

• Técnicas de reprodução assistida em pequenos animais

• *Assisted reproductive techniques in small animals*

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária,
Distrito de Rubião Júnior, s/nº
CEP 18.618-000 – Botucatu – SP.
End. Eletrôn.: rarv@fmv.unesp.br

Maria Denise Lopes – CRMV-SP - nº 2519

Professora Assistente Doutora da Disciplina de Fisiopatologia da Reprodução – FMVZ – UNESP/ Botucatu.

RESUMO

O objetivo desta discussão é discorrer sobre algumas técnicas reprodutivas utilizadas nos animais domésticos e o impacto desta tecnologia sobre a reprodução dos cães e gatos.

Palavras-chave: espermatozóide, oócito, fertilização, técnicas reprodutivas, cão, gato.

Introdução

A reprodução de pequenos animais está se tornando, cada vez mais, um ramo importante dentro da Clínica Veterinária. Proprietários de cães e gatos têm investido cada vez mais tempo e dinheiro na criação de seus animais; a genética desses animais não é importante apenas para os proprietários e criadores, mas também para a criação em si. Entretanto, em virtude de a série de razões, toda a tecnologia de reprodução assistida disponível para outras espécies animais é ainda muito limitada para a criação dos cães.

O objetivo dessa revisão não é discutir sobre os méritos genéticos da criação dos cães e gatos, nem sobre as deficiências e dificuldades na utilização de metodologias reprodutivas nos pequenos animais, mas, sim, discorrer sobre algumas técnicas utilizadas em outras espécies e qual o impacto delas na reprodução dos cães e gatos.

O máximo da tecnologia reprodutiva disponível atualmente é utilizado na Medicina Humana e poderia servir de modelo para nossa revisão. São 04 (quatro) as áreas de discussão: células espermáticas, oócitos, fertilização e técnicas complementares.

1. Células espermáticas

1.a Inseminação Artificial (I A)

A inseminação artificial nos cães pode ser definida como a deposição no interior do trato genital das fêmeas, no momento correto do ciclo estral, dos espermatozoides coletados, com a finalidade de produzir uma gestação. Em alguns casos, essa técnica pode ser combinada com a separação das células espermáticas por um gradiente de densidade (GOODROWE *et al.*, 1988; FAYRER-HOSKEN, 1997).

A remoção das células espermáticas do fluido seminal é necessária antes de procedimentos de reprodução assistida, como a inseminação artificial e a fertilização “in vitro”. A centrifugação dos espermatozoides separa as células espermáticas móveis das não móveis, dos espermatozoides mortos, dos debris celulares, de prostaglandina, e de outros microrganismos; inicia a capacitação e concentra os espermatozoides móveis em um pequeno volume de meio, facilitando a inseminação (CENTOLA *et al.*, 1998). Os espermatozoides são caracterizados por uma grande heterogenicidade morfológica e as células mortas ou anormais podem exercer efeitos preju-

diciais sobre as células normais, reduzindo a fertilidade (YAMADA *et al.*, 1992; CENTOLA *et al.*, 1998).

Os métodos de seleção espermática para programas de reprodução assistida são direcionados para separar os espermatozoides do líquido seminal e de outros componentes celulares do sêmen e para concentrar uma população de células espermáticas com melhor padrão de motilidade (CENTOLA *et al.*, 1998).

A seleção espermática pode ser realizada pelas seguintes metodologias:

- Centrifugações seguidas;
- Coluna de “sephadex”;
- “Swim-up”;
- “Swim-down”;
- Gradientes contínuos e descontínuos.

Certos métodos, particularmente as lavagens e centrifugações, podem resultar direta ou indiretamente em alterações irreversíveis para a célula espermática, diminuindo sua habilidade fertilizante (YAMADA *et al.*, 1992; CENTOLA *et al.*, 1998).

A separação espermática com o uso de gradientes de densidade tem sido padrão para a utilização nas técnicas de reprodução assistida. Amostras de sêmen fresco são centrifugadas com polivinil-pirrolidona com sílica coloidal (Percoll), com gradientes variados de 40/90%, com alta taxa de recuperação espermática. O método ideal de seleção espermática é aquele que permite a separação de um alto número de espermatozoides competentes e funcionais capazes de fertilizar os ovócitos (YAMADA *et al.*, 1992).

