

Técnicas de Reprodução Assistida aplicadas a Equinos

(Assisted Reproductive Techniques applied in Horses)

Gustavo Ferrer Carneiro*

* Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Av. Bom Pastor s/n
Boa Vista - CEP: 55.296-901 – Garanhuns/PE – Brasil
Correspondência: gustavo@uag.ufrpe.br

RESUMO

Comparada com as demais espécies domésticas, as técnicas de reprodução assistida particularmente a produção *in vitro* tem tido um progresso lento na espécie equina. Com exceção das técnicas de Transferência de Embriões onde o Brasil ocupa lugar de destaque no mundo, estas técnicas estão longe de serem utilizados em protocolos de rotina. Apesar disso houve um avanço, principalmente a partir do desenvolvimento das técnicas de GIFT e ICSI que possibilitaram a utilização de oócitos recuperados de animais post-mortem ou pós-aspiração *in vivo*, desenvolvimento embrionário e geração de prenhez. A técnica da clonagem apesar de se encontrar em uma fase inicial já vem sendo utilizada comercialmente por algumas empresas.

Palavras-chave: equino, biotécnicas da reprodução, ICSI, GIFT, clonagem.

ABSTRACT

Compared with other domestic species, assisted reproductive techniques, particularly *in vitro* production has had a slow progress in the equine species. With the exception of embryo transfer where Brazil occupies a prominent place in the world, these techniques are far from being used in routine protocols. Despite this, it has been a breakthrough, especially from the development of the techniques such as GIFT and ICSI that allowed the use of retrieved oocytes from post-mortem or after aspiration from *in vivo* animals, generating embryonic development and pregnancies. The Cloning technique, despite

being at early stages it is already a reality, and has being used commercially for some Companies.

Keywords: equine, assisted reproductive techniques, GIFT, ICSI, Cloning

INTRODUÇÃO

Apesar da Fertilização *in vitro* (FIV) ser praticamente rotineira nas demais espécies domésticas o mesmo não acontece na espécie equina e diversos obstáculos necessitam ser transpostos para se atingir esse objetivo. Até a presente data, apenas 2 potros foram documentados provenientes de FIV convencional na espécie equina e ambos provenientes de oócitos maturados *in vivo* (Palmer et al, 1991; Bezard et al, 1992). Isto reforça as dificuldades encontradas com relação a maturação *in vitro* dos oócitos equinos e de um sistema adequado de cultivo desses presumíveis zigotos (Hinrichs, 2010). A proporção de oócitos equinos atingindo estágio de maturação *in vitro* tem sido documentada por diversos laboratórios desde o estabelecimento da técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide – ICSI (Dell'Aquila et al. 1997; Lazarrri et al. 2002). Outras técnicas tais como aspiração transvaginal direcionada por ultrassom (OPU), transferência intrafalopiana de gametas - GIFT também tem auxiliado nesses estudos. Diante disso, alguns avanços tem sido atingidos (Galli et al. 2007). Entretanto apesar desses avanços, ainda estamos longe de atingir protocolos de rotina como na espécie bovina. Com relação à técnica de clonagem apesar das dificuldades, já vem sendo utilizada comercialmente com a obtenção de produtos viáveis.

O objetivo desse trabalho foi fazer uma revisão dessas técnicas e nas dificuldades encontradas para executá-las.

Maturação e Fertilização *in vitro* de ovócitos equinos:

Apesar da maturação e fertilização *in vitro* (FIV) serem biotécnicas utilizadas rotineiramente na espécie humana e em diversas outras espécies domésticas, os avanços são limitados na espécie equina. Baseado em diversos estudos, oócitos equinos imaturos são capazes de completar meiose, porém fertilização e desenvolvimento embrionário

dos mesmos tem sido limitado (Zhang et al., 1989; Willis et al., 1991; Shabpareh et al., 1993; Squires, 1996; Goudet et al., 2000). Uma das razões para esse lento desenvolvimento nos estudos da maturação *in vitro* (MIV) nessa espécie é a escassez de abatedouros de eqüinos o que limita a disponibilidade do principal material necessário para esses estudos – ovários e oócitos.

