



Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões em equinos

In vivo and *in vitro* production of equine embryos

Gustavo Ferrer Carneiro

Unidade Acadêmica de Garanhuns - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil.

Correspondência: carneirogustavo1@gmail.com

Resumo

A produção de embriões equinos *in vivo* ou *in vitro* tem como objetivo principal uma maximização da eficiência reprodutiva, principalmente por que a espécie equina é reconhecida por ter uma capacidade reprodutiva menor que as demais espécies. O objetivo desse trabalho foi fazer uma revisão nas principais técnicas de produção embrionária *in vivo* e *in vitro* na espécie equina. A produção *in vivo* a partir da transferência de embriões (TE) tornou-se uma técnica rotineira e o Brasil se destaca entre os países de maior produção de embrião *in vivo* por essa técnica no mundo. Já com relação à produção *in vitro* apesar do grande avanço adquirido nos últimos anos, vários aspectos ainda necessitam de esclarecimento. Desde a coleta de oócitos por aspiração folicular no animal vivo ou post-mortem, passando pela maturação oocitária *in vitro*, indo pelas técnicas de transferência de oócitos (TO) ou de transferência intra falopiana dos gametas (GIFT) e a abordagem da técnica de Fertilização *in vitro* (FIV) ainda sem sucesso na espécie equina e a transposição dos obstáculos encontrados a partir da técnica de microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Abordamos ainda os aspectos mais recentes da clonagem na espécie equina auxiliando em uma maior compreensão dos diversos aspectos envolvidos nessa biotecnologia. Concluímos que maiores estudos serão necessários para compreendermos alguns dos mecanismos propostos e esclarecermos essas dúvidas.

Palavras-chave: equino, maturação, fertilização, microinjeção, clonagem.

Abstract

The production of equine embryos in vivo or in vitro has as main objective to reach a maximum reproductive efficiency, especially because the equine is recognized for having a less reproductive capacity among other species. The objective of this work was to review main techniques of embryo production in vivo and in vitro in the equine species. In vivo production from embryo transfer (TE) has become a routine technique and Brazil stands out among the countries with the highest production of in vivo embryos by this technique in the world. With regard to in vitro production despite the breakthrough acquired in recent years, many aspects still require clarification. From the oocyte recovery by follicular aspiration in living animal or in post-mortem, oocyte in vitro maturation, going to oocyte transfer techniques or Gamete Intra Fallopian Transfer and the approach of the technique of in vitro fertilization (IVF) yet without success and the transposition of obstacles encountered using Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) technique. We discuss the latest aspects of cloning in the equine species aiding in a better understanding of the various aspects involved in this biotechnology. We conclude that further studies will be necessary to understand some of the proposed mechanisms and clear these doubts.

Key words: equine, maturation, fertilisation, microinjection, cloning.

Introdução

A transferência de embriões (TE) consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora geneticamente superior e a transferência deste embrião para uma fêmea receptora que se encarregará de levar a gestação a termo. Trata-se da técnica de reprodução assistida mais utilizada na indústria equina, depois da coleta de sêmen e inseminação artificial (Hartman, 2011). É uma biotécnica rotineiramente utilizada na indústria equina que surgiu na década de 80 do século passado como uma ferramenta para produzir embriões de éguas problemáticas ou de idade avançada e que tem se expandido e se tornado como procedimento de eleição em fêmeas de praticamente todas as idades reprodutivas (McKinnon e Squires, 2007).

Com a popularização da técnica observou-se um enorme desenvolvimento na equideocultura nacional, principalmente evidenciado pela população equina no Brasil. O Brasil detém o maior rebanho da América Latina e o terceiro em âmbito mundial com um total de equídeos atingindo a marca de 8 milhões de cabeças, fazendo girar algo em torno de R\$ 7,5 bilhões com a produção de cavalos, e juntamente com Estados Unidos e Argentina lidera a produção de embriões no mundo (Alvarenga, 2010).

O Agronegócio Cavalos é responsável pela geração de mais de 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos atingindo mais de 30 segmentos diferentes entre insumos, criação e destinação final. Se formos destacar os esportes equestres, somente a Vaquejada – evento de caráter cultural e esportivo com localização



predominante na Região Nordeste, movimenta mais de 800.000 empregos diretos e indiretos, movimentando mais de 60 milhões de dólares/ano. Tais indicadores econômicos são extremamente importantes e demonstram a importância da Indústria Equina como um novo conceito de negócio ou de economia de mercado. (MAPA, 2016).

