



## Desafios e atualidades no emprego de técnicas de reprodução assistida em aves selvagens *Challenges and current developments in the use of assisted reproduction techniques in wild birds*

**Ricardo José Garcia Pereira<sup>1,2</sup>, Marcel Henrique Blank<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Correspondência: ricpereira@usp.br

### Resumo

As aves são únicas entre os vertebrados e durante seu processo evolutivo sofreram inúmeras adaptações que culminaram em algumas particularidades em sua fisiologia reprodutiva. Consequentemente, algumas técnicas de reprodução assistida (TRAs) comumente empregadas na conservação de mamíferos ainda não são aplicáveis às aves, por exemplo o congelamento de oócitos e embriões devido à grande quantidade de vitelo, e a criopreservação de sêmen que resulta em baixas taxas de fecundidade (<2%). Portanto, novas abordagens têm sido utilizadas com o intuito de melhorar o desempenho reprodutivo, com o intuito de melhorar a variabilidade genética das populações cativas de espécies de aves ameaçadas. Dessa maneira, nosso objetivo é descrever algumas singularidades reprodutivas atribuídas às aves selvagens, apontando os desafios e as principais técnicas de reprodução assistida exploradas na conservação deste grupo.

**Palavras-chave:** aves, reprodução, conservação, biotecnologias, manejo reprodutivo.

### Abstract

*Birds are unique among vertebrates since they undergone several adaptations during the evolutionary process that ended up in some peculiarities in their reproductive physiology. Therefore, assisted reproduction techniques (ARTs) usually employed in mammal conservation are not applicable in avian species as for example, oocyte and embryo freezing (due to the large amounts of egg yolk) and semen cryopreservation (which culminate in reduced post-thawing fertility – < 2%). Such circumstances demand new approaches aiming to improve reproductive performance in captivity and, in turn, to increase genetic variability of ex situ populations of endangered birds. Thus, our goal is to describe some reproductive features exhibited by wild birds, highlighting challenges and techniques used in the preservation of these vertebrates.*

**Keywords:** birds, reproduction, conservation, biotechnologies, reproductive management.

### Introdução

Nas últimas décadas, a reprodução em cativeiro tem desempenhado um papel fundamental no restabelecimento de algumas espécies de aves em seu ambiente natural. A recuperação das populações do condor-da-califórnia (*Gymnogyps californianus*) e grou-americano (*Grus americana*) são exemplos clássicos da importância da reprodução em cativeiro frente a conservação (Blanco et al., 2009). Embora a prioridade seja sempre a reprodução natural, algumas espécies apresentam grande dificuldade em se reproduzir devido à baixa variabilidade genética e alta suscetibilidade ao estresse de cativeiro, ocasionando baixas taxas de fertilidade (Neumann et al., 2013). Um exemplo é encontrado na ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), que entre os anos de 2004 a 2014, apenas 33 ninhegos eclodiram de 331 ovos postos (Fisher et al., 2014). Por essa razão, estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de minimizar essa ineficiência reprodutiva e, por conseguinte, melhorar a variabilidade genética através do uso de técnicas de reprodução assistida (Blanco et al., 2002; Umaphathy et al., 2005; Villaverde-Morcillo et al., 2015). Ainda que, a grande maioria destes trabalhos apresente um caráter experimental, alguns programas conservacionistas já comprovaram a aplicabilidade de algumas técnicas como a inseminação artificial e a criopreservação de sêmen (Blanco et al., 2007; Bleisbois et al., 2007). Todavia, o uso de tais biotecnologias ainda não apresenta uma aplicação rotineira, e novas abordagens vêm sendo estudadas com o intuito de melhorar o desempenho reprodutivo e, de fato, contribuir com a conservação de aves ameaçadas.