1.b Congelação de sêmen

As técnicas de congelação de sêmen utilizadas hoje nos cães são provenientes de estudos realizados na espécie bovina. A viabilidade do sêmen canino pós-descongelação é muito baixa, quando comparada com outras espécies, e esse é, sem dúvida, um dos principais motivos da dificuldade de difusão dessa tecnologia.

Outro entrave importante na inseminação artificial com sêmen congelado nos cães, é o local de deposição do sêmen no trato genital das fêmeas; em virtude da baixa viabilidade pós-descongelação, o sêmen deveria ser depositado numa região próxima ao local de fertilização – região istmo-ampolar – uma prática difícil devida às dificuldades de transposição da cérvix nas cadelas.

A melhor forma de se avaliar a técnica de congelação de sêmen é, sem dúvida nenhuma, pelos resulta-

dos de gestação; mas em razão da dificuldade dos testes “in vivo”, avaliações “in vitro” são normalmente utilizadas para comprovar a capacidade fertilizante do sêmen congelado; testes de motilidade, vigor, morfologia espermática, sondas fluorescentes para avaliação da integridade das membranas espermáticas, teste de penetração de espermatozoides em ovócitos de espécies homólogas têm sido realizado nos cães, como forma de avaliar a capacidade funcional do sêmen congelado (HAY, 1997).

O tempo de I.A. nos cães é crítico, particularmente quando se utiliza o sêmen congelado, que apresenta uma longevidade diminuída.

Outro problema relacionado à congelação de sêmen nos cães é a porcentagem do glicerol utilizado nos diluentes; uma concentração ótima de glicerol representa um compromisso entre os efeitos tóxicos e protetores, e o uso de agentes crioprotetores são indispensáveis para prevenir injúrias durante a congelação. O estresse osmótico causado pela adição do glicerol pode resultar em alterações nas células espermáticas não identificáveis por procedimentos laboratoriais comumente empregados; edema e ruptura de estruturas altamente específicas contidas na cabeça do espermatozoide podem estar associados com a reorganização de moléculas essenciais à interação espermatozoide/ovócito (FAYRER-HOSKEN, 1997; HAY, 1997; FARSTAD, 2000).

1.c Análise computadorizada do sêmen (CASA)

A avaliação de sêmen padronizada e objetiva tem sido a meta da análise convencional dos espermatozoides. A análise computadorizada de sêmen digitaliza a célula espermática e utiliza um grande número de imagens para caracterizar a qualidade do movimento da célula espermática (Figura 1) (FAYRER-HOSKEN, 1997).

Enquanto a análise computadorizada do sêmen poderia ser a solução, o custo dessa avaliação é muito alto, limitando essa prática.

1.d Citometria de fluxo

O uso da citometria de fluxo, para avaliar a viabilidade espermática e as condições do acrossomo de espermatozoide de cães, pode facilitar o desenvolvimento de novos protocolos de criopreservação, permitindo uma comparação segura entre diferentes métodos de congelação (FARSTAD, 2000).

A citometria de fluxo fornece uma avaliação mais efetiva da células espermáticas do que as análises convencionais.

1.e Sexagem espermática

A separação espermática por meio de citometria de fluxo para a pré-seleção de sexo, baseado no conteúdo diferencial de DNA dos cromossomos X e Y, foi primeiramente desenvolvida para aplicação nos animais. Atualmente, essa técnica é mais utilizada na reprodução humana, na prevenção de desordens recessivas ligadas ao cromossoma X carregado pela mãe. Especificamente, uma gama de cromossomas, ligados à célula espermática, poderia produzir fêmeas sem expressar essa condição genética (FAYRER-HOSKEN, 1997).

1.f Interação espermatozóide / oócito

A célula espermática requer proteínas receptoras intactas para contactar e penetrar os oócitos. Métodos de penetração “in vitro” têm sido desenvolvidos para avaliar cada uma dessas fases: ligação com a zona pelúcida, reação do acrossoma e ligação à membrana plasmática do oócito. A fertilização “in vitro” utilizando oócitos homólogos permite as mesmas análises com informações adicionais sobre a ligação da célula espermática com a membrana plasmática do oócito e penetração do oócito (FAYRER-HOSKEN, 1997; ROTA *et al.*, 1999; FARSTAD, 2000).

