo diagnóstico em torno dos 45 dias após a inovulação embrionária, pois, afirmava ser mais seguro e obtinha melhor visualização da vesícula embrionária. Contou com auxílio do ultrassom ALOKA – SSD 500, utilizado durante o estágio curricular.

Na USP – Pirassununga foram realizados 130 diagnósticos de gestação entre vacas de leite e corte da universidade o primeiro diagnóstico gestacional era realizado com 30-35 dias após a primeira IA. Com a fêmea devidamente contida no tronco, realizava-se a limpeza do reto, em seguida se introduzia um transdutor linear de 5 cm com frequência de 7.5 MHz no reto. Conforme na figura 6, estava sendo realizado diagnóstico nas vacas com auxílio de ultrassom modelo Mindray 2200 Vet.

A vesícula embrionária pode ser observada entre o 17^o e o 19^o dia após a cópula ou a inseminação artificial e caracteriza-se por uma área não ecogênica e esférica no lúmen uterino, geralmente ipsilateral ao corpo lúteo, próximo à junção útero-tubária. O embrião poderá ser observado a partir do 23^o dia pós-serviço, caracterizando-se como estrutura de ecogenicidade média, no interior da vesícula embrionária, que é anecóica. O primeiro órgão a ser identificado é o coração, caracterizado como estrutura ora não ecogênica, ora com pouca ecogenicidade. O âmnio poderá ser visualizado do 25^o ao 30^o dia de prenhez. Os membros são observados ao 32^o dia; a coluna vertebral ao 40^o dia e os movimentos fetais são percebidos ao 45^o dia. Do 23^o ao 50^o dia, a vesícula embrionária cresce em diâmetro na razão de 1,38mm/dia e o embrião aumenta seu comprimento em 1,15mm/dia. O diagnóstico realizado antes do 22^o dia de prenhez por meio da presença de fluidos uterinos não é seguro, considerando que a observação do concepto nem sempre é viável. Portanto o período mais conveniente e seguro é a partir dos 25 dias pós-serviço (GONÇALVES ET al (c), 2008)..



Figura 6: Diagnóstico de gestação com auxílio de ultrassom modelo Mindray 2200 Vet na USP – Pirassununga.

3.3 Exame ginecológico em bovinos

O exame ginecológico de fêmeas bovinas tem como intuito verificar o estágio do ciclo estral que o animal se encontra, estabelecer a causa da infertilidade do rebanho, dar assistência obstétrica, se necessário, e diagnóstico de distúrbios puerperais (GRUNERT,1993).

Este exame deve ser completo em si, buscando-se entender e conhecer o melhor possível o status reprodutivo do animal, seja simplesmente para identificar sérias patologias reprodutivas, ou reflexos de manejo inadequado nas propriedades que estejam prejudicando a eficiência reprodutiva da fazenda (MARQUES, 2006).

Durante o estágio na USP foram realizados 47 exames ginecológicos em vacas de leite e corte. Antes de iniciar o protocolo hormonal de IATF, os animais eram posicionados em um tronco de contenção e submetidos a uma avaliação ginecológica. Era primeiramente por palpação retal e em seguida por palpação retal guiada por ultrassom. Na palpação retal avaliava-se o tamanho,

posição, consistência do útero, ovário e cérvix. Com ultrassom examinava-se o ovário buscando a presença ou não de folículos, corpo lúteo (CL) e seus tamanhos. Já no útero avaliava-se a espessura das paredes e seu tamanho.

3.4 Tecnologia de embriões

A produção comercial de embriões bovinos *in vitro* no Brasil teve início no ano de 1998 com um projeto de inovação tecnológica financiado parcialmente pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelas Empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões (GALLI, 2003).

Desde a última década, o Brasil se apresenta como líder mundial da tecnologia de produção *in vitro* de embriões, beneficiando diretamente os produtores de leite e carne de diferentes escalas (micro, pequenos, médios e grandes) por meio do incremento do melhoramento genético proporcionado pelo uso do embrião para gerar prenhez. Pelo último levantamento da IETS (2012), o Brasil produziu quase 270.000 embriões *in vitro*, uma porcentagem próxima de 80 % da produção mundial (SENEDA e MARINHO, 2012).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de aspiração folicular; maturação (MIV) e fecundação (FIV) de oócitos; cultivo ou co-cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias (GONÇALVES et al.¹, 2008).

