



Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas

Transport and storage of ovarian tissue for use in equine reproductive biotechnologies

R.G. Gomes, M.M. Seneda¹

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

¹Correspondência: mseneda@uel.br

Resumo

As biotécnicas da reprodução na espécie equina têm evoluído vagarosamente quando comparadas às de outras espécies. Diversas questões necessitam de esclarecimento, como capacitação espermática, maturação *in vitro* de oócitos, protocolos de cultivo e também a folliculogênese. O maior entrave quanto ao aproveitamento de oócitos incluídos em folículos ovarianos é a dificuldade em manter a viabilidade folicular após a remoção e o transporte dos ovários. Assim, o desenvolvimento de um meio de transporte, em tempo e temperatura ideais de conservação para os folículos ovarianos, é de suma importância para a utilização de oócitos incluídos em folículos ovarianos para posterior utilização em biotécnicas.

Palavras-chave: conservação, equino, folículo, pré-antral.

Abstract

The biotechnologies of reproduction in the equine species have evolved slowly compared to other species. Several issues need clarification such as sperm capacitation, in vitro maturation of oocytes, culture protocols and also folliculogenesis. The biggest obstacle on the use of oocytes enclosed in follicles is the difficulty in maintaining follicular viability after removal of the ovaries and transportation. Thus, the development of a means of transportation, time and temperature for optimal conservation ovarian follicles is of paramount importance for the use of oocytes enclosed in follicles for later use in biotechnologies.

Keywords: conservation, equine, follicle, preantral.

Introdução

A população mundial de equídeos encontra-se estável nas últimas décadas e é estimada atualmente em 113.473.522 cabeças, sendo 58.770.171 equinos, 43.496.677 asininos e 11.206.674 muares. Deve-se destacar, na última década, a redução da população de equinos na Ásia, principalmente na China, de 8.916.154 cabeças em 2000 para 6.823.465 cabeças em 2008, associada à migração interna da população humana, com menor utilização dos equídeos no transporte e na agricultura e maior consumo de carne equina. Por outro lado, nos Estados Unidos, houve aumento expressivo da população de equinos, de 5.240.000 cabeças em 2000 para 9.500.000 cabeças em 2008, em parte devido a restrições legais internas para o abate e a exportação de carne de equídeos, o que levou ao fechamento de todos os abatedouros de equinos do país (Almeida e Silva, 2010).

No Brasil, a população de equídeos é estimada atualmente em 7.986.023 cabeças, sendo 5.541.702 equinos, 1.130.795 asininos e 1.313.526 muares. A população nacional de equídeos é a quarta maior do mundo, e tem se mantido estável na última década. Na América do Sul, além do Brasil, a produção de equinos é destaque na Argentina, com rebanho estimado em 3.680.000 animais, e na Colômbia, com 2.520.000 animais (Almeida e Silva, 2010).

O Paraná era o estado brasileiro que mais exportava carne equina. Dos sete abatedouros de equídeos que o Brasil possuía, dois estavam localizados no estado do Paraná, um em Santa Fé e outro em Apucarana. No entanto, apenas o de Apucarana encontra-se em plena atividade. Estas unidades exportavam carne para países como Itália, Bélgica, Holanda, Suécia, Suíça e Japão. O número de animais abatidos e de dinheiro movimentado com a exportação de carne equina no Paraná correspondia a mais de 50% da produção nacional de carne equina exportada (Santin, 2010).

A equideocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional não só pelo expressivo número de animais, como também pela excelência de seu plantel. Adicionalmente, a indústria do cavalo é uma importante área geradora de divisas e empregos no Brasil. Hoje, o Brasil é um país de referência na pesquisa e na utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução equina. Contudo, para se manter um país competitivo, faz-se necessária a incorporação de novas biotécnicas para acelerar e facilitar o melhoramento genético (Carmo et al., 2002).

O objetivo da presente revisão é relatar a importância do correto aproveitamento de ovários equinos pós-morte, com ênfase nos critérios de conservação e transporte.



