

ICSI – INJECAO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE EM EQUINOS

JOÃO VITOR CINTRA

Discente do Curso de Medicina Veterinária jvcintra268@gmail.com

LEONARDO MARTINS ESCOLA

Discente do Curso de Medicina Veterinária leomescola86@gmail.com

LUCIANO ANTONELLO

Discente do Curso de Medicina Veterinária lucianox182x@hotmail.com

MARIA JOSÉ CALEGARI

Discente do Curso de Medicina Veterinária majo_cale@yahoo.com.br

PROF. GUILHERME DE LA PENHA CHIACCHIO FERNANDES

Docente da Faculdade Cruzeiro do Sul - guifernandes.vet@gmail.com

RESUMO: Devido ao grande sucesso econômico da equinocultura brasileira, faz-se necessário investir em pesquisas e melhoramento genético. O Brasil conta com vários pesquisadores empenhados em introduzir o método de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), no cotidiano do mercado da reprodução equina. A ICSI é uma técnica de fertilização in vitro por injeção de um único espermatozoide no interior de um óvulo. Muito utilizada na reprodução humana, a ICSI proporciona o uso de óvulos de éguas que não respondem à transferência de embrião e otimiza as chances de uso de garanhões que possuem sêmen de baixa qualidade ou que já faleceram.

Palavras-chave: Aspiração, Equinos, Espermatozóide, Fertilização, ICSI, In vitro, Oócito, Óvulo.

ABSTRACT: Due to the great economic success of Brazilian equine farming, it is necessary to invest in research and genetic improvement. Brazil has several researchers committed to introducing the method of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the daily market of equine reproduction. ICSI is an in vitro fertilization technique by injecting a single sperm into an egg. Widely used in human reproduction, ICSI provides the use of eggs from mares that do not respond to embryo transfer and optimizes the chances of using stallions that have low quality semen or that have already died.

Keywords: Aspiration, Horses, Sperm, Fertilization, ICSI, In vitro, Oocyte, Egg.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil movimentava anualmente cerca de 16 (dezesseis) bilhões de reais no setor de equinocultura, com um plantel aproximado de 06 (seis) milhões de equinos (MAPA, 2016) e apresenta um percentual superior a 40% de toda a produção mundial de embriões. Sendo assim, técnicas cada vez mais apuradas de reprodução se fazem necessárias para maximizar os retornos de investimento em genética.

Mesmo possuindo animais de alto valor agregado, a reprodução assistida em equinos, se desenvolve mais lentamente do que em espécies de produção como bovinos e suínos. As técnicas mais comuns utilizadas para reprodução são a transferência de embriões, a inseminação artificial (IA) e a criopreservação de sêmen de garanhões. Além destas, temos a fertilização in vitro e a clonagem.

Como exemplo, umas das mais recentes técnicas de fertilização in vitro é a da

injeção intracitoplasmática de espermatozoides, conhecida como ICSI. É um procedimento diferente da fertilização in vitro (FIV), visto que em equinos, esta não apresentou resultados devido à falta de métodos e capacitação dos espermatozoides dos garanhões para realizar a fusão no oócito.

A ICSI já era utilizada por países europeus e foi introduzida no Brasil pela IN VITRO Origem Animal, de acordo com os relatos da veterinária e sócia da clínica, Dra. Perla Fleury.

A ICSI consiste em uma técnica um tanto quanto artesanal, onde um espermatozoide é injetado dentro de cada óvulo para ter a produção in vitro dos embriões. Até o ano de 2018, 34 potros já haviam sido gestados por esta técnica e mais 98 gestações estavam acontecendo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O método utilizado para consultas foi a revisão bibliográfica e entrevista à veterinários que fazem uso da técnica. As técnicas de reprodução assistida tiveram início nos anos 60, porém há relatos do uso desta técnica em equinos no final do século XIV, quando Sir Walter Heape utilizou-se da inseminação artificial para induzir uma gestação. ((HEAPE, 1898 apud Cruz, 2014).