Na REPLAN acompanhou-se a Transferência de embriões em tempo fixo – TETF. Método esse em que se produzem embriões *in vitro* e depois transfere para uma receptora que passou por um protocolo ficando apta a receber o embrião.

3.4.1 Aspiração folicular guiada por ultrassom - *Ovum pick up* (OPU)

A obtenção de oócitos disponíveis para produção *in vitro* de embriões (PIV) ocorre através da técnica de aspiração folicular transvaginal, ou OPU (*ovum pick up*). Há mais de uma década a OPU tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (SENEDA, 2005).

Tendo em vista que as raças zebuínas são em maior quantidade na bovinocultura no Brasil e a necessidade de reprodutores para o melhoramento genético está cada vez maior, a FIV entra como grande tecnologia nesse auxílio. Isso porque ela produz mais de um descendente por doadora (matriz) por ano, aumentando assim o número de reprodutores com qualidade. Pois em relação à variação individual, o aspecto mais interessante refere-se à raça. Animais da raça nelore, ou vacas zebuínas em geral apresentam normalmente um maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas de raças européias. Esta particularidade viabilizou um crescimento bastante rápido da PIV no Brasil, uma vez que a disseminação da PIV e a maior valorização da raça nelore ocorreram de forma simultânea (SENEDA, 2005).

O intervalo entre sessões de OPU influencia tanto na qualidade como na quantidade de oócitos. A OPU deve ser efetuada com intervalo mínimo de 15 dias, preferencialmente 30, permitindo assim que a doadora retorne ao ciclo naturalmente e de forma a não afetar o funcionamento ovariano (SENEDA e Marinho, 2012).

Foi realizada aspiração folicular guiada por ultrassom em 17 vacas, sendo que 9 eram vacas da raça girolando e 8 da raça nelore. A via escolhida para execução da aspiração folicular foi transvaginal guiada por ultrassonografia. O material (figura 7) utilizado para realizar aspiração era bomba de vácuo, agulha de opu, mangueira bomba, cabo bomba, extensão de energia, luvas de palpação, lidocaína (anestésico), seringa 5 ml, agulha para anestésico, papel toalha, ultrassom, transdutor, probe (guia), nobreak, camisinha de opu, tesoura, canetinha de retroprojeter, pano de campo, álcool 70, inversor.



Figura 7: Material utilizado para aspiração folicular na assistência REPLAN.

O conteúdo aspirado era carregado para um tubo Falcon de 50 mL com aproximadamente 5 – 10 mL de PBS com heparina (10 UI/mL ou 1mL heparina/ 1L de PBS) localizado em uma caixa térmica de isopor. Próximo à entrada de ar da bomba coloca-se um filtro ou outro tubo Falcon, para evitar que ocorra refluxo de líquido para o interior da bomba de vácuo. Dentro da guia de aspiração vai um mandril onde é acoplada a agulha. O mandril é conectado à mangueira de silicone, ligada a uma bomba de vácuo. Todo este sistema deve ser fechado para que possa ocorrer a sucção do líquido folicular e do oócito propriamente dito.

Após todo o sistema montado, a guia de aspiração era protegida por uma “camisinha” plástica contendo uma pequena quantia de gel entre a “camisinha” e a ponta do transdutor. Antes de realizar a palpação retal e a introdução da guia de aspiração via transvaginal, realiza-se anestesia epidural com 4mL de lidocaína 2%.

Quando estava preparado, o sistema de aspiração completo e a epidural já feita, realiza-se a limpeza do reto, lavagem do excesso de fezes e limpeza da vulva com papel toalha. Após essa etapa de limpeza, uma mão via retal localiza e apóia o ovário sobre a guia de aspiração, o ovário bem posicionado e fixo, inicia-se a aspiração propriamente dita (figura 8). Ao ligar a bomba de vácuo, esta não poderia ser desligada até o término da aspiração dos dois ovários.