Biotécnicas da reprodução em equinos

Nas últimas décadas, diversas biotécnicas da reprodução assistida têm sido desenvolvidas com a finalidade de aumentar a utilização do potencial reprodutivo em fêmeas mamíferas, tais como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE), a fertilização *in vitro* (FIV), a transgênese, a clonagem, a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e, mais recentemente, a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA; Figueiredo, 1995; Muruvi et al., 2005). Tais técnicas têm despertado grande interesse em criadores e associações de raças equinas. Entretanto, a utilização em larga escala desses procedimentos depende da disponibilidade de oócitos maturados, que constituem uma pequena porção dos oócitos presentes no ovário (Muruvi et al., 2005).

A IA é a biotecnologia da reprodução que mais se mostrou economicamente viável e de fácil implementação em todas as espécies de animais domésticos. Embora o uso da IA em equinos tenha uma citação mais antiga (1322), ela não acompanhou a evolução científica na mesma intensidade como em outras espécies, como bovinos e ovinos. No Brasil, os primeiros registros do uso da IA em equinos foi em 1928, por Lima Corrêa, e as primeiras IAs ocorreram em 1931 e 1932, no Rio Grande do Sul. A espécie equina é a única em que os índices de fertilidade com a utilização da IA ultrapassa os índices da monta natural. Além disso, outras vantagens da utilização dessa biotécnica são o controle sanitário, o progresso genético e a economia do ganhão. No entanto, a IA também tem suas desvantagens, como grande variabilidade e imprevisibilidade na tolerância a diferentes diluidores, refrigeração e congelamento entre os ejaculados dos ganhões (Pimentel e Carneiro, 2008).

As vantagens da TE são a obtenção de produtos de éguas problemáticas e idosas, aumento da produção de éguas geneticamente superiores, obtenção de produtos de éguas que estão em treinamento sem a necessidade de passar pelos processos de gestação e lactação e obtenção de produtos de potras com dois anos de idade sem afetar o seu desenvolvimento (Pimentel e Carneiro, 2008). Diferentemente das outras espécies, nos equinos a transferência de embriões congelados obteve avanços limitados. Entre os fatores responsáveis, há a dificuldade em induzir a superovulação e o fato de o embrião equino estar envolto em uma membrana acelular denominada cápsula, a qual impede a penetração de substâncias crioprotetoras e dificulta o congelamento desses embriões nas fases de blastocisto ou blastocisto expandido. Sendo assim, pesquisas concluíram que os embriões de sexto dia apresentam mais sucesso no processo de criopreservação que embriões de sétimo e oitavo dias (Pimentel e Carneiro, 2008).

Na espécie equina, até o presente momento, há poucos relatos quanto à produção de embriões por meio da FIV, diferentemente do que ocorre em relação a outras espécies. Em razão ainda do número limitado de abatedouros de equinos, o tempo da colheita dos ovários para a realização da aspiração dos oócitos tem uma variação considerável, o que, consequentemente, dificulta os estudos devido ao comprometimento da viabilidade dos oócitos (Pimentel e Carneiro, 2008).

A clonagem é uma biotecnologia que vem sendo aplicada na espécie equina como forma de salvar genética equina de valor. Diversos clones de mueres já foram produzidos por células fetais e também oriundos de células de animais adultos como doadores. Apesar de os estudos iniciais de gestações oriundas de clonagem equina terem uma pobre eficiência quanto ao nascimento desses produtos de clones (75 a 100% das gestações são perdidas), técnicas mais recentes têm sido mais eficientes com taxas de gestações por embriões transferidos e 50% ou mais gestações chegando a termo (Hinrichs, 2006). Recentemente, nasceu o primeiro clone brasileiro oriundo das células armazenadas por 15 anos do ganhão da raça Mangalarga de nome Turbante JO (Nascimento, 2012).

Nos últimos anos, tem se aumentado o interesse quanto à obtenção de potros via reprodução assistida de éguas que morreram subitamente ou foram submetidas à eutanásia devido a questões médicas. Nessas situações, os ovários de éguas podem ser coletados após a morte e processados para a recuperação de oócitos (Preis et al., 2004).