Apesar do avanço nessa técnica em termos de produção *in vivo* de embriões equinos, sua aplicação comercial torna-se limitada quando comparada com os animais de produção (bovino, caprinos e ovinos) em virtude da dificuldade de superovulação nessa espécie (Riera, 2009). Outro fator limitante é a utilização de fêmeas mais velhas utilizadas repetidamente como doadora, que além de diminuir a taxa de recuperação embrionária torna-se também um fator de melhoramento genético mais lento (Alvarenga, 2010).

Independente desses fatores limitantes a TE é uma biotécnica totalmente dominada e que pode ser uma ferramenta de muito valor para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos assim como incrementar o melhoramento genético a partir da maximização reprodutiva de fêmeas geneticamente superiores (Carneiro, 2010).

Da mesma forma, quando nos deparamos com produção *in vitro* de embriões equinos, o avanço também é limitado quando comparado às espécies de produção. Apesar da Fertilização *in vitro* (FIV) ser uma técnica rotineira nas demais espécies domésticas o mesmo não acontece na espécie equina e vários 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; Bezar et al., 1992). Isto reforça as dificuldades encontradas quer seja com relação a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos equinos ou mesmo de um sistema de cultivo *in vitro* adequado para manter esses presumíveis zigotos (Hinrichs, 2010). A dificuldade na área de pesquisa nessa espécie é a escassez de abatedouros de equinos o que limita a disponibilidade do principal material necessário para esses estudos, ou seja, ovários e oócitos. Oócitos equinos atingindo estágio de maturação *in vitro* tem sido documentado por vários laboratórios desde o estabelecimento da técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide – ICSI (Dell'Aquila et al., 1997; Lazzari et al., 2002). Outras técnicas tais como aspiração transvaginal direcionada por ultrassom (OPU), transferência de oócitos (TO) e 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 (Maserati e Fleury, 2015).

Portanto, o objetivo deste trabalho, foi realizar uma revisão na produção embrionária *in vivo* e *in vitro* na espécie equina, tentar debater um pouco das dificuldades encontradas e quais as perspectivas futuras com o intuito de incrementar a eficiência reprodutiva nessa espécie.

Produção *in vivo* de embriões equinos

Transferência de embriões (TE)

A TE consiste na colheita de um ou mais embriões de uma égua doadora geneticamente superior, sendo o mesmo transferido para o útero de uma receptora que levará a gestação a termo (Andrade, 1986).

O primeiro relato de TE em animais de laboratório (coelha), foi em meados de 1890, na Universidade de Cambridge-Inglaterra, por Walter Heaper, porém sem sucesso (Gonsalves et al., 2002).

Na espécie equina, estudos envolvendo a TE foram realizados em 1969 por um grupo de pesquisadores japoneses. Mais tarde (1972), esse mesmo grupo relatou uma taxa de 45% de sucesso nas colheitas dos embriões, porém nenhuma concepção foi confirmada (Oguri e Tsutsumi, 1972). Dois anos mais tarde, os mesmos pesquisadores seguindo a mesma linha de estudo, coletaram 18 embriões em 20 éguas, transferindo apenas 15 destes, pelo método não cirúrgico transcervical para as receptoras, obtendo 40% de concepção (Oguri e Tsutsumi, 1974).

O primeiro potro nascido fruto do programa TE foi relatado em 1972 na Inglaterra, utilizando-se da técnica cirúrgica (Andrade, 1986).

No Brasil, a TE na espécie equina teve seu marco inicial em 1987, através Médico Veterinário João Junqueira Fleury, sendo responsável por inúmeros experimentos, contribuindo imensamente para o nível que se encontra hoje no país. Seja realizado pelo método cirúrgico (Fleury et al., 1987), ou pelo método não cirúrgico (Meira e Henry, 1987).

Na região Norte-Nordeste do Brasil, a primeira prenhez por TE em equinos documentada foi realizada em 1996 (Carneiro e Liu, 1996), com nascimento do primeiro potro da raça Mangalarga Marchador em 1997.

Apesar de largamente difundida e utilizada em todo país, a aplicação da TE ainda é restrita devido ao seu custo, sendo direcionada para animais de alto valor genético, principalmente para animais que atuam em esportes ou exposições de animais (Squires et al., 1999).