Testes de penetração “in vitro”, utilizando oócitos de hamster “zona free”, avaliam a capacidade dos espermatozoides de sofrer a reação do acrossomo. Embora este teste não avalie a habilidade de as células espermáticas ligarem-se e penetrarem a zona pelúcida, ele avalia a capacidade das células espermáticas de penetrarem o oócito, além de oferecer a vantagem de avaliar a capacidade funcional de mais células, pois vários espermatozoides podem penetrar um único oócito (GOODROWE *et al.*, 1991; HAY, 1997).



Figura 1. Aparelho utilizado na análise computadorizada do sêmen (CASA), no Laboratório de Reprodução Animal da FMVZ - UNESP - Botucatu.

2. Oócitos

2.1. Recuperação de oócitos

O ovócito canino é liberado no estado dictiado, ou seja, a vesícula germinativa permanece intacta e o primeiro corpúsculo polar ainda não foi liberado.

Essa estratégia reprodutiva é rara e também acontece nos coiotes e nas raposas; em virtude dessa particularidade fisiológica, as melhores condições para a maturação “in vitro” de oócitos de cães podem diferir de outros modelos experimentais que liberam oócitos durante o processo de ovulação, no estágio de metáfase II da 1ª divisão da meiose (FAYRER-HOSKEN, 1997; FARSTAD, 2000).

Procedimentos de laparoscopia têm permitido a obtenção de oócitos para fertilização “in vitro”. Essa técnica, para ter sucesso, requer insuflação abdominal que, por sua vez, requer anestesia, o que torna o processo mais complexo e caro (FAYRER-HOSKEN, 1997).

A recuperação de oócito guiado por ultra-som é um método efetivo para coleta de oócitos de vários estágios de desenvolvimento. Essa técnica é menos invasiva e, com uma “probe” de alta resolução, pode ser mais segura que a própria laparoscopia. Essa técnica tem sido adaptada das técnicas de biopsias e tem se tornado parte

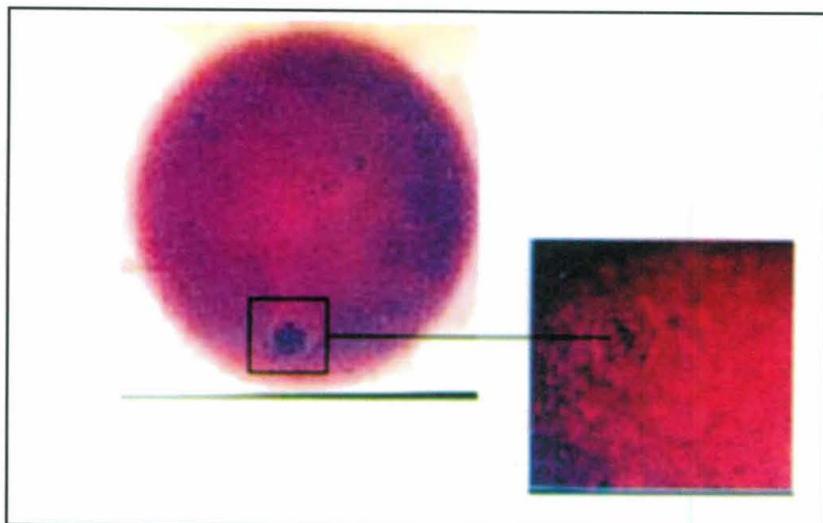


Figura 2. Oócito de gata maturado "in vitro". Detalhe da configuração cromossômica compatível com metáfase II.

integral de muitos procedimentos diagnósticos. Após a recuperação dos oócitos e para o sucesso da fertilização "in vitro", os oócitos precisam ser adequadamente maturados (FAYRER-HOSKEN, 1997; FARSTAD, 2000).

2.2. Maturação de oócitos "in vitro"

Folículos primordiais constituem um estoque de células germinativas no ovário pós-natal e seu número varia com a espécie e com a idade. Os fatores responsáveis pelo início do crescimento folicular são ainda pouco conhecidos e representam uma das questões mais intrigantes da biologia ovariana (GOODROWE *et al.*, 1988; GOODROWE *et al.*, 1991).

