



Desenvolvimento embrionário e transferência de embriões em cadelas

Embryo development and transfer in bitches

Maricy Apparício¹, Wilter Ricardo Russiano Vicente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

¹Correspondência: maricyap@hotmail.com

Resumo

O sucesso da transferência de embriões na espécie canina dependerá de inúmeros fatores, dentre os quais se destacam: a superação das barreiras atualmente encontradas nas etapas laboratoriais, de sincronização da doadora com a receptora, e de obtenção dos embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo*. Estes são apenas alguns dos aspectos discutidos nessa revisão.

Palavras chave: biotecnologia, fertilização, *in vitro*, *in vivo*.

Abstract

The success of embryo transfer in dogs depend on many factors, which includes: overcoming the barriers currently found in in vitro techniques, the synchronization of the donor with the recipient, and the obtaining of in vitro and in vivo produced embryos. These are just some of the aspects discussed in this review.

Keywords: biotechnology, fertilization, *in vitro*, *in vivo*.

Introdução

A transferência de embriões representa a segunda geração de biotecnologias da reprodução. O procedimento é abrangente e compreende etapas de sincronização do estro, acasalamento ou inseminação artificial, colheita de oócitos e maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e inovação dos embriões nas receptoras.

Na espécie bovina, a técnica tem sido amplamente utilizada e o Brasil destaca-se entre os países que não apenas dominam essa biotecnologia, como a exportam, sendo considerado o maior produtor mundial de embriões oriundos de fertilização *in vitro* (Lima et al., 2014). Com o advento da clonagem, as técnicas de reprodução assistida ganharam dimensões nunca antes imagináveis, e o comércio de animais provenientes dessas manipulações, já é realidade em alguns estados brasileiros.

Diferentemente, em canídeos, estudos a respeito do desenvolvimento embrionário *in vitro* são escassos e refletem não apenas a falta de apelo sócio econômico que a espécie desperta, mas, principalmente, as peculiaridades de sua fisiologia reprodutiva que limitam o avanço desta e de outras biotécnicas.

Por outro lado, nos últimos anos, pesquisadores tem utilizado o cão doméstico como modelo experimental para seus símiles silvestres e, em especial, como modelo genético de diversas doenças humanas, visto que compartilha 224 enfermidades de caráter hereditário, tais como a cardiomiopatia e a distrofia muscular (Chastant-Maillard et al., 2010). Por viverem no mesmo ambiente que o homem, podem ainda ser considerados modelo para doenças humanas que se desenvolvem em decorrência de uma complexa interação entre genes e meio ambiente (Schneider et al., 2007).

Em vista disso, fica evidente a importância do cão nas pesquisas atuais e a necessidade de se voltar os esforços no aprimoramento das técnicas *in vitro* de modo a ultrapassar as barreiras atualmente encontradas. Por se tratar do primeiro passo na produção de embriões, a maturação realizada em laboratório tem sido a grande responsável pelo descompasso entre os resultados obtidos em canídeos e nas demais espécies.

A espécie canina e a maturação oocitária

O termo 'maturação' refere-se às modificações pelas quais o oócito passa (na morfologia nuclear e citoplasmática) para se tornar competente, ser fertilizado e estar apto para se desenvolver como embrião (Apparício, 2015). Nesta transformação, o núcleo retoma a meiose após longo período de repouso; passa de um formato arredondado circundado por um envelope nuclear (oócito imaturo, estágio de vesícula germinativa) para um que apresenta condensação de cromatina (oócito maturo, estágio de metáfase II). O citoplasma se transforma estruturalmente através da redistribuição de organelas, componentes importantes para a ativação oocitária durante a fertilização.



Na maioria dos mamíferos o processo de maturação oocitária ocorre no ambiente folicular, onde são expostos à concentrações crescentes de estrógeno. Quando há o pico do hormônio luteinizante (LH) ocorre ovulação e os oócitos liberados estão em metáfase II, prontos para serem fecundados (Apparício et al., 2011).

De modo distinto, oócitos de cadelas estão expostos (além da ação do estrógeno) à altas concentrações de progesterona no folículo pré-ovulatório e são ovulados, em média, dois dias após o pico de LH, quando ainda estão imaturos (Apparício et al., 2015). Desta forma, necessitam de um período adicional de dois a cinco dias dentro da tuba uterina para retomarem meiose e atingirem o estágio de metáfase II (Holst e Phemister, 1971; Tsutsui, 1975), quando estarão aptos para ser fecundados. É notório, portanto, que a maturação dos oócitos caninos se dá fora do ambiente folicular, na tuba uterina, onde também ocorre a fertilização e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Luvoni et al., 2005).