Coleta de oócitos:

Coleta de oócitos de animais post-mortem

A maioria dos estudos de MIV de oócitos eqüinos tem como base o uso de oócitos obtidos de ovários provenientes de éguas encaminhadas para abate. Os ovários são geralmente transportados para o laboratório em solução salina aquecida contendo antibióticos. Oócitos são coletados dos folículos por técnicas de aspiração, curetagem da parede folicular ou através do fatiamento dos ovários. Várias técnicas de coleta oocitária foram testadas com resultados que vão desde 1,75 a 8 oócitos obtidos por ovário (Choi et al., 1993; Shabpareh et al., 1993; Alm & Torner, 1994; Carneiro et al., 2001). A dissecação da túnica albugínea do folículo dá uma maior visualização folicular, aumentando consideravelmente tanto a taxa de recuperação como a qualidade dos oócitos recuperados (Carneiro et al., 2001). O tempo de recuperação dos oócitos também deve ser considerado para evitar o comprometimento dos mesmos. O tempo transcorrido entre a obtenção dos ovários e o início da colheita varia entre grupos de pesquisa, mas aparentemente não afeta a viabilidade dos oócitos se realizados no período de até 6 horas.

Oócitos podem ser obtidos de éguas post-mortem ou que forem encaminhadas para eutanásia e coletados conforme as técnicas descritas acima. Embriões podem ser obtidos a partir da transferência desses oócitos para serem maturados *in vivo* em ovidutos de éguas receptoras (Carnevale et al, 2004). Hinrichs (2010) documentou 21 embriões recuperados de éguas obtidas de clientes post-mortem na Universidade Texas A&M com 13 prenhez confirmadas.

Coleta de oócitos de animais vivos

Duas técnicas podem ser utilizadas: (a) coletas de oócitos maturados *in vivo* recuperados de folículos pré-ovulatório após estimulação por hCG ou análogo de GnRH

(Hinrichs et al. 1990; Carnevale and Ginther 1995); (b) coleta de oócitos imaturos recuperados de todos os folículos visíveis seguido por maturação *in vitro*. Infelizmente, as taxas de recuperação oocitária nessas técnicas de aspiração de folículos imaturos de éguas têm sido muito baixas < 30% (Bruck et al. 1992; Cook et al. 1993). Essas taxas são atribuídas a forte ligação do oócito equino a parede folicular quando comparados com o oócito bovino (Hawley et al. 1995). Cuidados devem ser tomados com relação aos intervalos de aspiração na égua. Foi relatado (Duchamp et al, 1995) uma associação entre aspiração folicular uma vez por semana e redução no número de folículos 8,7 para 4,7 e formação de abscessos (Bogh et al, 2003).

Classificação Morfológica

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo cumulus-oócito (CCO). O conjunto de células próximas da zona pelúcida conectadas ao oócito através das junções interdigitantes (gap junctions) é chamada de corona radiata. Geralmente os oócitos são lavados utilizando-se como meio básico o Meio de Cultivo Celular - TCM-199 (Sigma Chemical, St Louis, MO). A avaliação morfológica dos oócitos baseia-se na homogeneidade do citoplasma e no revestimento celular do CCO. O revestimento celular tem sido classificado em: (1) denudo de células; (2) corona radiata; (3) cumulus compacto; e (4) cumulus expandido. A morfologia do ooplasma é classificada como homogênea, condensada, heterogênea/fragmentada (Del Campo et al., 1995).

Maturação *in vitro*

Durante a oogênese, os oócitos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até momentos antes da ovulação. A retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, ou pela retirada do oócito do ambiente do folículo (Wassarman & Albertini, 1994). Para um oócito ser fertilizado e ter a habilidade de desenvolver é necessário que ocorram maturação nuclear e citoplasmática normais (Eppig, 1996). Ambas são essenciais para o oócito desenvolver a capacidade para fertilização e produção embrionária. Maturação

