

Taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial em fêmeas caninas (*Canis familiaris*-Linnaeus, 1758)

Guilherme Nascimento Cunha*
José Octávio Jacomini
Marcelo Emílio Beletti

Rua Diógenes de Moraes, 190 – Cazeca – Uberlândia-MG – CEP 38400-038
gncunha@yahoo.com.br

*Autor para correspondência

Submetido em 24/06/2004
Aceito para publicação em 26/03/2005

Resumo

Este trabalho teve como objetivo determinar a taxa de fertilização e recuperação embrionária e a avaliação do desenvolvimento embrionário inicial. Foram utilizadas 11 cadelas adultas, sem raça definida. Após o início do estro natural, estas foram acasaladas e submetidas a ovariectomia no quinto, sétimo ou nono dia pós-coito. Separaram-se os ovários, as tubas e os cornos uterinos. Dos ovários, determinou-se o número de corpos lúteos. As tubas e os cornos uterinos foram lavados separadamente para a colheita de oócitos e embriões, sendo estes identificados pelo uso de estereomicroscópio em aumento de 15x. A taxa de fertilização foi de 94% e a recuperação embrionária de 68,5%. No dia cinco pós-coito, encontrou-se embriões de até oito células nas tubas uterinas. Mórula ou blastocisto foram observadas nos cornos uterinos a partir do dia nove pós-cobertura. Com base nestes resultados concluiu-se que a perda de estruturas pode ser por falha na captação destas pelas tubas

uterinas ou durante a execução da técnica. Mesmo utilizando uma única cobertura pode-se ter uma alta taxa de fertilização. Observou-se também que o desenvolvimento embrionário nas tubas uterinas teve uma duração de até cinco dias pós-coito com estágio de até oito células, encontrando embriões em estádios a partir de mórula nos cornos uterinos nove dias pós-coito.

Unitermos: cadela, embrião, desenvolvimento, taxa de fertilização

Abstract

Fertilization rate and early embryonal development in female dogs (*Canis familiaris* – Linnaeus, 1758). The objective of this work was to determine fertilization rates and embryonal recovery and to evaluate aspects of the early embryonal development. Eleven adult female dogs were used, with no defined breed. After the beginning of the natural estrus, these were mated and subjected to ovariectomy on the 5th, 7th or 9th day postcoitus. Ovaries, tubes and uterine horns were separated. From the ovaries, the number of corpora lutea was determined. Tubes and uterine horns were washed separately in order to collect ovules and embryos, which were identified through the use of a stereomicroscope at 15x magnification. The fertilization rate was 94% and embryonal recovery 68.5%. On the fifth day, postcoitus embryos of up to eight cells were found in uterine tubes. Morulae or blastocysts were observed in uterine horns from the 9th day after recovery. On the basis of these results, it was concluded that the loss of structures can be due to the failure of their uptake by uterine tubes or during the execution of the technique. A high fertilization rate can be achieved even with the use of a single covering. It was also concluded that the embryonal development in uterine tubes had a duration of up to five days postcoitus with a stage of up to eight cells, embryos being found in stages of morulae in uterine horns nine days postcoitus.

Key words: female dog, embryo, development

Introdução

Estudos em outras áreas da medicina veterinária, como a patologia clínica e cirúrgica de pequenos animais, têm conquistado grandes avanços. No entanto, a reprodução, tem recebido pouca atenção quando comparada a estas áreas, apesar de que nos últimos anos, pôde-se observar crescente interesse referente aos problemas reprodutivos dos cães, em especial da fêmea.

A cadela e a raposa são uns dos únicos animais em que o oócito primário é normalmente ovulado (Anderson, 1977). Porém, os oócitos primários não são capazes de serem fertilizados até cerca de 60 horas depois da ovulação, quando eles passam pela primeira divisão meiótica para se tornarem oócitos secundários. Neste tempo o oócito desceu 2/3 da tuba uterina. Os oócitos são fertilizados após a primeira divisão meiótica, entre 60 e 108 horas após a ovulação. O período no qual os espermatozoides permanecem capazes de fertilização no sistema genital feminino é em torno de cinco dias (Tsutsui, 1989).