### Coleta de sêmen e inseminação artificial em aves

A inseminação artificial (IA) proporciona por meio prático contornar diversos problemas reprodutivos, como a incompatibilidade entre casais, deficiências físicas que impossibilitam a cópula, agressividade acentuada devido ao “*imprint*” dos animais a humanos, baixa qualidade seminal e assincronia reprodutiva entre machos e fêmeas (Blanco et al., 2009; Pereira, 2014). Além disso, a IA pode ser utilizada em animais isolados geograficamente, ou até mesmo facilitar a introdução de material genético de animais mortos ou de indivíduos selvagens (via amostras de sêmen criopreservadas; Blanco et al., 2009). Contudo, a aplicação de tal biotecnologia

também enfrenta barreiras que impedem sua aplicação em larga escala. A coleta de amostras seminais de boa qualidade é o maior deles pois, diferentemente de galos e perus, o sêmen de espécies selvagens apresenta uma qualidade ruim (com baixo volume e concentração espermática) e em muitos casos a contaminação com urina e fezes é frequente (Gee e Tempel, 1978; Blanco et al., 2009; Pereira, 2014). Outro fator limitante é a alta susceptibilidade das espécies selvagens ao estresse decorrente da constante manipulação para coleta de sêmen e IA, circunstância que em muitos casos interfere na reprodução. Por essa razão, a utilização de aves selvagens extremamente socializadas ou criadas na mão como doadores de sêmen ou recipientes de IA vem sendo explorada (Gee et al., 2004). Adicionalmente, devemos considerar que a grande maioria das espécies selvagens apresentam uma reprodução sazonal, restringindo o uso de tais técnicas a períodos restritos (Blanco et al., 2009).

Visto as dificuldades e particularidades inerentes a cada espécie (isto é, sazonalidade, adaptação ao cativeiro e manejo reprodutivo, socialização da ave e morfologia), podemos optar por três métodos de coleta de sêmen em aves selvagens: coleta cooperativa, massagem manual e eletroejaculação (Gee et al., 2004; Blanco et al., 2009). A coleta cooperativa pode ser utilizada quando as aves mantem uma associação positiva com seres humanos, em que elas passam a reconhecê-lo como parceiro sexual. Neste método, as aves ejaculam voluntariamente em dispositivos especiais (Fig. 1B; p.e. chapéus, manequins, luvas, casacos, poleiros, etc.) em resposta a estímulos comportamentais como vocalização, alimentação e transferência de material para o ninho (Blanco et al., 2007; Lierz, 2008). Embora essa técnica traga algumas vantagens (estresse reduzido e amostras seminais sem contaminação), sua aplicabilidade fica restrita àquelas aves submetidas ao *imprint* a humanos. Outra técnica utilizada é a massagem manual a qual deve ser ajustada à cada espécie (Quinn; Burrows, 1936 – Fig. 2). O método consiste em conter o macho sobre uma superfície de suporte, segurando as pernas da ave, imobilizando suas garras, bico e asas para impedir qualquer lesão à ave e ao manipulador. Em seguida, um segundo técnico estimula o abdômen e o ventre por meio de uma massagem rítmica em direção à porção caudal do corpo da ave. Na maioria dos casos esta massagem manual resulta em um reflexo ejaculatório, constituído pela elevação da cauda e estímulo cloacal (ou intumescimento do falo); porém a coleta só é completada quando o indicador e o polegar de uma das mãos executam uma leve pressão nas laterais da cloaca (Blanco et al., 2009).

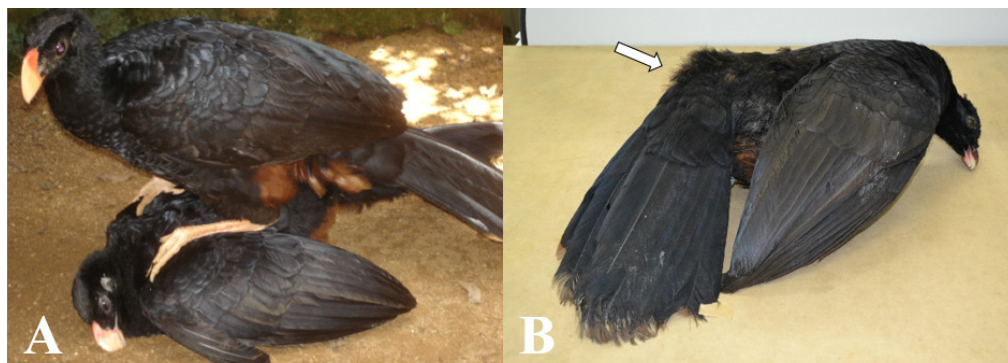


Figura 1. A. Cópula natural de um casal de Mutum-de-Alagoas (*Pauxi mitu*) mantidos no Criadouro Conservacionista Crax – Brasil (Foto: Roberto Azeredo). B. Manequim de fêmea taxidermizada de Mutum-de-Alagoa (*Pauxi mitu*) em posição de cópula (seta branca indica localização do receptáculo para acoplamento de tubo coletor) (Foto: Mayra H. Frediani).