Em equinos, as pesquisas a respeito dos eventos precoces da fertilização têm progredido muito lentamente em comparação às desenvolvidas com outras espécies de animais domésticos. O sucesso na produção *in vitro* de embriões depende de diversos fatores, como disponibilidade de oócitos imaturos saudáveis, capacitação espermática com eficiência, ótimas condições de cultivo e métodos de maturação *in vitro* (Parrish et al., 1986; Xu et al., 1987).

Pesquisas com folículos pré-antrais de outras espécies, como camundongos, resultaram na obtenção de crescimento folicular, formação de antro, ovulação *in vitro* e obtenção de produtos por meio dos procedimentos de FIV e MIV. Até o presente momento, não há nenhuma documentação na literatura quanto à obtenção de progênes de equinos oriundos da MOIFOPA. Além disso, há uma grande escassez de relatos descrevendo a distribuição e a morfologia de folículos pré-antrais de éguas (Szlachta e Tischner, 2008).

Devido à escassez de pesquisas quanto às condições ideais para transporte de tecido ovariano equino, as únicas alternativas atuais são os dados com outras espécies. No entanto, face às importantes diferenças anatomofisiológicas, compreende-se claramente a necessidade do estabelecimento de condições apropriadas para a espécie equina (Ribeiro et al., 2008).



Meios e transporte de ovários para utilização de oócitos na reprodução equina

A diminuta disponibilidade de oócitos para utilização em pesquisas na espécie equina tem sido o principal fator limitante para o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução assistida. No entanto, essa situação pode ser mais bem contornada por meio da utilização do grande número de oócitos que estão inclusos nos folículos pré-antrais ovarianos (Telfer, 1996), os quais estão presentes em números consideráveis (centenas a milhões), dependendo da espécie (Lucci et al., 2004; Lopes et al., 2009; Lima et al., 2010; Faustino et al., 2011).

A redução do número de abatedouros de equinos em todo o continente americano é uma realidade. Essa situação restringe o acesso aos tecidos ovarianos equinos e, conseqüentemente, reduz o progresso das pesquisas com relação a essa espécie (Preis et al., 2004).

Ovários de éguas no *post mortem* constituem uma importante fonte de material biológico para obtenção e cultivo de oócitos. Sendo assim, os fatores relacionados ao transporte desses ovários são fundamentais para as biotécnicas posteriores. Em geral, adota-se empiricamente um meio enriquecido para esse propósito, como TCM-199, solução salina acrescida de antibióticos, solução comercial de lavagem de embrião e PBS (Carnevale e Maclellan, 2006). Um estudo comparativo entre meios seria essencial, pois a qualidade do oócito incluso no folículo pré-antral depende do meio, do tempo e da temperatura para sua correta conservação e transporte até o laboratório (Matos et al., 2004).

Neste contexto, o estabelecimento de protocolos ideais (meios, tempo e temperatura) de conservação do tecido ovariano torna-se importante quando se utilizar folículos pré-antrais nas biotécnicas da reprodução (Andrade et al., 2002; Costa et al., 2005), pois o sucesso na criopreservação e ou cultivo de folículos pré-antrais depende da qualidade dos oócitos inclusos nesses folículos (Andrade et al., 2001; Carvalho et al., 2001).

Diversas pesquisas têm sido relatadas quanto à conservação em curtos períodos de folículos pré-antrais em diferentes meios e temperaturas em outras espécies como caprinos (Silva et al., 2000; 2001; Carvalho et al., 2001; Ferreira et al., 2001), ovinos (Andrade et al., 2001, 2002; Matos et al., 2004), camundongos (Eppig e O'Brien, 1996), bovinos (Figueiredo et al., 1994; Gutierrez et al., 2000; Lucci et al., 2004), humanos (Roy e Treacy, 1993), búfalos (Sharma et al., 2009), caninos (Lopes et al., 2009) e suínos (Lucci et al., 2007). Porém, na espécie equina, pouco se tem publicado quanto a protocolos de conservação do tecido ovariano para posterior cultivo ou recuperação de oócitos.