Desenvolvimento embrionário *in vivo*

O período em que ocorrem as principais etapas do desenvolvimento embrionário pré-implantação na espécie canina difere entre os autores (Fayer-Hosken, 2007). Os resultados discrepantes refletem os métodos empregados para a determinação da ovulação (dosagem sérica de progesterona ou dias após o acasalamento) (Reynaud et al., 2006).

Oócitos caninos são fecundados na tuba uterina 48 a 83 hs após a ovulação, na parte distal da ampola (Tsutsui, 1975). As células da granulosa permanecem firmemente aderidas ao oócito até o estágio de pronúcleo. Por volta do 4 ao 7º dia pós-ovulação, embriões de duas células podem ser encontrados na parte média da ampola, os de oito células do 4,5 ao 12º dia e o estágio de mórula e blastocisto do 8,5 ao 10º dia (Reynaud et al., 2006). O embrião canino entra no útero em estágio de mórula ou blastocisto inicial e quase 50% deles fazem migração de um corno ao outro, a exemplo do observado em outras espécies pluríparas, possivelmente como forma de equilibrar o número de fetos entre os dois cornos (Shimizu et al., 1990).

Por volta do 16 e 20º dia, o blastocisto (que mede 2,5 mm) eclode e o processo de implantação inicia-se dois dias depois (Reynaud et al., 2005), período considerado tardio para uma gestação relativamente curta (58-65 dias).

Produção e transferência de embriões

A técnica de transferência engloba várias etapas que requerem um planejamento e sincronização sistemáticos. O primeiro passo é a produção de embriões, que pode ser realizada *in vivo* ou *in vitro*. Uma vez obtidos, os embriões são transferidos para as receptoras que devem estar em condições endócrinas adequadas para permitir o desenvolvimento embrionário.

Na produção *in vivo*, a fêmea selecionada pode ser superestimulada com hormônios ou apresentar seu ciclo naturalmente e após criterioso acompanhamento da evolução do proestro ao estro, realiza-se a inseminação. Os embriões são obtidos por lavagem da tuba uterina ou do corno uterino (procedimento que geralmente é realizado por intervenção cirúrgica) e, na sequência, são transferidos para receptoras cujos ciclos devem estar sincronizados com o da doadora (naturalmente ou após indução farmacológica). Esse é o método que mais tem sido testado em cadelas.

O primeiro relato de transferência de embriões produzidos *in vivo* data de 1979 (Kinney et al.). Neste, os embriões foram colhidos no 14-15º dia da data do acasalamento e transferidos para cinco receptoras. Dos 28 embriões transferidos, apenas três resultaram em gestação e nascimento. Uma década depois, Tsutsui e colaboradores (Tsutsui et al., 1989) conseguiram obter dois filhotes após a transferência de oito mórulas para uma única receptora. Anos mais tarde, esse grupo de pesquisa reportou o sucesso da transferência intrauterina de embriões no estágio de oito células a blastocisto e intratubárica usando embriões em estágio inferior a oito células, resultando em 57,1 e 50% das receptoras gestantes, respectivamente (Tsutsui et al., 2001a, b).

Esses trabalhos indicam que a tuba uterina é o local para deposição dos embriões que está relacionada às maiores taxas de concepção e nascimento de filhotes na espécie canina. Entretanto, em 2006 (Tsutsui et al.) esses mesmos pesquisadores reportaram a transferência de zigotos de duas células para um corno uterino e obtiveram gestação em uma das oito receptoras utilizadas. Embora essa tática de transferir embriões em estádios iniciais de desenvolvimento não seja prática rotineira em animais, é comum em humanos submetidos à FIV (Luvoni et al., 2006) e após esse resultado positivo, pode ser considerada uma alternativa viável para cadelas.

Em relação à produção *in vitro* de embriões caninos, os resultados são ainda desanimadores. Com poucos trabalhos sobre o tema, o que fica evidente é que o desenvolvimento embrionário pós FIV se dá até o estágio de quatro a oito células (Yamada et al., 1992; Hori e Tsutsui, 2003); estádios de mórula e blastocisto são raros e as taxas aproximam-se de 0,5% (Otoi et al., 2000). Até o momento, há apenas uma publicação sobre gestação após transferência de embriões produzidos *in vitro* (England et al., 2001). Nesta, embriões de duas células foram transferidos para uma receptora que ficou gestante e manteve a gestação até os 36 dias, período em que o exame ultrassonográfico acusou a absorção das vesículas gestacionais.