A primeira ICSI foi realizada em ouriços do mar, quando Hiramoto em 1962, microinjetou espermatozoides no interior dos oócitos da mesma espécie. Em mamíferos, Uehara e Yanagimachi em 1976, realizaram os primeiros procedimentos de injetar espermatozoides humanos no interior do oócito de hamsters, obtendo a formação de pronúcleos masculinos e concluindo que fatores citoplasmáticos que controlam as transformações do núcleo espermático não são da espécie (Uehara e Yanagimachi, 1976).

Em bovinos, o primeiro uso da técnica resultou na formação de dois pronúcleos, sendo que em 1988 foi registrado o nascimento de um bezerro normal. Neste mesmo ano, foi relatado o nascimento de dois coelhos provenientes da ICSI. Nos humanos o uso da ICSI representou um grande avanço na reprodução assistida (Palhares e Gonzaga, 2019). Nos equinos, objeto deste estudo, há relatos de nascimento do primeiro potro em 1996 (Squires et al.,1996).

A técnica consiste na injeção de um espermatozoide dentro de um óvulo, sendo necessário para isso o desenvolvimento de algumas etapas. São elas:

- Aspiração folicular (OPU)
- Maturação in vitro (MIV)
- Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)
- Cultivo de embriões in vitro (CIV)
- Transferência de embriões (TE)
- Gestação

A aspiração folicular consiste na introdução de um guia de aspiração via vaginal, paralelo à cérvix da fêmea. Este procedimento deve ser realizado com o auxílio do ultrassom direcionado ao folículo que será aspirado. Com manipulação do ovário via retal, é possível posicionar o folículo de forma que a agulha seja introduzida e aspire os oócitos.

A maturação in vitro consiste na preparação do óvulo até o ponto de fertilização. Ela é necessária para que o gameta feminino possua condições de suportar os diversos eventos de fertilização e desenvolvimento embrionário. Os oócitos são colocados em incubadoras para que ocorram as modificações biológicas e redistribuição de organelas tais como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e grânulos corticais, que permitem a fecundação, formação de pró-núcleos e desenvolvimento embrionário normal. (Eppig, 1996 apud Carneiro, 2012).

A ICSI pode ser realizada com sêmen fresco ou congelado que passará por processo de descongelamento. O sêmen é lavado e colocado nas placas de Petri com uma solução de polivinilpirrolidona (PVP), o que reduz a motilidade do espermatozoide por aumentar a viscosidade do meio e permite assim a aspiração deste pela pipeta. Um pouco desta solução de PVP é colocada em nova placa de Petri que servirá de câmara para a microinjeção. Como todo o processo é microscópico, deve ser realizado com micromanipuladores acoplados a um microscópio invertido.

Segundo Cruz (2014):

As injeções são realizadas com uma unidade de Piezo micropipeta - condução (Piezodrill®; Instruments Burleigh Inc. Fisher, NY). O espermatozoide é aspirado para a pipeta (cauda primeiro, se o espermatozoide foi utilizado intacto) e vários pulsos piezo elétrico são aplicados para imobilizar/permeabilizar a membrana plasmática. Relatado por HINRICHS (2005) o espermatozoide selecionado em uma

micropipeta deve ter sua membrana quebrada para garantir que não tenha capacidade de se mover e que fatores citosólicos, importantes na ativação dos oócitos, sejam liberados. Em seguida, proposto por KIMURA et al. (1995) e KUROKAWA et al. (2003), a ponta da pipeta contendo a cabeça do espermatozoide é movida até chegar à zona pelúcida e vários pulsos piezo são aplicados para o avanço da pipeta através da zona. Uma vez no espaço perivitelino, a pipeta é avançada ainda mais contra o oolema até o limite interno de seu córtex. A penetração do oolema é realizada por um ou dois impulsos de piezo de baixa intensidade, sendo a cabeça do espermatozoide injetada. Inicialmente, os laboratórios que trabalhavam com ICSI em equinos tinham dificuldade em conseguir boas taxas de desenvolvimento do embrião após a injeção de espermatozoide. No entanto, em 2000, a utilização do Piezodrill na ICSI foi relatada, para aumentar, a ativação e taxas de clivagem (CHOI et al., 2004). Este dispositivo provoca vibrações minúsculas na pipeta de injeção; isto não só facilita a penetração na zona pelúcida, mas também garante a ruptura das membranas plasmáticas tanto do oócito quanto do espermatozoide. Utilização da broca Piezo para realizar ICSI em oócitos maturados in vitro resultou em mais de 80% de clivagem, com uma média de mais de oito células por embrião clivado em 96 h de cultivo in vitro (CHOI et al., 2004).