Figura 2. Fotos ilustrativas do método de massagem manual em macho adulto de Mutum-de-Alagoas (*Pauxi mitu*). A. Contenção física e procedimento de “ordenha” da região cloacal para obtenção do sêmen (Foto: João Marcos Rosa). B. Exposição do hemipenis e aspiração do sêmen coletado (Foto: João Marcos Rosa).

Apesar de comumente utilizada em mamíferos, a eletroejaculação não é muito frequente em aves em virtude de seus inconvenientes (p.e. uso de anestesia e contaminação), sendo descrita apenas em Anseriformes, Columbiformes e Psitaciformes (Blanco et al., 2009; Gee; Temple, 1978; Gee et al., 2004). Porém, recentemente, alguns trabalhos envolvendo a coleta por eletroejaculação em Psitaciformes descreveram uma técnica menos impactante, onde não há a necessidade da contenção química (Lierz et al., 2013; Fisher et al., 2014). Após a contenção da ave, uma sonda cloacal compatível ao tamanho da ave é introduzida para a aplicação de estímulos elétricos (2 a 6 séries que variam de 2-6 V), os quais são aplicados em intervalos de dois segundos com pausas de 2 a 5 segundos entre cada estímulo (Fig. 3; Pereira em preparação).

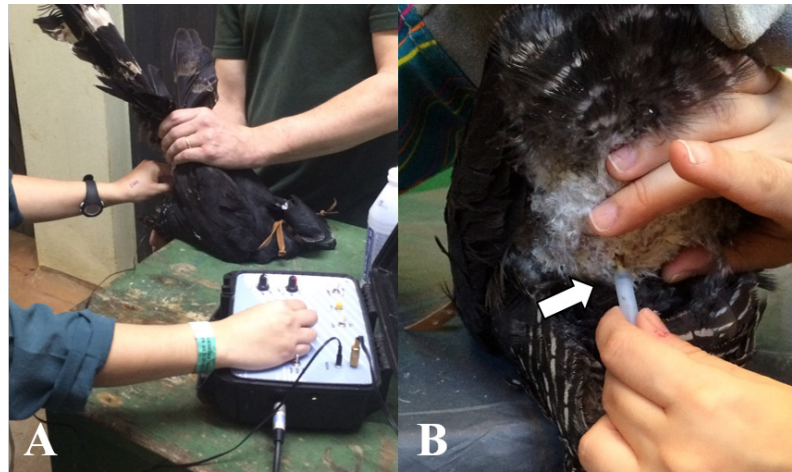


Figura 3. Fotos ilustrativas do método de eletroejaculação em macho adulto de Gavião-Pega-Macaco (*Spizaetus tyrannus*). A. Contenção e física com a utilização de um capuz para minimizar o estresse da contenção (Foto: Mayra H. Frediani). B. detalha do posicionamento da probe (seta branca) na cloaca para a realização do procedimento (Foto: Mayra H. Frediani).

A etapa seguinte a coleta de sêmen é a inseminação artificial (IA) que pode ser realizada com sêmen fresco, refrigerado ou congelado por dois métodos: cooperativo e não-cooperativo. O método cooperativo consiste em utilizar fêmeas criadas na mão onde a ave passa a apresentar uma interação sexual com o manipulador, demonstrando postura copulatória e exposição do oviduto em resposta a estímulos vocais ou outros sinais de corte (Blanco et al., 2009). O método não-cooperativo envolve a contenção física da ave, sendo que a IA pode ser realizado em três sítios de anatômicos distintos. O método mais simples e comumente adotado em aves de pequeno porte (ex. passeriformes e pequenos psitacídeos) é a inseminação cloacal, onde o sêmen é depositado direto na cloaca nos períodos em que as fêmeas estão receptivas, propiciando que o oviduto da fêmea “ordenhe” o sêmen depositado para dentro do oviduto. Esse é um método extremamente rápido e pouco estressante (devido ao baixo tempo de manipulação), mas sua taxa de fertilidade é reduzida em até quatro vezes quando comparada com a inseminação intrauterina (Blanco et al., 2009). Já na inseminação intrauterina é necessário visualizar a entrada do oviduto, processo que pode ser realizado via espéculo cloacal ou pela reversão da cloaca. A técnica do espéculo cloacal consiste na leve inserção do espéculo (geralmente um espéculo nasal humano) com suas lâminas direcionadas para o lado esquerdo da aves para visualização da entrada do oviduto com o auxílio de uma fonte de luz fria (Blanco et al., 2009). Após a visualização da entrada do oviduto, o sêmen pode ser depositado dentro do oviduto através de micropipetas, cateteres “franceses” ou palhetas de inseminação. Em alguns casos o volume e número de espermatozoides no sêmen são muito baixos dificultando o sucesso da inseminação intrauterina. Uma última opção, é a técnica de inseminação intramaginal descrita por Blanco et al, (2002), onde com o auxílio de um endoscópio a palheta de inseminação é inserida no oviduto para depositar o sêmen o mais próximo possível do sítio de fertilização (infundíbulo). Todavia, essa técnica possui alguns entraves tais como a necessidade de anestesia, riscos de contaminação do trato superior, e a exigência de equipamentos e técnicos especializado (Blanco et al, 2009).