citoplasmática pode ser classificada como o processo onde o gameta feminino adquire as condições para suportar os diversos eventos da fertilização e desenvolvimento embrionário (Wassarman & Albertini, 1994). Durante este processo, os oócitos passam por modificações ultraestruturais e biológicas que permitem sua fertilização e desenvolvimento. Dentre essas mudanças incluem uma redistribuição das organelas celulares tais como grânulos corticais (GC), mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Wassarman & Albertini, 1994). É necessário que essas mudanças nucleares e citoplasmáticas ocorram simultaneamente integradas, conferindo assim aos oócitos a capacidade de serem fecundados, descondensarem a cabeça do espermatozóide, formarem os pró-núcleos e terem desenvolvimento embrionário normal (Eppig, 1996). A maioria dos estudos em MIV de oócitos eqüinos (Zhang et al., 1989; Willis et al., 1991; Shabpareh et al., 1993; Goudet et al., 1997) avaliam a maturação através da coloração da cromatina dando um mínimo ênfase à avaliação de maturação citoplasmática. Na espécie eqüina, estudos mais aprofundados da maturação citoplasmática são limitados pela ausência de um protocolo efetivo de FIV. Em outras espécies domésticas a migração dos GC têm sido demonstrada como um importante critério de avaliação de maturação citoplasmática. Desta maneira, um novo sistema de mensuração de maturação citoplasmática foi testado nesta espécie através da avaliação de clivagem partenogenética (Carneiro et al., 2001). Posteriormente foi descrito um padrão de distribuição dos GC durante a maturação *in vitro* de oócitos eqüinos comprovando neste estudo que no sistema de maturação proposto, maturação nuclear e citoplasmática ocorreram normalmente (Carneiro et al., 2002a).

Meios de Cultivo

Uma grande variedade de meios de cultivo têm sido avaliados. A maior parte destes protocolos adaptados dos sistemas utilizados em bovinos. O efeito de diferentes componentes do soro, macromoléculas, hormônios, fatores de crescimento e a adição de células somáticas ao meio foram avaliadas (Zhang et al., 1990; Carneiro et al., 2001; Lorenzo et al., 2001; Lorenzo et al., 2002). A regulação da maturação oocitária pelos fatores de crescimento têm sido demonstrada em diversas espécies animais (Carneiro et al., 2001). O mecanismo de ação proposto é através das células do *cumulus* onde foi

identificada presença de receptores (Carneiro et al., 2002b). Os fatores de crescimento agem aumentando a proliferação celular e inibindo apoptose (Kolle et al., 2002). Dentre esses fatores de crescimento, o fator de crescimento semelhante a insulina (insulin-like growth factor-I – IGF-I) tem sido implicado na regulação das funções somáticas do folículo incluindo diferenciação, proliferação celular e produção de esteróides (Reed & James, 1989; Giudice, 1992). O IGF-I desenvolve uma função primordial na maturação *in vivo* de oócitos eqüinos (Carneiro et al., 2002b) tendo ainda sido demonstrado efeito positivo na maturação nuclear e citoplasmática destes oócitos (Carneiro et al., 2001). Os resultados destes trabalhos sugerem uma interação entre fatores de crescimento que agem sinergicamente na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos eqüinos.

Tempo de Cultivo

A maioria dos estudos de maturação de oócitos eqüinos avalia o tempo necessário para se atingir a maturação nuclear atingindo o estágio de metáfase-II. O tempo médio necessário para a maioria dos oócitos encontrar-se nuclearmente maturo oscila de 28-36 horas. A distribuição dos GC durante a maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos foi descrita com o objetivo de mensurar o tempo de maturação citoplasmática (Carneiro et al., 2002a). Naquele estudo foi comprovado que os GC encontram-se aleatoriamente distribuídos no citoplasma no estágio de vesicular germinativa e com o passar do tempo de maturação, ocorre uma migração progressiva destes grânulos do centro para a periferia. Neste estudo foi observado que este tempo ocorria em torno de 30 horas de maturação. Em um estudo sobre a meiose na espécie equina (Carneiro & Liu, 2003), ficou comprovado que a progressão meiótica é afetada pela exposição do IGF-I no meio de cultivo sem efeito aparente na maturação citoplasmática baseado na migração dos grânulos corticais. Este resultado sugere que o tempo de maturação necessária na espécie eqüina está intimamente relacionado com os componentes do sistema de maturação utilizado.

Fertilização *in vitro*

Em diversas espécies domésticas assim como na espécie humana, embriões produzidos *in vitro* fazem parte da rotina. Entretanto na espécie eqüina isto não é regra.

Infelizmente, até esta data apenas 2 embriões foram produzidos de FIV e em ambos casos os oócitos foram coletados de folículos pré-ovulatórios conseqüentemente maturados *in vivo*. As maiores barreiras para atingir o sucesso na FIV são dentre outras, o pouco conhecimento no que concerne ao sistema de maturação e cultivo embrionário *in vitro*, assim como de um sistema eficiente de capacitação espermática *in vitro*. Devido ainda ao número limitado de abatedouros de eqüinos o tempo da coleta dos ovários a aspiração dos oócitos tem variado consideravelmente (18-24 horas) dificultando conseqüentemente os estudos e comprometendo a viabilidade dos oócitos estudados.