Os folículos na fase pré-antral são incapazes de reiniciar a meiose, mas é durante esse período



Figura 3. Ovários de gata estimulados "in vivo"

que sintetizam moléculas essenciais para esse reinício. Nesse momento, os folículos atingem o estágio antral e, nessa fase, a maioria das espécies tem adquirido a habilidade de reassumir a maturação nuclear; portanto, a capacidade dos oócitos para completar todos os estágios de desenvolvimento é diretamente relacionada ao tamanho folicular e, conseqüentemente ao tamanho do oócito (Figura 2) (FAYRER-HOSKEN, 1997).

Oócitos de folículos pré-antrais que completam a maturação nuclear, evidenciada pela configuração cromossômica e emissão do 1º corpúsculo polar, freqüentemente têm baixa taxa de fertilização e raramente formam blastocistos, enquanto

que uma taxa de fertilização maior é conseguida com oócitos obtidos de folículos antrais (GOODROWE *et al.*, 1988; GOODROWE *et al.*, 1991).

3. Fertilização

3.1. Fertilização "in vitro" (FIV)

Desde o nascimento da menina Louise Brown em 25 de julho de 1978, a fertilização "in vitro" tornou-se o carro-chefe das pesquisas mundiais sobre o assunto. A FIV está relacionada à máxima capacidade dos espermatozoides e dos oócitos maduros que, sob ótimas condições, resultam em altas taxas de fertilização.

A FIV é indicada nos casos de ambiente uterino alterado, capacitação espermática inadequada, obstrução de oviduto, oligozoospermia e infertilidade de origem desconhecida (FAYRER-HOSKEN, 1997).

A utilização dessa tecnologia é limitada pelos altos custos e por métodos sofisticados, que devem ser empregados preliminarmente: terapia gonadotrófica para maturação de oócitos, métodos não invasivos de recuperação de oócitos, coleta de sêmen, condições de cultivo, desenvolvimento embrionário inicial e técnicas de transferência de embriões (Figura 3) (FAYRER-HOSKEN, 1997; FARSTAD, 2000).

3.2. Injeção espermática intracitoplasmática (ICSI)

A ICSI é uma variação da FIV e envolve a injeção de um único espermatozóide no interior do oócito, usando técnica de micromanipulação e pode ser usada nos casos de infertilidade masculina severa. A ICSI tem permitido que machos previamente considerados inférteis para todas as formas de reprodução assistida contribuam para fertilizar o oócito (Figura 4) (CATT, 1996; FAYRER-HOSKEN, 1997).

3.3. Transferências de gametas intrafalopianos (GIFT)

A GIFT é um procedimento semelhante à FIV, no qual os oócitos são recuperados por meio de laparoscopia, ou ultra-som; são maturados “in vitro” e tanto os oócitos como os espermatozóides previamente selecionados são inseminados no interior das tubas uterinas para a ocorrência da fertilização “in vivo” (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 1992; FAYRER-HOSKEN, 1997).

Essa técnica permite a fertilização e o desenvolvimento embrionário “in vivo”.

3.4. Transferência de embriões

Embriões são fertilizados “in vivo” e coletados no útero; os embriões podem ser transferidos diretamente ou congelados para transferência posterior (Figura 5).

4. Técnicas suplementares

4.1. PCR: reação em cadeia da polimerase

A avaliação genética de embriões tem sido possível pelo advento da técnica de PCR. Através da análise de sondas de DNA é possível a avaliação genética de embriões de duas ou mais células (FAYRER-HOSKEN, 1997).

A técnica de FISH está associada à extração e desnaturação do DNA. Esse material (DNA) é pré-hibridizado para bloquear os sítios inespecíficos da sonda, seguido da hibridização com a sonda específica marcada com ³²P (FAYRER-HOSKEN, 1997).