Figura 8: Aspiração folicular sendo realizada pelo Amauri Tomazinho.

Após a aspiração, os tubos eram devidamente identificados e levados ao laboratório móvel localizado próximo ao local de aspiração. O laboratório era montado em uma área limpa para a seleção. No laboratório realizam-se a seleção dos oócitos, contagem e lavagem para posterior armazenamento em criotubos e transporte até o laboratório onde será realizado a FIV. A média encontrada foi de 17 oócitos por vaca.

Após a colheita dos oócitos, seleção e lavagem (figura 9), estes eram depositados em Solução TCM-199® com sais de EARLE. Sofrendo algumas modificações com a adição de L- glutamato, bicarbonato de sódio, HEPES e piruvato de sódio mas não é divulgado é divulgada pela empresa In Vitro Brasil.

. Classificação dos oócito é uma adaptação da proposição de Leibfried e First, classificação com escala de 1 a 4, considerando as características do *cumulus* (cobertura do oócito) e do citoplasma do oócito (ooplasma) (GONÇALVES et al.¹, 2008).



Figura 9: Avaliação e seleção de oócitos a campo, realizado durante o estágio na REPLAN.

Oócito qualidade 1 ou grau 1: cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Oócito qualidade 2 ou grau 2: cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando-o por completo, com menos de três camadas celulares. O ooplasma com granulações distribuídas de modo heterogêneo, podendo estar mais concentrada no centro e mais claras na periferia, ou condensadas em um só local, aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida.

Oócito qualidade 3 ou grau 3: cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído, degenerado, vacuolado, ou fragmentado, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelínico.

Oócito qualidade 4 ou grau 4: oócito desnudo sem cumulus.

Sendo que na rotina do laboratório os oócitos eram classificados apenas em grau 1, 2 e 3. Após a classificação os oócitos eram transferidos para uma placa de Petri de 35mm de diâmetro contendo meio de lavagem TCM 199[®] HEPES. Após essa lavagem e seleção, os oócitos eram transferidos para outra placa com meio de maturação. O tempo médio de transporte varia de acordo com a distância das fazendas até o laboratório, mas ideal é não deixar passar de oito horas após o início da aspiração.

3.4.2 Produção in vitro de embriões

In vivo, o espermatozóide percorre um longo trajeto para chegar ao infundíbulo e fecundar o oócito. Durante esse percurso, glicosaminoglicanas presentes no trato genital feminino induzem sua capacitação. Para fertilização in vitro, a capacitação espermática é, geralmente, promovida pela heparina. Antes do processo de capacitação, os espermatozoides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e células mortas. Para bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de percoll e o swim-up. O co-cultivo de espermatozoides e oócitos é realizado por um período de 18-22h, a 39°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O sistema de fertilização in vitro tenta mimetizar as condições in vivo (Gonçalves et al.¹, 2008).

Na separação espermática com o Percoll[®], o sêmen é centrifugado pela passagem por diferentes gradientes para permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen, com base na diferença de densidade (GONÇALVES et al.², 2008).

Montagem do gradiente de Percoll[®]: em um tubo contendo 1mL de Percoll[®] 45%, anteriormente preparado, adicionar lentamente 1mL de Percoll[®] 90% no fundo do tubo, ou seja, por baixo do Percoll[®] 45%. Após preparação do gradiente, descongela-se a palheta de sêmen em água aquecida 35°C por 30 segundos, em seguida deposita-se o sêmen descongelado no microtubo contendo o gradiente e realizam-se duas centrifugações, retira-se o

sobrenadante e em seguida inicia-se a segunda centrifugação. Forma-se um halo esbranquiçado na ponta do tubo, retira-se todo o conteúdo acima do halo branco e adiciona-se o TL-Sêmen, na proporção de 1 μ L (micro litro) de sêmen para 9 μ L de TL-Sêmen. Esse método é utilizado com sêmen sexado, deste modo não se avalia a concentração nem a motilidade espermática, devido ao sêmen total estar com no máximo 2.000.000 de espermatozóides entre vivos e mortos (MANUAL PIV, 2006).