Devido ao insucesso adquirido com a FIV na espécie eqüina, técnicas de reprodução assistida como transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e microinjeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) têm sido utilizadas como alternativas.

GIFT

A GIFT clássica caracteriza-se pela deposição de oócitos maduros e espermatozóides capacitados diretamente no oviduto. Na espécie eqüina foi realizado uma modificação deste protocolo, utilizando-se uma GIFT modificada ou a transferência de oócitos (TO) para o oviduto de receptoras inseminadas. Este método tem sido bastante útil para avaliação dos sistemas de maturação. A TO é uma alternativa para o aproveitamento de éguas geneticamente superiores, mas que são incapazes de produzir embriões devido a causas adquiridas. A técnica consiste em transferir oócito da doadora para o oviduto da receptora, a qual é inseminada convencionalmente, antes e/ou imediatamente após a transferência (Carnevale, 2004). Desta forma, a fertilização e o desenvolvimento embrionário e fetal ocorrem *in vivo*, na receptora. O primeiro relato de nascimento de um potro a partir desta técnica ocorreu no final da década de 80, tendo tido uma baixa eficiência de prenhez documentada naquele trabalho (1/15 -7%; Mckinnon et al., 1988). Posteriormente, Carnevale & Ginther (1995) obtiveram 92% de eficiência (11/12) de desenvolvimento embrionário. Os oócitos utilizados são obtidos por aspiração de folículos pré-ovulatórios, assim, a maturação oocitária ocorre *in vivo*. O momento da aspiração é determinado a partir da aplicação do hCG ou GnRH na

doadora com folículo(s) de 35 mm, podendo ser realizada 24 a 36 horas após (Carnevale, 2004). Várias técnicas de colheita de oócitos tem sido descritas, mas a aspiração guiada por ultra-sonografia é a menos invasiva e apresenta índice de recuperação de 77% quando realizada em folículos pré-ovulatórios (Carnevale et al., 2005). Oócitos coletados 36 horas após a administração do hCG estão prontos para a transferência imediata, já aqueles obtidos 24 horas após são usualmente cultivados *in vitro* por 12 a 16 horas antes da transferência (Carnevale, 2004). Éguas cíclicas ou não cíclicas podem ser usadas como receptoras. As cíclicas são sincronizadas com a doadora e tem seu folículo pré-ovulatório aspirado para evitar que seu oócito seja fertilizado. A TO é realizada por procedimento cirúrgico com o animal em estação e acesso pelo flanco, similar aos métodos descritos para a transferência cirúrgica de embriões (Squires & Seidel, 1995). A GIFT, realizada primeiramente por Carnevale et al. (2000), envolve a deposição simultânea do sêmen e do oócito no oviduto da receptora. A vantagem dessa técnica é permitir o uso de baixas quantidades de espermatozóides móveis (2 a 5×10^5) e a taxa de desenvolvimento embrionário varia de 27 a 82%. Esta taxa depende do sêmen utilizado, sendo menor para o sêmen congelado ou resfriado em comparação ao sêmen fresco (Carnevale et al., 2000; Coutinho da Silva et al., 2002).

ICSI

A ICSI também têm sido utilizada e os resultados documentados de taxas de prenhez atingem aproximadamente 60% (Choi et al., 2002b). Nesta técnica, os oócitos são obtidos, maturados, desnudos e em seguida aqueles com o primeiro corpúsculo polar aparente são utilizados. Amostra de sêmen fresco ou descongelado é lavada e colocada em meio com polivinilpirrolidona. A cauda do espermatozóide é seccionada e a cabeça injetada dentro do oócito, sendo este ativado ou não quimicamente e cultivado *in vitro* ou transferido para o oviduto de uma receptora (Squires et al., 1996). A colheita de oócitos maturados *in vivo* através da aspiração transvaginal (oocyte pick-up – OPU) em folículos pré-ovulatórios (Li et al., 1995) transferidos através de GIFT ultrapassa a barreira da maturação *in vitro* e tem proporcionado relativamente altas taxas de prenhez (Carnevale & Ginther, 1995), tendo o inconveniente de não aprofundarmos o conhecimento nos mecanismos envolvidos nos insucessos da MIV e FIV na espécie equina. Vários pesquisadores documentaram a produção de potros utilizando ICSI em

oócitos maturados *in vitro* (Squires et al., 1996; Cochran et al, 1998; McKinnon et al, 2000).