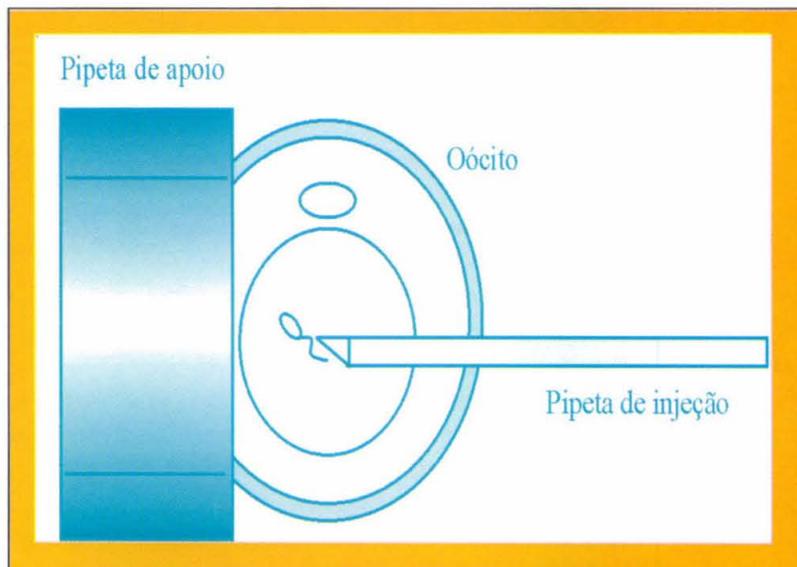


Figura 4. Representação esquemática da injeção espermática intra-citoplasmática (ICSI). Uma célula espermática é aspirada para o interior de uma pipeta de injeção e essa pipeta inserida no interior do oócito (Catt, 1996).

Soluções de problemas

Na reprodução de pequenos animais, a utilização das técnicas de reprodução assistida tem sido limitada, mas essa realidade está-se modificando principalmente em razão do valor dos animais e à disponibilidade dessa tecnologia. Outro fator importante e que limita o acesso das principais técnicas de reprodução assistida nos cães

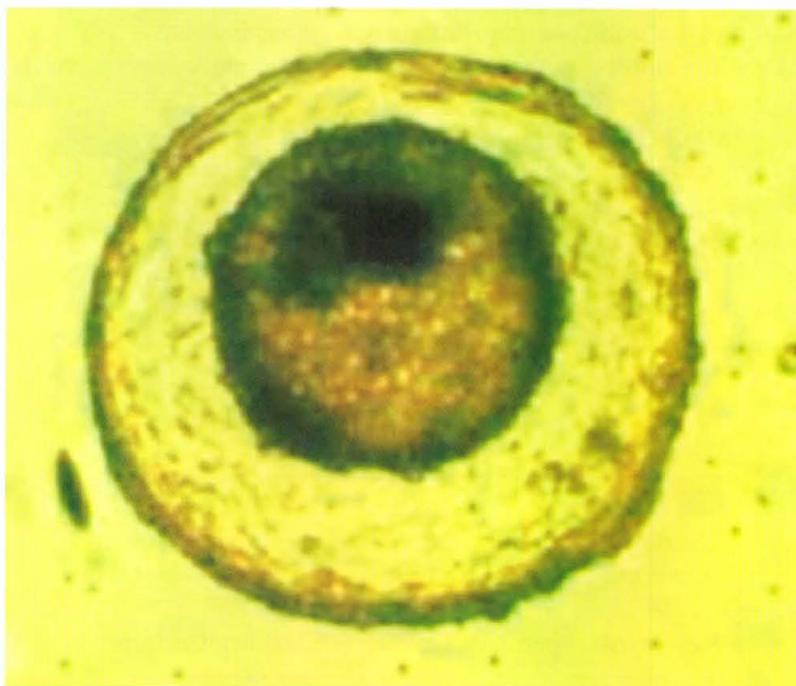


Figura 5. Embrião de cadela (Foto gentilmente cedida pelo Prof. César Roberto Esper).

é a própria anatomia e fisiologia única nas fêmeas caninas, o que torna o tratamento de várias condições, extremamente difíceis e algumas vezes, impossíveis.

Oligospermia

Cães oligospermicos são considerados inférteis quando manejados em cobertura natural, mas poderiam eventualmente deixar descendentes, se técnicas reprodutivas fossem usadas. Geralmente, cães oligospermicos são idosos ou animais que apresentaram processos infecciosos graves que resultaram em queda da produção espermática.

A seleção de células espermáticas com Percoll ou "Swin-up" poderia separar os espermatozoides mortos e selecionar uma população de células viáveis; essa população poderia ser inseminada, via laparoscopia, no útero. Se essa técnica não resultar em prenhez, os espermatozoides poderiam fertilizar oócitos "in vitro" (CENTOLA *et al.*, 1998; FARSTAD, 2000).

Se o número de espermatozoides for extremamente baixo, ICSI poderia ser usada para fertilizar os oócitos; os embriões poderiam ser transferidos para receptoras progesteronizadas para implantação e desenvolvimento embrionário (FAYRER-HOSKEN, 1997).