Antes de iniciar a fecundação, devem-se preparar as placas para FIV, o oócito deve passar por três banhos, antes de ir para a gota onde irá ocorrer a fecundação. O primeiro banho contém meio TL-Stock, o segundo banho meio TL-Stock + TL-Sêmen e o terceiro e último meio FIV- gota. Ao final desses três banhos o oócito vai finalmente para a placa de FIV, onde serão dispostos no máximo 25 oócitos por gota (MANUAL PIV, 2006). Com os oócitos dispostos na placa FIV, adiciona-se agora os espermatozóides e a placa vai para a estufa, afim de que possa ocorrer fecundação.

A fusão do oócito com espermatozóide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o segmento equatorial do espermatozóide e a membrana plasmática do oócito. A membrana vitelina (membrana plasmática do oócito) participa ativamente desse processo e, assim, o espermatozóide é incorporado pelo ooplasma. Com a penetração do espermatozóide, dois fenômenos ocorrem de modo simultâneo, a inclusão da carga genética paterna com o restabelecimento do número diplóide de cromossomos (2n) e a ativação do oócito, necessária para o bloqueio da polispermia e o início das divisões (GONÇALVES et al.², 2008).

Após 18-20 horas do início da fecundação, transfere-se o meio de maturação para um microtubo de 1,5 mL, 150 μ L de meio FIV. Realiza-se o vortex (pipetagens sucessivas) do tubo para a remoção das células do *cumulus*, de forma parcial, 1 minuto, ou total, 2 minutos. O desnudamento parcial ou total é realizado respectivamente quando do uso ou não do soro fetal bovino (SFB) no meio de desenvolvimento (MANUAL PIV, 2006).

Após a retirada do *cumulus*, os zigotos são lavados em placa contendo 3mL de SOF com 10% de soro, ou 4 mg de BSA/mL, ou 1mg de PVA/mL de meio e, posteriormente, transferido para uma gota em meio SOF, os zigotos

são cultivados em grupos de 20 a 40, nas gotas 3 e 4 da placa de cultivo. A partir desse momento, as placas com zigotos são colocadas em cultivo em uma estufa a 39°C com atmosfera contendo uma mistura gasosa de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ (Figura 10). No cultivo embrionário, é necessário o uso de meio simples que suporte a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. A composição do meio é baseada nos fluidos do útero e do oviduto é composto durante o início da gestação. O fluido do oviduto é composto por secreções das células epiteliais, a partir da difusão de nutrientes do plasma. O potássio e o cloro estão presentes no fluido de oviduto em concentrações mais elevadas do que as do plasma, ao passo que o nível de cálcio é mais baixo e os de sódio e magnésio são similares ao do soro. Tem sido mostrado também que o piruvato é um componente essencial para clivagem e o desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al.², 2008).



Figura 10: Incubadoras com embriões produzidos durante o estágio na REPLAN.

3.4.3 Inovulação de embriões

Sete dias após o cio das receptoras, os embriões foram transferidos (inovulados). Previamente a inovulação, as receptoras foram palpadas para

detectar a presença de um corpo lúteo (CL) em um dos dois ovários. Após detectar a presença e o lado (ovário esquerdo ou direito) no qual o CL se encontra, a receptora recebia uma anestesia peridural (4mL lidocaína 2%) e o embrião era transferido para o corno ipsilateral ao CL. Esta técnica é referida como transferência embrionária transcervical. Foram transferidos 50 embriões sendo 30 da raça girolando e 20 da raça nelore.

Os embriões eram selecionados e envasados nas palhetas na madrugada do dia que fossem ser transferidos para as receptoras. Eram classificados em embriões 1 que eram ótimos e 2 que eram razoáveis (figura 11). Sendo transportados dentro de caixas térmicas, pois não pode receber luz nem ter interferência térmica. No momento da inovulação a palheta era colocada em uma bainha estéril e em seguida no inovulador. Para manter a bainha do inovulador livre de contaminação era usada a camisinha sanitária.



Figura 11: Realizando seleção dos embriões durante estágio da REPLAN.