Li et al (2000b; 2001) desenvolveram uma série de estudos com ICSI visando avaliar diferentes ativadores e a utilização de co-cultivo com células do oviduto e fibroblastos fetais durante maturação. Oócitos microinjetados foram cultivados em meio contendo ou não camadas de células do *cumulus*. Blastocistos morfologicamente normais foram transferidos para o útero de receptoras. A média de oócitos clivados foi de 61,6%. Co-cultivo dos oócitos com células do oviduto ou fibroblastos fetais resultaram em maior percentual de embriões que atingiram o estágio de blastocisto comparados com o controle (TCM-199). Seis blastocistos foram transferidos para receptoras e 4 destas ficaram prenhes. Co-cultivo de oócitos eqüinos com células do oviduto e células do cumulus pós ICSI resultaram em 30% de formação de blastocisto. A conclusão dos autores é que o potencial de desenvolvimento pós-ICSI está intimamente relacionado ao sistema de co-cultivo. Choi et al. (2002b) compararam o desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro* e fertilizados por ICSI utilizando-se sêmen fresco ou congelado do mesmo garanhão. Oócitos microinjetados foram cultivados por 20 a 96 horas ou transferidos para o oviduto de éguas receptoras e coletados 96 horas mais tarde. Taxas de fertilização baseado em formação de pró-núcleo e clivagem após 20 horas não foram significantes entre sêmen fresco ou congelado.

Embriões cultivados *in vivo* por 96 horas tiveram um número estatisticamente significativo maior de núcleos em ambos os grupos fresco ou congelado comparado com os ovócitos maturados *in vitro*. A taxa de clivagem pós-ICSI com sêmen fresco foi 72% e 55% usando sêmen congelado. Lazzari et al. (2002) compararam o desenvolvimento embrionário de oócitos eqüinos fertilizados por ICSI em garanhões férteis e sub-férteis. A hipótese testada era se ICSI poderia ser utilizada para prever fertilidade de sêmen congelado. Após microinjeção, os oócitos foram deixados clivar *in vitro*. No dia 2, embriões clivados foram transferidos cirurgicamente para oviduto de ovelha. No dia 7 embriões foram recuperados. Não houve diferença significativa nas taxas de clivagem para os 4 garanhões usados nesse estudo com exceção de um garanhão que não apresentava espermatozóide móvel. As taxas de clivagem para os demais três garanhões foram 75, 63 e 79%.

Desenvolvimentos de embriões clivados para os estágios de mórula compacta ou blastocistos foram 48, 43, 45 e 0% respectivamente para os quatro garanhões. Quatro embriões Grau-I foram transferidos transcervicalmente em pares para 2 receptoras resultando em duas prenhez gemelares. Em outro estudo no mesmo laboratório (Galli et al., 2002), desenvolvimento embrionário pós-ICSI foi comparado para embriões clivados cultivados *in vitro* versus cultivado em oviduto de ovelha. Embriões cultivados em oviduto de ovelha resultaram em 56% de mórula ou blastocisto versus 20% para os cultivados *in vitro*. Dois embriões derivados de cultivo *in vitro* e 10 derivados de cultivo *in vivo* em oviduto de ovelhas foram transferidos para receptoras sincronizadas. Taxa de prenhez foi 100% (2 de 2) e 20% (2 de 10) respectivamente. Em um recente estudo utilizando-se ICSI, observamos (Carneiro et al, 2011) a presença de grânulos corticais pós-fertilização. Grânulos corticais são organelas derivadas do Aparelho de Golgi formados durante os primeiros estágios do desenvolvimento e maturação oocitárias localizadas na região cortical dos oócitos. Após a fusão espermatozóide-oócito, ocorre reação cortical com exocitose do conteúdo dos GC que modificam a morfologia da zona pelúcida prevenindo assim a polispermia (Hoodbhoy and Talbot, 1994). Em roedores e marsupiais, foi demonstrada (Dandekar and Talbot, 1992) a presença de algumas proteínas dos GC no espaço perivitelino pós-fertilização que se manteve até a eclosão do blastocisto. Neste trabalho foi possível identificar a presença de conteúdo do GC pós-fertilização na espécie eqüina. De 18 oócitos microinjetados, 5 fertilizaram (27,7%).