Independentemente do uso de fêmeas condicionadas ou não, alguns detalhes ainda devem ser lembrados na tentativa de maximizar os resultados da IA. Vários métodos são descritos em relação ao tempo da IA, aconselha-se que as inseminações sejam iniciadas duas semanas antes do começo da postura (início da estação reprodutiva), sendo o número de inseminações por semana variável de acordo com o tamanho da espécie (p.e. 2 inseminações por semana para aves de grande porte ou 3 inseminações por semana para aves de pequeno e médio porte; Blanco et al., 2009; Lierz, 2008). Outra alternativa é a inseminação da fêmea até uma hora após a oviposição do primeiro ovo da ninhada, uma vez que a ovulação do segundo oócito ocorre dentro desse intervalo. Tal abordagem requer o monitoramento constante do ninho (geralmente feito por câmeras) como intuito de determinar o momento exato da oviposição. Cuidados devem também ser tomados para evitar



contaminações do trato reprodutor feminino e a disseminação de doenças aviárias pela IA. Por exemplo, a contaminação de amostras de sêmen por fezes, a falta de cuidados na introdução do cateter no oviduto, ou a contaminação do diluente pode ocasionar infecções por *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, e *Pseudomonas spp* (Blanco et al., 2009). Concomitantemente, devemos estar atentos àqueles microorganismos em que a transmissão via sêmen já foi comprovada em aves, tais como *Mycoplasma meleagridis*, vírus de Marek, Pox vírus, vírus da anemia das galinhas, vírus da encefalite equina, e vírus Highland J (Blanco et al., 2009).

### Preservação de sêmen em aves

O uso de sêmen para IA nas aves está geralmente associado a protocolos que utilizem sêmen fresco ou resfriado, onde altos índices de fertilidade podem ser encontrados (>88%), mesmo após 48 horas de armazenamento (Wishart, 2009). No entanto, embora o resfriamento de sêmen apresente uma aplicabilidade na circulação de material genético, tal técnica restringe-se às instituições geograficamente próximas devido a curta viabilidade das amostras e também pelas barreiras sanitárias relacionadas ao transporte de material biológico não-congelado.

A respeito da criopreservação de sêmen em aves, sua aplicação mesmo em espécies domésticas ainda é insignificante comparativamente aos mamíferos (Wishart, 2009). O motivo para isso ocorrer, é que nas aves o processo de criopreservação é altamente deletério à capacidade fecundante dos espermatozoides e a suscetibilidade ao processo criogênico parece ser bastante variável entre as diferentes espécies e linhagens de aves (Blesbois, 2007). Por exemplo, estima-se que em galos apenas 2% dos espermatozoides descongelados sejam aptos a fertilização após a inseminação intrauterina (Wishart, 2003). Um dos motivos dessa baixa fertilidade é a necessidade do espermatozoide manter-se viável por períodos prolongados no trato reprodutivo feminino. Neste sentido, vários pontos devem ser considerados sobre a criopreservação de sêmen avícola, visando entender como e quais as alterações que este processo causa na célula espermática (p.e. membranas, núcleo e produção de energia e radicais livres). Dessa forma, para com o intuito de reduzir tais danos celulares decorrentes do congelamento, substâncias crioprotetoras (internas e externas) são adicionadas aos diluidores. Atualmente alguns dos crioprotetores internos mais utilizados em aves são o glicerol, a dimetil-acetamida (DMA), a dimetil-formamida (DMF), o etileno-glicol (EG), e o dimetil-sulfóxido (DMSO). Paralelamente, os crioprotetores externos são a polivinilpirrolidona (PVP) e a trealose. No entanto, é importante lembrar que de todos os crioprotetores citados o glicerol é o único que deve ser removido antes da IA devido a sua ação contraceptiva em aves (Blesbois, 2007; Wishart, 2003).