Na data da transferência as receptoras estavam sincronizadas (figura 12) com os embriões, ou seja, já estavam aptas a manter o embrião. Para melhores resultados era usado nestes animais um protocolo hormonal semelhante ao de IATF. Porém é utilizado o hormônio eCG (NOVORMON®), que é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices

endometriais da égua prenhe (40 a 130 dias), que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo (Stewart e Allen, 1981). Aplicações intramusculares de eCG estimulam o crescimento de folículos adicionais, os quais ovulam espontaneamente sem a necessidade de LH ou hCH exógeno em vacas (JAINUDEEN et al., 2004). Formando corpos lúteos acessórios, assim as receptoras tinham mais chances de manter a gestação.

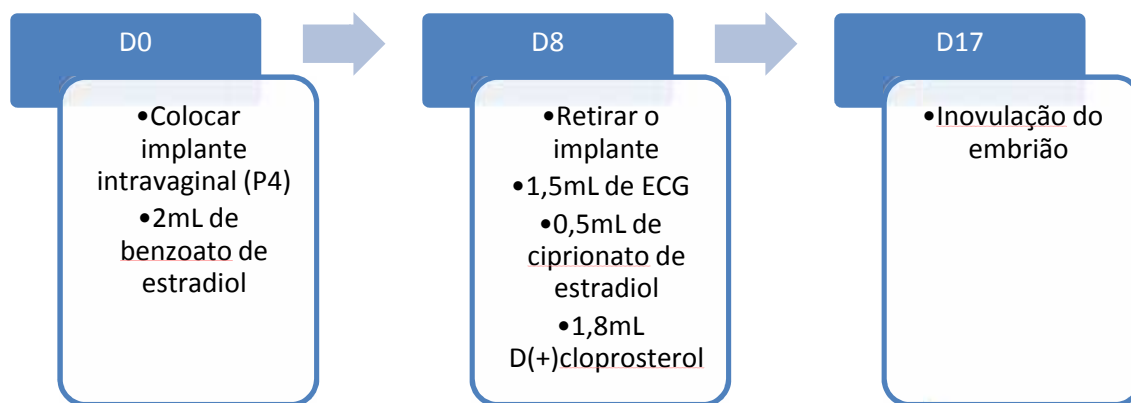


Figura 12: Protocolo realizado nas receptoras de embrião, utilizados durante o estágio na REPLAN.

Antes de iniciar um protocolo era feito uma seleção das receptoras. Esse rebanho normalmente eram vacas cruzadas ou mestiças em bom estado corporal, com histórico de boa habilidade materna e com boa aptidão de leite para os bezerros.

3.5 Exame andrológico

A capacidade reprodutiva de touros depende de vários fatores tais como; adequado manejo reprodutivo e nutricional, idade, condições climáticas e/ou sanidade, que podem influenciar na qualidade do sêmen refletindo positiva ou negativamente em seu potencial reprodutivo. Portanto, a seleção de reprodutores por meio do exame andrológico tem por finalidade fornecer animais com boa aptidão reprodutiva assim, o touro contribuirá para a melhoria

da fertilidade e conseqüentemente aumento da lucratividade do rebanho (FONSECA et al., 1997).

O exame andrológico completo fundamenta-se na avaliação de todos os fatores que contribuem para a função reprodutiva normal do touro. Esse exame é indicado para situações como avaliação do reprodutor antes da estação de monta, nas relações de comercialização de reprodutores, na ocorrência de falhas reprodutivas no rebanho, para determinação da ocorrência da puberdade, para o diagnóstico de problemas de fertilidade e para o ingresso nas centrais de inseminação com vistas à congelação de sêmen (BARBOSA et al., 2005).

Em ambos os estágios foram realizados o exame andrológico em touros da raça nelore, para que pudessem entrar na estação de monta com a fertilidade aprovada. Na USP foram realizados 12 exames e na REPLAN 29, totalizando 41 touros, que com os resultados dos exames estavam aptos para entrar na reprodução. Todos os animais eram criados somente a pasto, com suplementação de sal mineral.