Todos os oócitos fertilizados apresentaram conteúdo de GC próximos aos blastômeros. Apesar de serem dados preliminares podemos confirmar a presença de GC pós-fertilização na espécie eqüina. Futuros estudos serão necessários para compreendermos a função reguladora dessa organela durante a clivagem ou o desenvolvimento embrionário prévio e qual o mecanismo de manutenção no espaço perivitelino pré-fertilização ou se sintetizado de novo pós clivagem.

Clonagem

Em mamíferos, a clonagem de embriões a partir da bipartição teve início com o desenvolvimento das técnicas de Transferência de Embriões e a primeira transferência de blastômeros para oócitos enucleados foi realizada no Canadá (Willadsen, 1989). Entretanto, a produção de um clone a partir de uma célula proveniente de um indivíduo

adulto só foi relatada pela primeira vez em 1997 com o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut et al., 1997). Estes autores conseguiram provar a possibilidade de se induzir células diferenciadas e estas serem capazes de apresentar desenvolvimento embrionário normal. Transferência nuclear é obtida através da fusão de uma célula doadora com um oócito enucleado em estágio de metáfase-II. A fusão com células somáticas pode ocorrer através de eletrofusão ou pela injeção direta de núcleo de células somáticas dentro do citoplasma do oócito da receptora. Em eqüinos, a primeira transferência nuclear para produção de embriões foi publicada por Li et al. 2000a. Os baixos resultados obtidos na FIV possivelmente retardaram os estudos nessa espécie, entretanto com o advento da ICSI foi possível testar a viabilidade de oócitos maturados *in vitro* e produzir embriões destinados à clonagem (Hinrichs et al., 2005). Inicialmente, foram encontradas grandes dificuldades no desenvolvimento da técnica de transferência nuclear tanto na taxa de fusão entre oócitos e células dos doadores, quanto na taxa de clivagem, que eram menores que 15% (Hinrichs, 2006). Apesar disso, Woods et al. (2003) relataram o nascimento de três mulas clonadas e poucos meses depois, foi documentada o nascimento da primeira potra clonada a partir de células diferenciadas (Galli et al., 2003) comprovando o rápido avanço dessa técnica na espécie equina. Posteriormente, Hinrichs et al (2006) relatou o nascimento de dois produtos. A partir de então empresas comerciais entraram no ramo de produção de clones na espécie equina. Uma curiosidade nessa espécie, é que apesar das taxas de perdas embrionárias e fetais documentadas serem elevadas, os potros nascidos não apresentaram os problemas relatados nas demais espécies domésticas não necessitando de assistência obstétrica (Galli et al., 2003; Woods et al., 2003), o que pode fazer dessa espécie um modelo interessante para entendermos os mecanismos da clonagem nas demais espécies.

Considerações Finais

Apesar do avanço que houve nessa área nos últimos anos, vários aspectos ainda necessitam de esclarecimento. Algumas questões estão associadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo. Estudos básicos sobre os diversos mecanismos envolvidos estão sendo conduzidos em diversos laboratórios. As técnicas de reprodução assistida como ICSI e GIFT servem como

alternativas e passam a ser utilizadas com o objetivo de transpor parte desses obstáculos auxiliando em uma maior compreensão dos diversos aspectos envolvidos na MIV de ovócitos eqüinos. Nos estudos em clonagem levantam-se outros questionamentos e maiores estudos serão necessários para esclarecer essas dúvidas. Apesar disso, a técnica de clonagem na espécie eqüina já vem sendo utilizada comercialmente com a obtenção de produtos viáveis comprovando que a indústria do cavalo encontra-se de olhos bem abertos para as pesquisas científicas atuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALM, H.; TORNER, H. In vitro maturation of horse oocytes. *Theriogenology*, v. 42, p.345, 1994.

BÉZARD, J. In vitro fertilization in the mare. *Proceedings International Scientific Conference Biotechnology Horse Reproduction*, p.12, 1992.

BOGH IB, BRINK NS, JENSEN HE, LEHN-JENSEN H, GREVE T. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Veterinary Journal* J 35, 575–579, 2003.

BRUCK I, RAUN K, SYNNESTVEDT B, GREVE T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique (short communication). *Equine Veterinary Journal* 24, 58–59, 1992.

CARNEIRO, G.F.; LORENZO P.L.; PIMENTEL, C.A.; PEGORARO, L.M.; BERTOLINI, M.; BALL, B.A.; ANDERSON, G.B.; LIU, I.K.M. The Influence of Insulin-like Growth Factor-I and Its Interaction with Gonadotropins, Estradiol and Fetal Calf Serum on In Vitro Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 3, p. 899-905, 2001.

CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; HYDE, D.; ANDERSON, G.B.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A. Quantification and Distribution of Equine Oocyte Cortical Granules During Meiotic Maturation and After Activation. *Molecular Reproduction Development*, v. 63, n. 4, p. 451-458, 2002a.

CARNEIRO, G.F.; MUNRO, C.J.; LEUTENEGGER, C.M.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A.; LIU, I.K.M. Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vivo maturation of equine

- oocytes during follicular growth. *Theriogenology*, v. 58, n. 2, p. 685-688, 2002b.
- CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M. Temporal Effect of IGF-I on Nuclear and Cytoplasmic Maturation in Equine Oocytes. *Theriogenology*, v. 59, n. 1, p. 485-485, 2003.
- CARNEIRO, G.F.; LIU, I.K.M.; LORENZO, P.L. Grânulo corticais pós-fertilização na espécie equina: um novo conceito. *XIX Col Bras Reprod Anim.* v.19, p. 245, MG, 2011.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biology of Reproduction Monography*, v.1, p. 209-14, 1995.
- CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SCOTT, T.J.; SQUIRES, E.L. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology*, v.54, p.982-987, 2000.
- CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Ani Reprod Sci*, v.82-83, p.617-624, 2004.
- CARNEVALE E.M., COUTINHO DA SILVA M.A., PREIS K.A., STOKES J.E., SQUIRES E.L. Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. *Proc Am Assoc Equine Pract* 50, 531-533, 2004.
- CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, v.64, p.519-527, 2005.
- CHOI, Y.H.; HOCHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI N. In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology*, v. 40, p. 959-966, 1993.
- CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; CHUNG, Y.G.; VARNER, D.D.; WESTHUSIN, M.E.; BURGHARDT, R.C.; HINRICHS, K. Use of piezo-driven direct nuclear injection and activation with stallion sperm extract to produce horse nuclear transfer embryos. *Theriogenology* 2002a:58:771-774
- CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.; HINRICHS, K. Developmental in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*, v. 123, p. 455-65, 2002b.
- COCHRAN, R.; MEINTJES, M.; REGGIO, B.; HYLAND, D.; CARTER, J.; PINTO, C.; CARTER, J.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R.A. Live foals produced from sperm-

injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal Equine Veterinary Science*, v. 18, p. 736-40, 1998.

COOK NL, SQUIRES EL, RAY BS, JASKO DJ. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Veterinary Journal Supplement* 15, 71–74, 1993.

COUTINHO DA SILVA, M.A.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; SEIDEL JR, G.E.; SQUIRES, E.L. Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. *Journal of Animal Science*, v.80, p.1275-1279, 2002.

DANDEKAR P, TALBOT P. Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Molecular Reproduction & Development*, v.31, p.135-143, 1992.

DEL CAMPO, M.R.; DONOS, X.; PARRISH, J.J. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology*, v. 43, p. 1141, 1995.

DELL'AQUILA M.E., CHO Y.S., MINOIA P., TRAINA V., LACALANDRA G.M., MARITATO F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 12, 2766-2772, 1997.

DUCHAMP G., BÉZARD J., PALMER E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimetres in mares. *Biology of Reproduction Monograph* 1, 233–241, 1995.

EPPIG, JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction Fertility and Development*, v. 8, p. 485-89, 1996.

GALLI, C.; GROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G.; DUCHAMP, G.; DAELS, P.; LAZZARI, G. Frozen-thawed embryos produced by ovum pick-up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology*, v. 58, p. 705-8, 2002.

GALLI, C.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; COLLEONI, S.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. A cloned horse born to its dam twin. *Nature*, v.424, p.635, 2003.

GALLI C., COLLEONI S., DUCHI R., LAGUTINA I., LAZZARI G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging

from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation 502 and somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 98, 39-55, 2007.

GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrinology Review*, v.13, n. 4, p. 641-669, 1992.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 232-245, 1997.

GOUDET, G.; BELIN, F.; MLODAWSKA, W.; BEZARD, J. Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 56, p. 483-492, 2000.

HAWLEY L.R., ENDERS A.C., HINRICHS K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction Monograph* 1, 243–252, 1995.

HINRICHS K., KENNEY D.F., KENNEY R.M. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* 34, 107–112, 1990.