Bactospermia / Piospermia

Cães diagnosticados como bactospermicos ou piospermicos são freqüentemente mantidos com tratamento à base de antibióticos por meses. Nesses casos, o diagnóstico é realizado por meio de cultivos, cujos resultados exprimem culturas puras com 15.000 a 50.000 unidades formadoras de colônias (FARSTAD, 2000).

Um problema sério, conseqüente dessa condição, é a infertilidade ou subfertilidade, a despeito de um número adequado de células móveis. A maioria dos meios diluentes tem, em sua composição, antibióticos, e a lavagem dessas células nesses meios diluidores poderia aumentar as taxas de fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (FAYRER-HOSKEN, 1997).

Espermatozoides imóveis

Células espermáticas imóveis são, eventualmente, resultantes de alteração ciliar e esses cães poderiam ser candidatos à ICSI (FAYRER-HOSKEN, 1997).

Obstrução epididimária

Azospermia devida à obstrução epididimária tem sido diagnosticada por meio da avaliação dos níveis de fosfatase alcalina, enquanto o resultado da biopsia testicular mostra espermatogênese ativa. A primeira tentativa reside na confecção de uma ponte epididimária utilizando ducto deferente; essa técnica tem mostrado resultados limitados. Outra tentativa é a recuperação da célula espermática do epidídimo para realizar a ICSI; essa técnica poderia ser seguida pela transferência de embriões em receptoras sincronizadas (HAY, 1997; FARSTAD, 2000).

Hiperplasia cística do endométrio / piometra

Um diagnóstico que normalmente atemoriza os proprietários e criadores é o de piometra; esses casos são normalmente tratados com ovariohisterectomia; uma opção em termos de tratamento clínico é o uso de PGF_{2a} e de antibióticos específicos, se a cérvix estiver aberta. Mesmo tratados, não há garantias de fertilidade futura.

Com a recuperação de oócitos, maturação e fertilização "in vitro", essa cadela poderia produzir filhotes. Rotineiramente, talvez fosse interessante a recomendação de apenas histerectomia para cadelas de alto valor genético; isso poderia, no futuro, levar ao resgate de oócitos, maturação e fertilização "in vitro" e transferência de embriões (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 1992; FAYRER-HOSKEN, 1997).

Até o momento, essas técnicas são experimentais, mas com as constantes solicitações e tratamentos alternativos, as pesquisas estão desenvolvendo-se rapidamente nessa área.

SUMMARY

The objective of this discussion is to bring information about some of the assisted reproductive techniques used in domestic animals, and the impact of this technology on reproduction of dogs and cats.

Key words: spermatozoa, oocytes, fertilization, reproductive techniques.

REFERÊNCIAS

1. CATT, J. W. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 239-50, 1996.
2. CENTOLA, G. M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E. *et al.* Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 1173-5, 1998.
3. FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 375-87, 2000.
4. FAYRER-HOSKEN, R. Assisted reproductive technologies in small animal theriogenology. **Proceedings of Canine Male Reproduction Symposium**, p. 53-7, 1997.
5. FAYRER-HOSKEN, R.; CAUDLE, A. B. The laparoscope in follicular oocyte collection and gamete intrafallopian transfer and fertilization. **Theriogenology**, v. 36, p. 709-25, 1992.
6. GOODROWE, K. L.; HAY, M.; KING, W. A. Nuclear maturation of domestic cat ovarian oocytes in vitro. **Biological Reproduction**, v. 45, p. 466-70, 1991.
7. GOODROWE, K. L.; WALL, R. J.; O'BRIEN, S. J. *et al.* Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization "in vitro". **Biological Reproduction**, v. 39, p. 355-72, 1988.
8. HAY, M. A. Freezing and evaluating gametes in dogs a novel approach. **Proceedings of canine male reproduction symposium**, p. 254-60, 1997.
9. ROTA, A.; PEÑA, A. I.; LINDE-FORSBERG, C. *et al.* "In vitro" capacitation of fresh chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 199-215, 1999.
10. YAMADA, S.; SHIMAZU, Y.; KAWAJI, H. *et al.* Maturation, fertilization and development of dog oocytes "in vitro". **Biological Reproduction**, v. 46, p. 853-8, 1992.