A temperatura de transporte afeta muito a qualidade do oócito equino, sendo reportadas até o presente momento temperaturas como 4°C, 9 a 16°C, 22 a 30°C e 30 a 35°C. Nesses experimentos, foram observados que os ovários não podem permanecer mais que três horas entre 20 e 30°C ou mais que duas horas de 35 a 37°C, no intuito de prevenir a apoptose de células da granulosa (Carnevale e MacLellan, 2006).

O transporte dos ovários até os laboratórios requer um tempo de armazenagem para o processamento. Os períodos descritos na literatura têm variado de uma a 24 horas. No entanto, alguns estudos reportaram altas taxas de maturação oocitária quando esses oócitos foram coletados diretamente no abatedouro, sugerindo que um curto período de transporte até o laboratório poderá influenciar a competência meiótica do oócito (Carnevale e MacLellan, 2006).

Alguns autores têm reportado o efeito de tempos e temperaturas de transporte de ovários equinos oriundos de abatedouros para posterior colheita de oócitos. Del Campo et al. (1995) transportaram ovários equinos inteiros em solução salina em temperaturas variando de 30 a 35°C por três a 15 horas e obtiveram taxas de maturação oocitária de 49%. Guignot et al. (1999) relataram que ovários equinos podem ser transportados por até seis a oito horas em temperaturas variando de 27 a 37°C, com taxas de maturação em torno de 37 a 44%. Contrariamente, Love et al. (2003) obtiveram resultados inferiores quanto à maturação oocitária quando os ovários foram mantidos por longos períodos (três a nove horas) nessas mesmas condições.

Sendo assim, apenas um artigo até o presente momento testou meios, tempos e temperaturas ideais para transporte de fragmentos ovarianos sem que os folículos apresentassem degeneração e pudessem ser utilizados em biotécnicas. Foram feitos testes nos meios PBS (Phosphate-buffered Saline) e MEM (Meio Essencial Mínimo), nas temperaturas (4, 20 e 39°C) e nos tempos (quatro, 12 e 24 horas). Os resultados evidenciaram que apenas a 4°C por quatro horas em PBS os folículos inclusos em fragmentos ovarianos equinos não apresentaram degeneração, o que elucida a fragilidade desses folículos equinos em manter a sua viabilidade (Gomes et al., 2012).

Considerações finais

Apesar dos grandes avanços das biotécnicas da reprodução na espécie equina nos últimos anos, diversos aspectos ainda necessitam de esclarecimento. As principais questões estão associadas com a avaliação da competência biológica dos gametas e com o próprio sistema de cultivo.

Pelo fato de o tecido ovariano de éguas no *post mortem* representar a última possibilidade de obtenção de produtos com o devido valor genético, esse material é considerado insubstituível, o que enfatiza mais expressivamente a importância da conservação ideal desse material genético para posterior manipulação.

A correta conservação do tecido ovariano com a manutenção da viabilidade dos gametas femininos



requer condições ideais de temperatura, meios e período de conservação. Sendo assim, até o presente momento, a forma ideal de armazenagem desse material é a 4°C em PBS por até quatro horas.