Limitações da técnica para a espécie canina

A produção de embriões *in vivo* em cadelas esbarra no número limitado de zigotos viáveis após estro natural (seis a oito por animal) e, caso se opte pela indução farmacológica, na dificuldade em se alcançar a superovulação (método que, em tese, contribuiria para o aumento do número de embriões). O protocolo mais utilizados para esse propósito é a associação de gonadotrofina coriônica equina (eCG) associada com a gonadotrofina coriônica humana (hCG; Kutzler, 2007), entretanto, como mencionado previamente, a cadela não responde adequadamente à indução.

Outro fator limitante relacionado à técnica é o método de colheita dos embriões. Diferentemente da espécie equina na qual a colheita embrionária é realizada por lavagem uterina via transcervical, em canídeos os pesquisadores tem utilizado o lavado da tuba uterina e dos cornos uterinos durante ou após cirurgia (*in vivo* ou *ex vivo*, respectivamente). A escolha do local de lavagem (tuba uterina ou corno uterino) está relacionada com o estágio de desenvolvimento do embrião que se deseja transferir. Até o 9º dia pós-ovulação, o lavado da tuba uterina é o mais adequado para se obter embriões até o estágio de mórula (Chastand-Maillard et al., 2010). Após o 10-11º dia, tanto mórula como blastocisto podem ser encontrados nos cornos uterinos (Soom et al., 2014).

Em termos de percentual de recuperação embrionária, o lavado dos cornos uterinos *in vivo* permite a colheita de apenas 30-40% dos embriões estimados pela contagem do corpo lúteo (Tsutsui et al., 2001b), visto que o útero encontra-se hiperplásico e, por esta razão, os embriões geralmente ficam presos nas pregas do endométrio (Chastand-Maillard et al., 2010). Uma solução para incrementar esses índices seria realizar o lavado *ex vivo* (após exérese cirúrgica do órgão), no entanto, salvo casos de uso experimental, essa técnica é de pouca serventia para animais silvestres ou para matrizes geneticamente superiores provenientes de canis comerciais.

Em relação aos embriões produzidos *in vitro*, o escasso número de trabalhos utilizando essa técnica e o insucesso na obtenção de filhotes é consequência da inadequação dos meios de cultivo empregados para a fertilização e, principalmente, maturação oocitária. Nos últimos anos, diversas suplementações, tais como hormônios, fontes proteicas, substratos energéticos, antioxidantes e fatores de crescimento têm sido adicionados aos meios de cultivo oocitário com o intuito de incrementar as taxas de maturação. Recentemente, trabalhos utilizando meios sequenciais ou bifásicos apresentaram resultados considerados promissores para a espécie canina (25-40% de oócitos em metáfase II), mas ínfimos comparados às taxas obtidas para bovinos, que podem chegar a 90%. Como a maturação *in vitro* é crucial para a fertilização e cultivo embrionário (apenas oócitos competentes, isto é, que apresentam maturação nuclear e citoplasmática, conseguem se desenvolver até blastocistos), o aprimoramento dos meios deste processo é imperativo. Ademais, zigotos caninos cultivados *in vitro* dificilmente progridem até estádios mais avançados de desenvolvimento (mórula e blastocisto) devido a falha na ativação do genoma e à inadequação dos meios de cultura (Rodrigues e Rodrigues, 2006), o que corrobora a importância de também se aperfeiçoar *in vitro* o cultivo embrionário.

Prospectivas

A transferência de embriões em cães ainda precisa ser mais bem estudada e a técnica aperfeiçoada para que possa ser rotina, a exemplo do observado na espécie bovina. Para tanto, é necessário que as pesquisas sejam direcionadas para temas básicos envolvendo fisiologia reprodutiva e biotécnicas laboratoriais consideradas primordiais para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* (MIV, FIV e cultivo embrionário). Assim, a adequação dos meios de cultivo, associado ao conhecimento dos fatores intrínsecos responsáveis pela retomada da meiose poderiam atuar sinergicamente para incrementar as taxas de maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário em canídeos.

Outras possíveis contribuições para o aprimoramento da técnica incluem o ajuste dos protocolos de sincronização do estro, o estudo de métodos alternativos à transferência cirúrgica de modo a incrementar as taxas de recuperação embrionária *in vivo* e a utilização de embriões criopreservados que dispensam a necessidade de sincronização da receptora com a doadora. Finalmente, uma vez superada essas dificuldades, a produção de embriões *in vitro* poder-se-á contribuir para estudos de epigenética e de terapia celular através do fornecimento de células tronco embrionárias.