O touro entrava no tronco de contenção e era avaliado primeiramente o escroto (figura 13), quanto sua sensibilidade, mobilidade, temperatura e espessura da pele. Os testículos quanto à presença, forma, simetria, mobilidade, consistência e sensibilidade, devendo-se realizar a biometria, a qual varia de acordo com a idade. A circunferência escrotal pode ser usada como medida preditiva do potencial de produção espermática, especialmente se tomada em touros jovens (BARBOSA et al, 2005). Os epidídimos de modo geral, os itens para avaliação são os mesmo para exames testicular, resguardado os aspectos de forma, tamanho e posição. Nos cordões espermáticos examina se tem encurtamento e aumento de volume, que pode indicar a existência de cistos, varicocele ou processos inflamatórios (MANUAL CBRA, 1998).

No prepúcio realizava-se tricotomia, limpeza com papel toalha para não alterar o resultado do ejaculado e depois examinava se estavam livres de aumentos de volume, prolapsos, abscessos, hematomas ou cicatrizes. Na USP ainda era realizado a palpação retal para avaliação das glândulas sexuais



Figura 13: Avaliação dos testículos pelo médico veterinário Amauri Tomazinho, durante o estágio na REPLAN.

O método de eletroejaculação foi utilizado nos dois estágios e quase sempre fornece um ejaculado de boa qualidade. Porém menos concentrado que a vagina artificial. Isso se deve ao estímulo de uma corrente elétrica alternada sobre as glândulas vesiculares, que respondem liberando uma quantidade maior de fluídos.

Depois da introdução do eletrodo no ânus do touro, eram promovidas excitações rápidas com duração de 3 a 5 segundos através de estímulos elétricos. A intensidade e o tempo de aplicação da corrente são aumentados gradativamente até que o animal ejacule. O sêmen era colhido através de um tubo coletor graduado, acoplado a um cone de látex, sendo que esse cone é fixado através em uma estrutura que possui um cabo que é manipulado pelo operador que estiver colhendo o sêmen. Conforme ilustra a figura 14.



Figura 14: Coleta de sêmen por eletroejaculação em bovinos no estágio da REPLAN.

Após coletado o sêmen, colocava-se uma gota de sêmen em uma lâmina aquecida a 37°C e era levado ao microscópio (figura 15) sobre uma placa aquecida. Era imediatamente feito a campo os exames de turbilhonamento, vigor, motilidade e aspecto. A concentração não pode ser realizada devido ao método de coleta do sêmen, onde ela sofre grande influência em comparação com a vagina artificial.

Turbilhonamento é o movimento em formas de ondas observado em uma gota de sêmen. É examinado em microscópio com objetiva de 10 a 20x e utilizava-se uma classificação de 0 a 5, onde 0 era ausência de turbilhonamento e 5 o valor máximo dado a um movimento de massa. Motilidade é também assim como turbilhonamento uma avaliação subjetiva, devendo expressar o percentual total dos espermatozoides móveis. Com microscópio com objetiva de 10 a 40x é examinado a motilidade. Vigor representa a intensidade com que os esperamatozóides se movimentam. Era classificado de 0 a 5 onde onde 0 é ausência de movimento progressivo com deslocamento de cauda fraco e inexpressivo e 5 é o vigor máximo. A avaliação

de aspecto depende da concentração de espermatozoides, mas geralmente ela é esbranquiçada, branca, marfim ou amarelada. (PALHANO, 2008).

Os dos padrões seminais desejáveis para efeito de seleção de touros para monta natural são de turbilhonamento no mínimo igual a 3, motilidade igual ou maior que 70% e vigor de no mínimo 3 (MANUAL CBRA, 1998).



Figura 15: Exame andrológico a campo, realizado durante o estágio na REPLAN.

O propósito da avaliação da morfologia espermática é determinar a presença e incidências de formas anormais para diagnosticar os diferentes quadros clínicos reprodutivos de animais normais, subférteis e inférteis (PALHANO, 2008).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozoides são utilizados dois métodos: lâminas coradas feitas através de esfregaço, onde as colorações mais utilizadas são as de Cerovsky e de Williams, e as lâminas úmidas, sendo que para esse último método é necessário microscopia de contraste de fase ou de interferência (FONSECA et al.,1992).