Swanson et al. (1994), que trabalhando com embriogênese de gatos, observaram uma taxa de recuperação e de fertilização de 87,5% e 80,8%, respectivamente. Renton et al. (1991), em estudo com cães, encontraram uma taxa de fertilização de 100%, enquanto que Tsutsui et al. (2001) pesquisando a transferência de embriões em cães conseguiram uma taxa de recuperação de 97,1% pelo método de ovario-histectomia. Tsutsui et al. (2002) obtiveram uma taxa de fertilização de 83,3%.

Conforme estudos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial em cães, para estes se desenvolverem até o estágio de três a seis células, oito células, 16 células, na tuba uterina, levam um período aproximado de 5, 6 e 8 dias, respectivamente. Enquanto que o estágio de mórula, no útero, é observado em torno de 9 a 10 dias, e o blastocisto de até 12

G. N. Cunha et al.

dias. (Tsutsui, 1989; Tsutsui et al., 1989; Renton et al., 1991; Tsutsui et al., 2001).

Apesar dos avanços obtidos, ainda há pouca informação disponível sobre os aspectos básicos da reprodução do cão. Para maior entendimento e aperfeiçoamento das técnicas utilizadas na reprodução, o presente trabalho objetivou determinar a taxa de recuperação de estruturas (oócitos ou embriões); a taxa de fertilização e a avaliação do desenvolvimento embrionário inicial.

Material e Métodos

A – Animais

Foram utilizadas 11 cadelas adultas, sem raça definida (S.R.D.), as quais foram acompanhadas do final do anestro até o estro pela técnica de citologia vaginal (Vannucchi et al., 1997) e pela sintomatologia clínica, sendo a avaliação realizada em dias alternados.

Os animais foram obtidos pela Associação Protetora dos Animais de Uberlândia-MG, ficando mantidos em canis do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU) no período de agosto de 2002 a março de 2003, onde foram alimentados com ração balanceada para adultos, uma única vez ao dia, e água *ad libitum*. Realizou-se exame clínico e laboratorial como hemograma, pesquisa de hemoparasitas e urinálise nos animais quando admitidos. Os que apresentaram doenças foram retirados do experimento, sendo devolvidos aos proprietários. As fêmeas híginas que apresentaram sintomatologias clínicas de pro-estro, foram incorporadas ao estudo.

Assim, após o início do estro, as cadelas foram acasaladas através da monta natural, uma só vez, quando da queratinização

máxima do epitélio vaginal. Utilizou-se apenas um reprodutor, com exame andrológico e espermiograma normais.

Depois do acasalamento, os animais foram divididos em três grupos e submetidos a ovariectomia (Fingland, 1996), realizada nas dependências do Hospital Veterinário – FAMEV-UFU. Das 11 cadelas, duas foram ovariectomizadas no 5º dia, três no 7º dia e seis no 9º dia pós-coito.

Fez-se ovariectomia com o uso de anestesia dissociativa (Mansone, 1999). Ao término do pós-operatório os animais foram encaminhados a Associação Protetora dos Animais para adoção.

Seguido do procedimento cirúrgico o útero e os ovários foram processados no Laboratório de Reprodução Animal da FAMEV-UFU, individualizando-se os ovários, útero e tubas uterinas.

B – Ovários

Os ovários foram devidamente identificados e, posteriormente examinados individualmente, determinando-se o número de corpos lúteos.

C – Tubas e cornos uterinos

As tubas e os cornos uterinos imediatamente, após a remoção, foram internamente e individualmente lavados para a colheita das estruturas (oócitos e embriões). Após a identificação do óstio abdominal da tuba uterina, este foi canulado com agulha 13x3G, seguido por lavagem com cerca de 5 ml de PBS (Phosphate buffered saline). A lavagem dos cornos uterinos foi realizada por canulação das suas extremidades caudais, com uma agulha 25x7G, onde injetava-se aproximadamente 20ml de PBS, o qual saía numa pequena abertura feita junto à transição útero tubárica.