### Perspectivas futuras

Ao revisarmos as biotecnologias reprodutivas atualmente disponíveis na conservação de germoplasma aviário, percebemos que a única forma de estocagem de material genético é através da criopreservação de sêmen. Contudo, a criopreservação de sêmen em aves não apresenta resultados satisfatórios, e por essa razão sistemas de criopreservação de células do blastoderma e de células germinativas primordiais seguida por transplantes em embriões recipientes vêm sendo pesquisados como uma alternativa na conservação de material genético de aves selvagens (Russel; Griswold, 2000; Dobrinski, 2008; Nakamura et al., 2013). O princípio dessa abordagem é produzir aves quiméricas (ou seja, aves formadas por dois tipos de células geneticamente distintas) que sejam capazes de gerar filhotes da espécie de interesse (Blesbois, 2007; Petite et al., 2004; Laval; Pain, 2010). A produção de filhotes após o uso de transplantes interespecíficos (xenotransplantes) de células do blastoderma ou primordiais em embriões receptores de galinha já foi demonstrada tendo como espécies doadoras patos-reais (*Anus platyrhynchos*), faisões-comuns (*Phasianus colchicus*) e abetardas (*Chlamydotis undulata*) (Li et al., 2002; Kang et al., 2009; Wernery et al., 2010). Esses achados abrem caminho para o estudo futuro dos xenotransplantes empregando outros tipos celulares (p.e. espermatogônias-tronco ou células adultas reprogramadas) ou até mesmo do transplante de tecidos gonadais (técnica conhecida como *xenoenxertos*), metodologias que juntas podem causar um tremendo impacto na preservação da biodiversidade genética de aves raras ou ameaçadas.

### Considerações finais

Para enfrentar os desafios na reprodução de aves ameaçadas, é necessário um amplo conhecimento das particularidades espécie-específicas deste grupo. Dessa maneira, novas metodologias vêm sendo estudadas e aplicadas as aves, a sincronização do período reprodutivo via protocolos hormonais é um método relativamente novo no manejo reprodutivo e que apresenta grande potencial. A administração de GnRH ou uma combinação de eCG e LH já foram testados em algumas espécies de aves selvagens. Contudo, métodos mais simples mostram ótimos resultados, a manipulação do fotoperíodo na estimulação e sincronização da atividade reprodutiva tem sido experimentalmente utilizado em grupos de aves selvagens com o intuito de antecipar a estação reprodutiva e aumentar o número de ninhadas por ano. Vale lembrar que os indivíduos reprodutores apenas respondem a esse



estímulo luminoso se eles previamente passaram por um período de quiescências reprodutiva associado a dias curtos. Recentemente nosso grupo de estudo demonstrou a possível viabilidade dessa metodologia em uma colônia cativa de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*; Ribeiro dados em preparação). Dessa maneira, novas metodologias vão surgindo com o intuito de superar tais barreiras fisiológicas impostas, e aliado a um maior esforço de pesquisa e treinamento de profissionais engajados na área da conservação da avifauna resultados promissores vêm sendo alcançados.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe da Fundação Zoológico de São Paulo, pelo apoio para a realização de diversos projetos conjuntos na área de reprodução de aves. Gostaríamos também de agradecer o Sr. Roberto Azeredo e a Sociedade de Pesquisa e da Reprodução da Fauna Silvestre (CRAX Brasil) pela parceria científica. Assim como, agradecemos a FAPESP e à CAPES, pelo auxílio financeiro para a realização das pesquisas.