As anormalidades morfológicas são classificadas com base na importância dos defeitos e seus efeitos na fertilidade, em: defeitos maiores e defeitos menores. São considerados defeitos maiores: Defeitos de acrossoma;

Gota citoplasmática proximal; Subdesenvolvido, Defeitos de peça intermediária, Cauda fortemente enrolada/enrolada; Estreito na base; Cauda enrolada na cabeça; Piriforme; Cabeça pequena anormal; Ulceração de cabeça; Pouch formation; Formas teratológicas; Corkscrew defect (peça intermediária em forma de saca-rolha); Pseudogota. Os defeitos menores são: Acrossoma destacado; Gota citoplasmática distal; Cabeça delgada; Cabeça pequena normal; Cabeça gigante, curta e larga; Cabeça isolada normal; Peça intermediária com implantação abaxial, retroaxial e oblíqua; Cauda dobrada (inclusive com gota anexa); Cauda enrolada (PALHANO, 2008)

Na interpretação da morfologia espermática, considerar para defeitos maiores os limites de 5% e 20% para os individuais e para os totais, respectivamente, e para os defeitos menores, 10% e 25%, para individuais e totais, respectivamente. Para o total de defeitos, ou seja a soma de defeitos maiores e de defeitos menores, o limite é de 30%. A presença de medusas, células primordiais, células gigantes, leucócitos, hemácias ou células epiteliais devem ser consideradas na interpretação (BARBOSA et al., 2005).

Para realizar exames das características morfológicas ou patologias dos espermatozoides, era guardada uma amostra do ejaculado dentro de um eppendorf com número ou nome do touro para identificação. Na REPLAN era examinado no laboratório da empresa e na USP no departamento de reprodução animal (VRA). Seguem uma classificação em defeitos maiores e menores dos espermatozoides. Para este exame era preparado um esfregaço o qual era corado e avaliado em microscopia óptica, sob imersão, com aumento de 1.000 vezes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular obrigatório é uma experiência muito importante para o acadêmico pelo fato de se poder vivenciar o que foi aprendido durante o período de faculdade.

Na REPLAN além do aprendizado na prática veterinária também se tem a experiência de lidar com vários tipos de produtores, pois cada um tem uma personalidade diferente e, portanto, uma maneira diferente de abordagem e atendimento. E o estágio supervisionado realizado na USP foi de grande valia para a minha formação acadêmica, principalmente no tocante ao acesso às tecnologias e atualizações de conhecimento a respeito da reprodução e do contato com os orientadores e os pós-graduandos envolvidos em pesquisas. Em relação ao acesso às tecnologias, a instituição escolhida, possuía infraestrutura completa para a realização dos trabalhos de pesquisa e o mais importante, além do acesso a estas tecnologias, era ofertada a oportunidade de praticá-las. Na REPLAN já era mais difícil de se praticar, pois os procedimentos eram feitos com mais rapidez.

Entre as diferenças de se fazer estágio em uma assistência e depois na universidade, mostrou também a necessidade de estar sempre se atualizando e buscando novas informações, não apenas sobre reprodução, mas do conhecimento veterinário em geral, visto que o mercado está cada vez mais exigente e as inovações surgindo a cada dia.

Somente após um bom estágio curricular o aluno de graduação terá uma base sobre a realidade do trabalho profissional e saberá, assim, como melhor se adaptar às exigências do mercado de trabalho.

5 SUGESTÕES

A rotina prática referente à estação de monta encontrava-se bem diminuída. Portanto, seria interessante que o período de estágio fosse maior, principalmente para alunos que se interessam pela área de reprodução animal. Dessa forma, os acadêmicos poderiam acompanhar as atividades relacionadas à reprodução animal independente da época ano, visto que há variação do período de estação de monta nas diversas propriedades e instituições concedentes de estágio.