D – Pesquisa de estruturas (oócitos e embriões)

O líquido recuperado era depositado em placas de Petri (90x20mm) identificadas, separadamente, como tuba uterina direita e esquerda, corno uterino direito e esquerdo, e examinado em estereomicroscópio no aumento de 15x para a pesquisa das estruturas.

As estruturas, após a identificação, eram transferidas para uma placa de Petri (35x10mm) com PBS enriquecido com 20% de soro fetal bovino.

Foram quantificadas e classificadas por meio de estereomicroscópio no aumento de 40X: oócitos, embriões de uma a 16 células, mórula inicial (Mi), mórula (M), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx), de acordo com o estágio de desenvolvimento (Robertson e Nelson, 1999).

Neste estudo consideramos embrião de uma célula, quando se apresentava com citoplasma bastante organizado e oócito quando o citoplasma mostrava sinais de desintegração ou bastante contraído. No entanto, de acordo com Renton et al. (1991) pode-se em casos de dúvida colocar a estrutura em meio de cultura, para observar se há a clivagem celular, confirmando assim a fertilização do oócito.

A taxa de recuperação (em porcentagem) foi obtida dividindo-se o número total de estruturas pelo número total de corpos lúteos multiplicado por 100. Já a taxa de fertilização pela divisão do número total de embriões pelo número total de estruturas multiplicado por 100.

Para avaliar se houve associação da taxa de recuperação com o dia ou local da coleta utilizou-se o teste de hipóteses para a comparação entre duas proporções, usando nível de significância de 0,05 (Vieira, 1980).

Resultados

A tabela 1 mostra o número e a classificação de oócitos e embriões e suas localizações nas tubas ou cornos uterinos e a quantidade de corpos lúteos, sendo essa de $3,27 \pm 1,45$ (média \pm desvio padrão). Foram identificados oócitos e embriões localizados nas tubas ou nos cornos uterinos em função do tempo pós-cobertura. Na tuba uterina foram encontrados apenas embriões de 8 células (Figura 1B). Já nos cornos observou-se oócitos (Figura 1A), embriões de uma, 2, 8 e 16 células bem como nos estádios de mórula inicial (Mi), mórula (M) (Figura 1C), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) (Figura 1E) e blastocisto expandido contraído (Bx contraído) (Figura 1D).

TABELA 1 – Número de corpos lúteos, classificação, quantificação e localização de embriões na tuba e útero, em cadelas S.R.D, adultas, coletadas entre o 5º e o 9º dia pós-cópula.

Coleta (dias)	Animal	Corpo lúteo		Nº embriões (classificação)			
		D	E	Tuba uterina		Corno uterino	
				D	E	D	E
5	4	4	3	-	1 (8cel)	2 (8cel)	-
5	9	5	3	2(8cel)	3(8cel)	-	-
7	2	2	3	-	-	1(2cel)	3(1cel)
7	7	4	2	-	-	2 (8cel)	-
7	8	2	3	-	-	1(2cel);1(16cel)	2(16cel);1(ov)
9	1	4	4	-	-	4(Bx)	4(Bx)
9	3	1	2	-	-	1(ov)	1(ov);1(2cel)
9	5	4	3	-	-	4(M)	2(M)
9	6	3	2	-	-	3 (Bx)	2 (Bx)
9	10	6	3	-	-	2(Bx);2(Bx); 1(Bl);1(Mi)	2(Bx)
9	11	3	7	-	-	-	1 (Bx)
Total	-	38	35	2	4	25	19

D= direito; E= esquerdo; ov= oócito; cel= célula; Mi= mórula inicial; M= mórula; Bl= Blastocisto; Bx= Blastocisto expandido.