Referências

- Almeida FQ, Silva VP.** Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.119-129, 2010.
- Andrade ER, Amorim CA, Costa SHF, Ferreira MAL, Rodrigues APR, Dode MAN, Figueiredo JR.** Preliminary study of short-term preservation of ovine ovarian tissue containing preantral follicles in saline solution or TCM199. *Vet Rec*, v.151, p.452-453, 2002.
- Andrade ER, Rodrigues APR, Amorim CA, Carvalho FCA, Dode MAN, Figueiredo JR.** Short-term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0,9% saline and Braun Collins solutions. *Small Rumin Res*, v.41, p.141-149, 2001.
- Carmo MT, Trinquen CLN, Lima MM, Medeiros ASL, Alvarenga MA.** Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.252-254, 2002.
- Carnevale EM, MacLellan LJ.** Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.22, p.843-856, 2006.
- Carvalho, F.C.A, Lucci, C.M, Silva, J.R.V, Andrade, E.R, Bão, S.N, Figueiredo, J.R.** Effect of Braun-collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.195-208, 2001.
- Costa SHF, Andrade ER, Silva JRV, Rodrigues APR, Amorim CA, Lôbo RNB, Ohashi OM, Figueiredo JR.** Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. *Small Rumin Res*, v.58, p.189-193, 2005.
- Del Campo MR, Donoso X, Parrish JJ, Ginther OJ.** Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology*, v.43, p.1141-1153, 1995.
- Eppig JJ, O'Brien MJ.** Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod*, v.54, p.197-207, 1996.
- Faustino LR, Silva CMG, Rosseto R, Rodrigues GQ, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.3-15, 2011.
- Ferreira MAL, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.109-123, 2001.
- Figueiredo JR.** Isolement, caractérisation et culture et follicules préantraux chez les bovins. 1995. 113f. Thèse (PhD)- Université de Liège, Liege, Belgique, 1995.
- Figueiredo JR, Hulshof SCJ, Van Den Hurk R, Nussgens B, Bevers MM, Ectors FJ, Beckers JF.** Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v.41, p.1333-1346, 1994.
- Gomes RG, Andrade ER, Lisboa LA, Ciquini A, Barreiros TRR, Fonseca NAN, Seneda MM.** Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*, v.78, p.731-736, 2012.
- Guignot F, Bezaud J, Palmer E.** Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after in vitro maturation. *Theriogenology*, v.52, p.757-766, 1999.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb, R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- Hinrichs K, Carnevale EM.** Equine cloning. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.22, p.857-866, 2006.
- Lima GL, Costa LLM, Cavalcanti DMLP, Rodrigues CMF, Freire FAM, Fontenele-Neto J, Silva AR.** Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP®)-based medium. *Theriogenology*, v.74, p.146-152, 2010.
- Lopes CP, Santos RR, Celestino JJH, Melo MAP, Chaves RN, Campello CC, Silva JRV, Bão SN, Jewgenowb K, Figueiredo JR.** Short-term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.201-214, 2009.
- Love LB, Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K.** Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*, v.59, p.765-774, 2003.
- Lucci CM, Kacinskis MA, Rumpf R, Bão SN.** Effect of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, v.61, p.461-472, 2004.
- Lucci CM, Shreier LL, Machado GM, Amorim CA, Bão, SN, Dobrinsky JR.** Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.76-82, 2007.
- Matos MHT, Andrade ER, Lucci CM, Bão SN, Silva JRV, Santos RR, Ferreira MAL, Costa SHF, Celestino JJH, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0,9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*, v.62, p.65-80, 2004.



- Muruvi W, Picton HM, Rodway RG, JoyceIM.** In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology*, v.64, p.1357-1370, 2005.
- Nascimento S.** Nasce em SP o primeiro clone equino do Brasil. 2012. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI319660-18530,00-NASCE+EM+SP+O+PRIMEIRO+CLONE+EQUINO+DO+BRASIL.html>. Acesso em: 22 de jan. 2013.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL.** Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- Pimentel CV, Carneiro GF.** Biotécnicas aplicadas à reprodução de equinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.145-159.
- Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, MacLellan LJ, Squires EL.** *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22°C. *Theriogenology*, v.61, p.1215-1223, 2004.
- Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K.** Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim Reprod Sci*, v.108, p.171-179, 2008.
- Roy SK, Treacy BJ.** Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.
- Santin, Wilhan.** PR: Estado é o campeão da carne de cavalo. Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/noticia/95426/estado-e-o-cdeao-da-carne-de-cavalo>. Acesso em: 08 ago. 2010.
- Sharma GT, Dubey PK, Meur SK.** Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. *Livest Sci*, v.123, p.300-305, 2009.
- Silva JRV, Bão SN, Lucci CM, Carvalho FCA, Andrade ER, Ferreira MAL, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.66, p.109-123, 2001.
- Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bão SN, Costa SHF, Santos RR, Figueiredo JR.** Effect of coconut water and braun-collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Theriogenology*, v.54, p.809-822, 2000.
- Szlachta M, Tischner M.** Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. *Havemeyer Foundation Mono Ser*, n.5, p.33-e5, 2008.
- Telfer EE.** The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v.45, p.101-110, 1996.
- Xu KP, Greve T, Callesen H, Hyttel P.** Pregnancy resulting from cattle oocyte matured and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.81, p.501-504, 1987.
-