REFERÊNCIAS

BARBOSA R. T. ; MACHADO R.; BERGAMASCHI M. A. C. M. **Importância do exame andrológico em bovinos.** 2005. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/47256/1/Circular41.pdf> > . Acesso: 27/01/2013

BEEFPOINT – O ponto de encontro da cadeia produtiva de carne, 2012. Disponível em: < <http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/ibge-rebanho-bovino-cresceu-16-em-2011-atingindo-213-milhoes-de-animais/> > . Acesso em: 09/01/2013

BEEFPOINT – O ponto de encontro da cadeia produtiva de carne, 2006. Disponível em: < <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/impacto-de-diferentes-tipos-de-manejo-na-eficiencia-reprodutiva-durante-a-estacao-de-monta-28518/> > . Acesso em: 01/02/2013

DERIVEAUX, J. **Fisiopatologia de la reproduction y insemination artificial de los animales domesticos.** Zaragoza, Acriba, 1967. p.416

DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, G. Principles and recommendations in ultrasound imaging. In: **Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography.** Blackwell: Willey. 1ªEd, 2010. p.23.

FONSECA, V.O.; FRANCO, C.S.; BERGMANN, J.A.G. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (Bos taurus indicus) acasalados com elevado número de vacas. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, 1997, v.49,. p.53-62.

FONSECA, V. O. ; V.R.VALLE FILHO ; A. MIES FILHO ; J.J.ABREU . **Procedimento para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal.** Nobel, 1992.

GALLI,C., DUCHI, R., CROTII, G. Et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**. 2003, v.59, p.600.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.¹ **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** MORAES, J. C. F., SOUZA, C. J. H.,

GONÇALVES, P. B. D., FREITAS, V. J. F., JÚNIOR, E. S. L., Controle do Estro e da Ovulação em Ruminantes. Cap. 3 p. 33-56, 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. P. 395

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.² **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, M. A. L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M. M., VISINTIN, J. A., COSTA, L. F. S. Produção In Vitro de Embriões. Cap. 14, p. 261-291, 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. P. 395

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.³ **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. NEVES J.P.; OLIVEIRA J.F.C.; FREITAS V.J.F.; SIMPLÍCIO A.A.; TEIXEIRA D.Í.A.; ALMEIDA J.L. Diagnóstico de Prenhez em Ruminantes. Cap. 2, p.24 , 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. P. 24

GRUNERT, E. Sistema Genital Feminino.In: DIRKSEN, G.; GRUNDER, D.; STOBER, M, ROSENBERGER. **Exame Clínico dos bovinos**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1993. p. 270

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, 2004. 513 p.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004. p.410.

KOTWICA, J., BOGACKI, M., REKAWIECKI, R. Neural regulation of the bovine corpus luteum. **Dom Ani Endocrinol**. 2002,v.5341, p10.

MADUREIRA E. H.; FILHO M. M. Avanços tecnológicos no emprego de fármacos para controle da reprodução de fêmeas bovinas destinadas à IATF. In: 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada , p. 93-108, 2012, Londrina. **Anais**. Londrina,2012

MADUREIRA E. H.; PIMENTEL J.R.V. IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. p. 1-8, 2005, Goiânia. **Anais**. Goiânia, 2005

MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA)**. 2ªed, 1ª reimpressão. Belo Horizonte, 1998.

MANUAL PIV, RESENDE V. M., **Manual de Procedimentos para a Produção in vitro (PIV) de Embriões Bovinos**. Última revisão: 31/08/2006, FCAV – UNESP, Jaboticabal.

MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; ADAMS, G.P. Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. In III Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2008, Londrina. **Anais**. Londrina:2008. p.15-25.

MARQUES, D. C. Criação de bovinos. 7ed. Belo Horizonte: CVP – **Consultoria Veterinária e Publicações**, 2006. p.261-267

PALHANO H. C. **Reprodução em Bovinos**. 2. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2008. P. 171.

RIBEIRO, P. H. P. R., COSTA FILHO, L. C. C.; RODRIGUES, L. A.; ALVES, L. G. C.; SILVA, A. S.; NOGUEIRA, E. Efeitos de diferentes indutores de crescimento folicular na taxa de prenhes de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Maringá, 2009.

SENEDA M. M. e MARINHO . L. S.R. Fatores que interferem na população folicular e produção de oócitos em bovinos. In: 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada , p. 185-187, 2012, Londrina. **Anais**. Londrina, 2012.

SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção in vivo de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1981 v. 62, p. 527-36.