O número total de corpos lúteos foi de 73 e o total de estruturas recuperadas 50. As taxas de recuperação dos lados

G. N. Cunha et al.

direito e esquerdo e total, observadas neste estudo, foram de 71,05%, 65,71%, 68,50%, respectivamente; enquanto a taxa de fertilização foi de 94%.

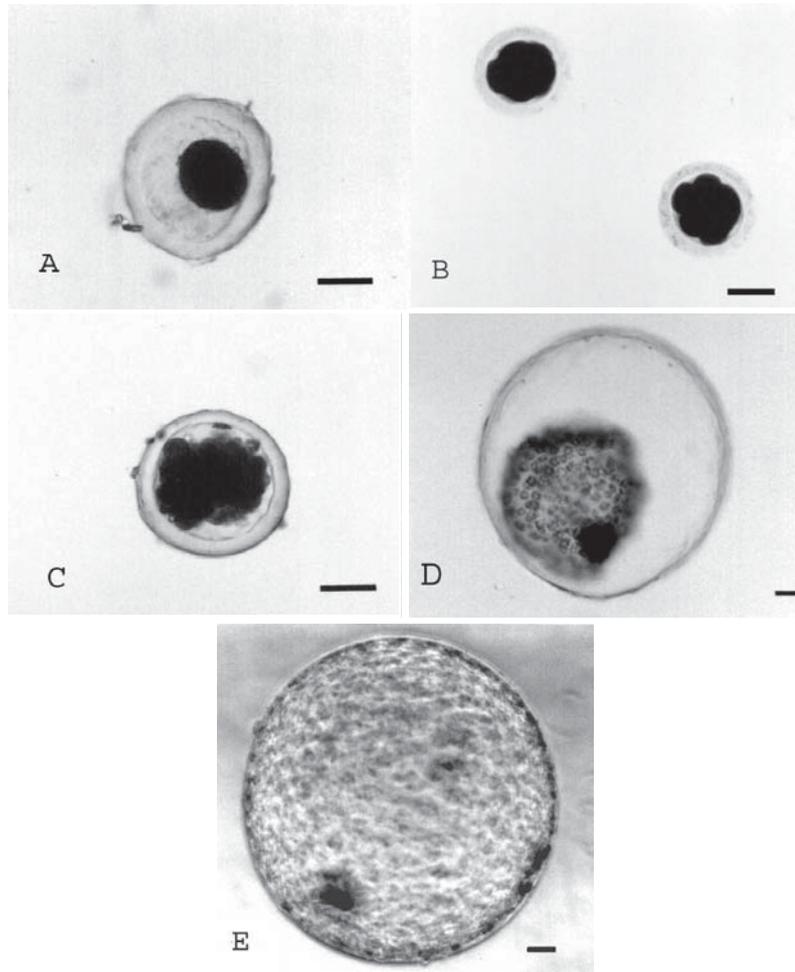


FIGURA 1: Fotomicrografia de oócito e embriões caninos de até nove dias pós-coito. A – Oócito. B – Embriões de oito células. C – Estádio de mórula. D – Estádio de blastocisto expandido (contraído). E – Estádio de blastocisto expandido (A a C, Barra corresponde a 100 mm. D e E – Barra corresponde a 10 mm).

As proporções da taxa de recuperação por datas foram, respectivamente: 0,5333 (53,33%); 0,6075 (60,75%) e 0,7380 (73,80%) para 5º, 7º e 9º dias pós-coito, sem diferença estatística entre elas ($p=0,34$ para o grupo do 5º dia em relação ao do 7º dia pós-coito; $p= 0,08$ para o grupo do 5º dia em relação ao do 9º dia pós-coito e $p= 0,17$ para o grupo do 7º dia em relação ao do 9º dia pós-coito). Já a comparação entre os locais mostrou-se significativa, em que as proporções foram de 0,0821 (8,21%) para as tubas e 0,6027 (60,27%) para os cornos uterinos, e a significância foi de $1,11 \cdot 10^{-15}$. Na comparação do lado direito em relação ao esquerdo, que apresentaram proporções de 0,7105 (71,05%) e 0,6971 (69,71%), o teste apresentou-se não significativo ($p=0,31$).