Depois de injetados, aproximadamente 20% dos oócitos se tornam embriões e ficam em cultivo de 07 a 08 dias, quando ocorre a identificação dos blastocistos, sendo esta a etapa de cultura in vitro. A transferência dos embriões se dá ao passo que cada blastócito identificado pode ser transferido para uma receptora separadamente onde ocorrerá a gestação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As vantagens do uso da ICSI consistem no melhor aproveitamento genético de animais com alto valor agregado, ou seja, é indicada para éguas doadoras que não possuem resposta ao processo normal de coleta de embriões e, no caso de garanhões, sêmen com baixa motilidade ou viabilidade, além dos sêmens raros de animais que já faleceram. Outra vantagem seria o uso de espermatozoides sexados, visto que a técnica contorna os danos provocados ao gameta masculino na citometria de fluxo necessária para a sexagem.

Em relação à números e taxas, a ICSI apresenta uma taxa de prenhez entre 50 a 60% dos embriões transferidos. Já em relação aos oócitos injetados, 20% se tornam blastócitos e 70% dos aspirados resultam em oócitos, dos quais 65% atingem a maturação.

Quanto ao uso de sêmen congelado ou fresco, estudos apontaram uma taxa de clivagem de 72 % com sêmen fresco e 55% com o congelado (Carneiro, 2012). Uma outra vantagem da técnica é a dosagem utilizada. Na ICSI utiliza-se 1/5 de uma palheta ao passo que nas demais técnicas, utiliza-se de 3 a 5 palhetas, ou seja, na inseminação artificial convencional necessita-se no mínimo de 150 milhões de espermatozoides viáveis e na ICSI apenas 01. A grande desvantagem desta técnica é o custo. Um processo de transferência de embrião custa em torno de R\$5.000,00 e a inseminação artificial varia de R\$1.500,00 a R\$3.000,00 dependendo do local de alojamento ou tipo de sêmen (fresco ou congelado). Já na ICSI, os custos variam de R\$17.000,00 a R\$19.000,00.

4. CONCLUSÃO

A ICSI é uma técnica que, apesar do alto custo é viável para a produção in vitro de embriões. Se mostra uma alternativa para o uso de sêmens de animais com alto valor zootécnico e que a palheta seminal é comercializada a valores exorbitantes e para éguas de esporte. Apresenta como desvantagem além do citado custo, a falta de equipamentos e mão de obra especializada. Pode ser uma importante ferramenta no estudo da viabilidade da FIV em equinos já que esta é mais simples e economicamente viável.

5. REFERÊNCIAS

CARNEIRO, G. F. Técnicas de Reprodução Assistida aplicadas a Equinos (Assisted Reproductive Techniques applied in Horses). Ciência Animal Fortaleza, CE, Brasil, v. 22, p. 308-324, 2012. CHOI, Y. H.; ROASA, L. M.; LOVE, C. C.; VAMER, D. D.;

CRUZ, T. E. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide em Equinos. Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” p. 18, 2014.

HIRAMOTO, Y. (1962) Microinjection of live spermatozoa into sea urchin eggs. Exp. Cell Res. 27, 416-426.

PALHARES, R. C. F.; GONZAGA, D.R. N. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide aplicada à reprodução equina. Revista V&Z Em Minas, Ano XXXIX. Número 142, pág.40, Jul/Ago/Set, 2019.

SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. Veterinary Clinics of North America Equine Practice, v12, p. 31-45, 1996.

UEHARA, T.; YANAGIMACHI, R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol Reprod, v. 15, p. 457-470, 1976.