Referências

- Apparício M. Controle da Reprodução em cadelas e gatas: manipulação do ciclo estral e biotécnicas *in vitro*. In: Apparício M, Vicente WRR. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. São Paulo: Ed. MedVet, 2015. p.423-433.
- Apparício M, Mostachio GQ, Motheo TF, Alves AE, Padilha L, Pires-Butler EA, Savi PA, Uscategui RA, Luvoni GC, Vicente WRR. Distribution of cortical granules and meiotic maturation of canine oocytes in bi-phasic systems. *Reprod Fertil Dev*, 2015. doi: 10.1071/RD14022.
- Apparício M, Mostachio GQ, Motheo TF, Padilha L, Alves AE, Pires-Butler EA, Vicente WRR. Maturação *in vitro* de oócitos caninos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.16-25, 2011.



- Chastantd-Maillard S, Chebrou M, Thoumire S, Saint-Dizier M, Chodkiewicz M, Reynaud K.** Embryo biotechnology in the dog: a review. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.1049-2056, 2010.
- England GC, Verstegen JP, Hewitt DA.** Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. *Vet Rec*, v.148, p.20-22, 2001.
- Fayer-Hosken R.** Embryo transfer in the dog and cat. *Theriogenology*, v.68, p.382-385, 2007.
- Hori T, Tsutsui T.** *In vitro* fertilization of mature canine ova. *Vet Rec*, v.152, p.688-690, 2003.
- Holst PA, Plemister RD.** The prenatal development of the dog. preimplantation events. *Biol Reprod*, v.5, p.771-779, 1971.
- Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, Templeton JW, Kraemer DC.** Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod*, v. 20, suppl.2, p.170, 1979. Resumo.
- Kutzler MA.** Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, v.68, p.354-374, 2007.
- Lima JMP, Santos, FA, Pimentel, MML, Bezerra MB.** Progresso metodológico e sua influência na produção in vitro de embriões bovinos no Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, v.38, p.135-140, 2014.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D.** Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.41-59, 2005.
- Luvoni GC, Chigioni S, Beccaglia M.** Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reprod Dom Anim*, v.41, p.286-290, 2006.
- Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S, Suzuki T.** Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. *Vet Rec*, v.146, p.52-53, 2000.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Lesegno CV, Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S.** In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology*, v.66, p.1685-1693, 2006.
- Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Thoumire S, Chebrou M, Viaris de Lesegno C, Chastant-Maillard S.** In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. *Reproduction*, v.130, p.193-201, 2005.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL.** Responses of canine oocytes to in vitro maturation and in vitro fertilization outcome. *Theriogenology*, v.66, p.1667-1672, 2006.
- Schneider MR, Adler H, Braun J, Kienzle B, Wolf E, Kolb HJ.** Canine embryo-derived stem cells: toward clinically relevant animal models for evaluating efficacy and safety of cell therapies. *Stem Cells*, v.25, p.1850-1851, 2007.
- Shimizu T, Tsutsui T, Murao I, Orima H.** Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jpn J Vet Sci*, v. 52, p.1273-1275, 1990.
- Soom AV, Rijsselaere T, Filliers M.** Cats and dogs: two neglected species in this era of embryo production in vitro? *Reprod Domest Anim*, v.49, suppl.2, p.87-91, 2014.
- Tsutsui T.** Studies on the reproduction in the dog on cleavage and transport of fertilised ova in the oviduct. *Jap J Anim Reprod*, v.21, p.70-75, 1975.
- Tsutsui T, Hori T, Endo S, Hayama A, Kawakami E.** Intrauterine transfer of early canine embryos. *Theriogenology*, v.66, p.1703-1705, 2006.
- Tsutsui T, Hori T, Kawakami E.** Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, n. 57, p.309-314, 2001.
- Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E.** Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci*, v.63, p.401-405, 2001.
- Tsutsui T, Shimada K, Nishi M, Kubo N, Murao I, Shimizu T, Ogasa A.** An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn J Vet Sci*, v.51, p.797-800, 1989.
- Yamada S, Shimazu Y, Kawaji H, Nakazawa M, Naito K, Toyoda Y.** Maturation, fertilization and development of dog oocytes in vitro. *Biol Reprod*, v.46, p. 853-858, 1992.
-