Discussão

A taxa de recuperação das estruturas encontradas neste estudo foi de 68,50%. Este resultado foi similar ao encontrado por Goodrowe et al. (1988) que obtiveram uma taxa de recuperação de 59,70% em estro natural em gatas, e também ao de Renton et al. (1991) que observaram em cadelas uma taxa de 77%. Porém, mostrou-se inferior ao encontrado por Swanson et al. (1994) e Tsutsui et al. (2001) que obtiveram uma taxa de 87,5 e 97,10%, respectivamente. É importante salientar que o número de corpos lúteo raramente coincide com o número de oócitos ou embriões recuperados. Isto, provavelmente, deve-se ao fato de que, após a ovulação, alguns oócitos podem não ser captados pelas tubas uterinas. Da ovulação até o envolvimento pelo infundíbulo, o oócito está dentro da bolsa ovárica onde ele pode se perder (Renton et al., 1991). A diferença dos valores encontrados neste estudo com os de Swanson et al. (1994) e Tsutsui et al. (2001) pode ser entendida não só pela não captação dos oócitos, mas, também, por falhas no método utilizado nesta pesquisa para recuperação das estruturas. Falhas estas inerentes

à própria técnica como a perda de estruturas durante a manipulação e separação das tubas e cornos uterinos. Perdas de oócitos e embriões durante a lavagem dos órgãos para a recuperação, separação e classificação dos mesmos. A análise estatística da associação da taxa de recuperação com a data da coleta não mostrou-se com diferença significativa. Já em relação ao local da coleta observou-se diferença entre as tubas para os cornos uterinos. A melhor taxa de recuperação nos cornos uterinos deve-se provavelmente a uma maior facilidade de lavagem e remoção dos embriões em relação à tuba, por estas serem órgãos mais delgados, e portanto, mais difíceis de serem manipulados.

Em relação à taxa de fertilização, esta foi de 94%, valor inferior ao de Renton et al. (1991) e de Goodrowe et al. (1988), cujas taxas foram de 100% e 97,9% respectivamente. Entretanto, foi superior a de Swanson et al. (1994) e de Tsutsui et al. (2002) que obtiveram uma taxa de 80,8% e 83,3%, respectivamente. Assim os valores obtidos nesta pesquisa sugerem que com um bom controle do estro, o uso de reprodutor com exame andrológico e espermiograma normais, em monta natural, é possível obter um bom resultado na taxa de fertilização.

A avaliação do desenvolvimento embrionário inicial foi dividida em três grupos. As cadelas submetidas a colheitas das estruturas no 5º dia pós-cópula tiveram embriões de oito células, localizados na tuba uterina. Isto se mostrou similar aos resultados de Renton et al. (1991) e Tsutsui et al. (2001), que encontraram embriões de cinco a oito células uma semana pós-ovulação. Tsutsui (1989) considerou que a ovulação ocorra cerca de dois dias após o início do estro e que os embriões atingem o estágio de três a oito células em torno de cinco a seis dias após a ovulação. Como no presente trabalho não foi determinado o momento das ovulações, estima-se que, no coito, as cadelas já tinham ovulado. Foram encontrados, também, embriões de oito células nos cornos uterinos, dado este que está em desacordo com Tsutsui (1989), Renton et al. (1991) e Tsutsui et al. (2002).

Estes determinaram que os embriões entram no corno uterino cerca de oito a nove dias pós-ovulação (204-216 horas). Este fato se deve, possivelmente, a falha na lavagem, coleta e separação das estruturas.