HINRICHS K.; CHOI, Y.H.; LOVE, L.B. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biology of Reproduction*, v.72, p.1142-1150, 2005

HINRICHS K. Equine Cloning. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice* v.22, p.857-866, 2006.

HINRICHS K. In vitro production of Equine Embryos: the State of Art. *Reproduction of Domestic Animals* 45 (Suppl. 2), 3–8 (2010);77.

HOODBHOY, T. AND TALBOT, P. Mammalian cortical granules: Contents, fate and function. *Molecular Reproduction & Development*, v.39, p.439-448, 1994.

KÖLLE, S.; STOJKOVIC, M.; BOIE, G.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Growth hormone inhibits apoptosis in in vitro produced bovine embryos. *Molecular Reproduction & Development*, v. 61, p. 180-6, 2002.

LAZZARI, G.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G.; BARBACINI, S.; GALLI, C. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology*, v. 58, p. 709-12, 2002.

LI, L.Y.; MEINTJES, M.; GRAFF, K.J.; PAUL, J.B.; DENNISTON, R.S.; GODKE, R.A. In vitro fertilization and development of in vitro matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biology of Reproduction Monograph* 1, p. 309-17, 1995.

LI, X.; MORRIS, L.H.; ALLEN, W.R. Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei [abstract]. *Journal of Reproduction & Fertility. Abstr. Ser.*, v.25, p.77, 2000a.

LI, X.; MORRIS, L.A.; ALLEN, W.R. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 119, p. 253-60, 2000b.

LI X, MORRIS LA, ALLEN WR. Influence of coculture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction*, v. 121, p. 925-32, 2001.

LORENZO, P.L.; LIU, I.K.M.; ILLERA, J.C.; PICAZO, R.A.; CARNEIRO, G.F.; ILLERA, M.J.; CONLEY, A.J.; ENDERS, A.C.; ILLERA, M. Influence of Epidermal Growth Factor on the physiological regulation of mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *Journal of Physiology & Biochemistry*, v. 57, n. 1, p. 15-22, 2001.

LORENZO, P.L.; LIU, I.K.M.; CARNEIRO, G.F.; CONLEY, A.J.; ENDERS, A.C. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Veterinary Journal*, v. 34, n. 4, p. 378-382, 2002.

MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR. G.E. Heterogeneous and xenogenous fertilization of in vivo matures equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.8, p.143-147, 1988.

MCKINNON, A.O.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUNSON, A.O. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen/thawed spermatozoa into in vivo-matured mares oocytes. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 56(Suppl), p. 513-27, 2000.

PALMER, E.; BÉZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G. In vitro fertilization in the horse: a retrospective study. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 44(Suppl.), p.375-384, 1991.

REED, M.J.; JAMES, V.H.T. Regulation of steroid synthesis and metabolism by growth factors. *Clinical Endocrinology*, vol.31, p. 511-525, 1989.

SHABPAREH, V.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; JASKO, D.J. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology*, vol. 40, p. 1161-1175, 1993.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin* 8. Colorado State University, Fort Collins, CO, pp.24-26, 1995.

SQUIRES, E.L. Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, vol. 12, p. 31-45, 1996.

SQUIRES, E.L.; WILSON, J.M.; KATO, H.; BLASZCZYK, A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, vol. 45, p. 306, 1996.

WARSSAMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven, 1994. p. 79-122.

WILLADSEN, S.M. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome*, v.31, p.956-62, 1989.

WILLIS, P.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Equine oocyte in vitro maturation: influences of sera, time, and hormones. *Molecular Reproduction & Development*, vol. 30, p. 360-368, 1991.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND, A.J.; CAMPBELL, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

WOODS, G.L.; WHITE, K.L.; VANDERWALL, D.K.; LI, G.P.; ASTON, K.I.; BUNCH, T.D.; MEERDO, L.N.; PATE, B.J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v.301, p.1063, 2003.

ZHANG, J.J.; BOYLE, M.S.; ALLEN, W.R.; GALLI, C. Recent studies on in vivo fertilization of in vitro matured horse oocytes. *Equine Veterinary Journal*, v.8(suppl), p.101-104, 1989.

ZHANG, J.J.; MUZS, L.Z.; BOYLE, M.S. In vitro fertilization of horse follicular oocytes matured in vitro. *Molecular Reproduction & Development*, vol. 26, n. 4, p. 361-365, 1990.