### Referências

- Blanco JM, Gee GF, Wildt DE, Donoghue AM.** Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. *J Zoo Wildl Med*, v.33, p.1-7, 2002.
- Blanco JM, Bird DM, Samour JH.** Physiology reproductive. In: Bird DM and Bildstein KL. Raptor research and management techniques. Surrey: Hancock House Publishers, cap. 16c, p.286-292, 2007.
- Blanco JM, Wildt DE, Höfle U, Voelker W, Donoghue AM.** Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.200-213, 2009.
- Blesbois E.** Current status in avian semen cryopreservation. *Poult Sci*, v.63, p.213-222, 2007.
- Dobrinski I.** Male germ cell transplantation. *Reprod. Dom. Anim*, v. 43, p. 288-294, 2008.
- Fischer D, Neumann D, Purchase C, Bouts T, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A and Lierz M.** The Use of Semen Evaluation and Assisted Reproduction in Spix's Macaws in Terms of Species Conservation. *Zoo Biol*, v.33, p.234-244, 2014.
- Gee GF, Temple SA.** Artificial insemination for breeding non-domestic birds. *Symposia of the Zoological Society of London*, v.43, p.51-72, 1978.
- Gee GF, Bertschinger H, Donoghue AM, Blanco J, Soley J.** Reproduction in Nondomestic Birds: Physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. *Avian and Poultry Biology Reviews*, v.15, p.47-101, 2004.
- Kang SJ, Choi JW, Park KJ, Lee YM, Kim TM, Sohn SH, Lim JM, Han JY.** Development of a pheasant interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: effect of donor cell sex, on chimeric semen production. *Theriogenology*, v.72, p.519-527, 2009.
- Lavial F, Pain B.** Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Dev Growth Differ*, v.52, p.101-114, 2010.
- Li ZD, Deng H, Liu CH, Song YH, Sha J, Wang N, Wei H.** Production of duck- chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. *Poult Sci*, v.81, p.1360-1364, 2002.
- Lierz M.** Anatomy and physiology. In: Chitty J and Lierz M. *Manual of raptors, pigeons and passerine birds*. BSAVA, 2008, cap.21, p.235-249.
- Lierz M, Reinshmidt M, Müller H, Wink M, Neumann, D.** A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). *Sci Rep*, v.2066, p.1-8, 2013.
- Nakamura Y, Kagami H, Tagami T.** Development, differentiation and manipulation of chicken germ cell. *Develop. Growth Differ*, v. 55, p. 20-40, 2013.
- Neumann D, Kaleta EF, Lierz MW.** Semen collection and artificial insemination in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) - a potential model for Psittacines. *Tierarztl Prax*, v. 41, p. 101-105, 2013.
- Pereira RJG.** Reprodução das aves. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. *Tratado de animais selvagens medicina veterinária*. 2 ed. São Paulo: Roca: 2014, p. 2235-2269.
- Petitte JN, Liu G, Yang Z.** Avian pluripotent stem cells. *Mech Dev*, v.121, p.1159-1168, 2004.
- Quinn JP and Burrows WH.** Artificial insemination in fowls. *Journal of Heredity*, 27: 31-37, 1936.
- Russel LD, Griswold MD.** Spermatogonial transplantation – an update for the Millennium. *Mol Cell Endocrinol*, v.161, p.117-120, 2000.
- Umaphy G, Sontakke S, Reddy A, Ahmed S, Shivaji S.** Semen characteristics of the captive Indian White-Backed Vulture (*Gyps bengalensis*). *Biol Reprod*, v.73, p.1039-1045, 2005.
- Villaverde-Morcillo S, García-Sanches R, Castanõ C, Rodríguez E, Gonzales F, Esteso M, Santiago-Moreno J.** Characterization of natural ejaculates and sperm cryopreservation in a golden eagle (*Aquila chrysaetus*). *J Zoo Wildl Med*, v. 46, p. 335-338, 2015.
- Wernery U, Liu C, Baskar V, Guerineche Z, Khazanedari KA, Saleem S, Kinne J, Wernery R, Griffin DK, Chang IK.** Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara Bustard





offspring: potential for repopulating an endangered species. PLoS One 5, e15824, 2010.

**Wishart GJ.** The cryopreservation of germplasm in domestic and non-domestic birds. In: Watson PF and Holt WV. Cryobanking the genetic resource. CRC Press, 2003. Cap.11, 180-200.

**Wishart GJ.** Semen quality and semen storage. In: Hocking PM (Ed.). Biology of breeding poultry. Oxfordshire: CAB International, 2009. Cap.10, p.151-178.

---