Os animais em que a coleta realizou-se no 7º dia pós-coito, tiveram embriões presentes no útero nos estádios embrionários de uma, duas e 16 células, bem como um oócito não fecundado. Esses dados não se mostraram de acordo com Tsutsui (1989), Tsutsui et al. (1989), Renton et al. (1991), Tsutsui et al. (2001) e Tsutsui et al. (2002) que observaram uma média de oito dias pós-ovulação (pós-coito) para que o embrião, no estádio de mórula, atinja o corno uterino. Uma explicação para embriões de até 16 células que tenham atingido os cornos uterinos é que não houve continuação de seu desenvolvimento, não atingindo a estádio de mórula. Assim, tendo como consequência a morte dos mesmos, embora isto não os impedisse de migrarem das tubas para os cornos uterinos.

Já nas cadelas em que a coleta ocorreu no 9º dia pós-coito, encontrou-se embriões em estádios de duas células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido. Em relação ao embrião de duas células, este resultado não confere com os autores já citados pelos mesmos motivos acima descritos. A partir do estádio de mórula até blastocisto expandido, os resultados encontrados são similares aos de Tsutsui (1989), Tsutsui et al. (1989), Renton et al. (1991) e Tsutsui et al. (2001), condizendo com o período de entrada e desenvolvimento embrionário na cadela.

Neste estudo pode-se concluir que houve perda de estruturas durante a captação pelas tubas uterinas ou pela execução da técnica. Mesmo utilizando uma única cobertura pode-se obter uma alta taxa de fertilização. Observamos também que o desenvolvimento embrionário nas tubas uterinas teve uma duração de até cinco dias pós-coito com estádio de até oito células, encontrando embriões em estádios a partir de mórula nos cornos uterinos nove dias pós-coito.

Referências

- Anderson, G. B. 1977. Fertilization, early development, and embryo transfer. *In*: Cole, H. H. & Cupps, P. T. (eds). **Reproduction in domestic animals**. 3. ed. Academic Press, New York, USA, p. 286-314.
- Fingland, R. B. 1996. Útero. *In*: Bojrab, M. J. (ed). **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Roca, São Paulo, Brasil, p. 375-381.
- Goodrowe, K. L.; Howard, J. G.; Wildt, D. E. 1988. Comparison of embryo recovery, embryo quality, oestradiol-17 α and progesterone profiles in domestic cats (*Felis catus*) at natural or induced oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, **82**: 553-561.
- Mansone, F. 1999. **Anestesiologia veterinária: Farmacologia e técnicas**. 3. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 255 pp.
- Renton, J. P.; Boyd, J. S.; Eckersall, P. D.; Ferguson, J. M.; Harvey, M. J. A.; Mullaney, J.; Perry, B. 1991. Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, **93**: 221-231.
- Robertson, I.; Nelson, R. 1999. Certificação e identificação de embriões. In: Stringfellow, D. A. & Seidel, S. M. (eds). Manual da Sociedade Internacional de Transferência de embriões. 3. ed. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Jaboticabal, Brasil [s.l.:s.n.], 180 pp.**
- Swanson, W. F.; Roth, T. L.; Wildt, D. E. 1994. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, **51**: 452-464.
- Tsutsui, T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, **39**: 269-275.

Tsutsui, T.; Hori, T.; Okazaki, H.; Tanaka, A.; Shiono, M.; Yokosuka, M.; Kawakami, E. 2001. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushig. **The Journal of Veterinary Medical Science**, **63** (4): 401-405.

Tsutsui, T.; Shimada, K.; Nishi, M.; Kubo, N.; Murao, I.; Shimizu, T.; Ogasa, A. 1989. An experimental trial on embryo transfer in the dog. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, **51** (4): 797-800.

Tsutsui, T.; Shimizu, T.; Hori, T.; Kawakami, E. 2002. Factors affecting transuterine migration of canine embryos. **The Journal of Veterinary Medical Science**, **64** (12): 1117-1121.

Vannucchi, C. I.; Satzinger, S.; Santos, S. E. C. 1997. Técnica de citologia vaginal como método de diagnóstico da fase do ciclo estral em cadelas. **Clínica Veterinária**, **9**: 14-19.

Vieira, S. 1980. **Introdução à estatística**. 3. ed. Campus, Rio de Janeiro, Brasil, 197 pp.