Produção *in vitro* de embriões equinos

Coleta de oócitos post-mortem ou eutanasiados

A maioria dos estudos de MIV de oócitos equinos tem como base o uso de oócitos obtidos de ovários provenientes de éguas encaminhadas para abate ou éguas em estado terminal nos hospitais das Universidades que pesquisam essa área. 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 (Choi et al., 1993; Shabpareh et al., 1993; Alm e 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. 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 (Carneiro et al., 2001). Oócitos podem ser obtidos também de éguas que forem encaminhadas para eutanásia, coletados conforme as técnicas descritas acima (Carnevale et al., 2004).

Coleta de oócitos de animais vivos

Podem ser utilizadas duas técnicas:

- a) coleta de oócitos maturados *in vivo* aspirados de folículos pré-ovulatório após indução por hCG ou análogo de GnRH (Carnevale e Ginther 1995);
- b) coleta de oócitos presumivelmente imaturos recuperados de todos os folículos visíveis seguido por MIV. As taxas de recuperação oocitária nessas técnicas de aspiração de folículos imaturos de éguas têm sido baixa < 30%. 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). Outros pesquisadores relatam ótima taxa de recuperação em aspirações constantes a cada 15 dias (Richard Beck, 2016 comunicação pessoal).

Criopreservação de oócitos

A criopreservação de oócitos tem demonstrado importante valor na reprodução assistida em humanos, devido ao fato de ultrapassar barreiras éticas, morais e religiosas encontradas na conservação de embriões nessa espécie (Fabbri et al., 2000). Em equinos pode-se estabelecer um paralelo com a situação em humanos, não devido a fatores sociais, mas sim devido à dificuldade na criopreservação dos embriões. O embrião equino é envolto por uma cápsula glicoproteica acelular que dificulta a penetração de crioprotetores, tornando o congelamento mais um obstáculo a ser transposto (Eldridge-Panuska et al., 2005).

A criopreservação de oócitos equinos continua a ser um desafio devido aos baixos índices de sobrevivência e desenvolvimento celular. Além disso, grande parte dos estudos utiliza oócitos maduros, devido aos melhores resultados obtidos comparado com oócitos imaturos (MARA et al., 2013). Isso limita ainda mais o número de oócitos disponíveis para tais estudos.

Clinicamente, quando oócitos são recuperados post-mortem de éguas que sofrem morte prematura, os proprietários devem decidir imediatamente qual ganhão será destinado para produzir os últimos embriões obtidos a partir deste animal. Os proprietários compreensivelmente desejam ter a capacidade de decidir isso no futuro. Além disso, mesmo se um ótimo ganhão é conhecido pelo proprietário da égua, às vezes não é possível obter o sêmen desejado a tempo, optando-se assim por um ganhão menos adequado (Hinrichs, 2013).

Maturação Oocitária

*Oócitos recuperados de folículos pré-ovulatórios (Maturados *in vivo*)*

Estes oócitos são aspirados a partir de um folículo pré-ovulatório de uma égua que já iniciou o processo de retomada da meiose, precisando ser mantido até atingir o estágio de Metáfase-II. Geralmente são aspirados 24 horas após indução por hCG ou GnRH e cultivados por 12-18 horas antes de serem usados para transferência de oócitos ou ICSI (Hinrichs et al., 1998, 2010; Jacobson et al., 2010). Oócitos recuperados de folículos pré-ovulatórios 24 horas após estímulo hormonal encontram-se em estágio de Metáfase-I, enquanto que os oócitos recuperados 35 horas após a indução hormonal encontram-se em estágio de metáfase-II (Bézar et al., 1997).



Maturação in vitro (MIV)

A MIV pode ser atingida utilizando-se meios básicos de maturação, tais como M199 associado a gonadotrofinas (5mUmL de FSH bovino), 10% SFB em estufa com 5% de CO₂ a 38°C (Carneiro et al., 2001). Quando os oócitos são recuperados dos ovários, as células do cumulus estão intactas e podem ser classificadas em Compactas ou Expandidas. Como nas demais espécies, oócitos com células do cumulus compacta são originados de folículos viáveis, enquanto que as células expandidas são provenientes de folículos que já iniciaram possivelmente um processo de atresia. Entretanto, um achado interessante na espécie equina é que em contraste com a espécie bovina, oócitos que apresentam células do cumulus expandidas apresentam uma taxa de maturação muito superior ao de células compactas (65% vs. 20%, respectivamente; Alm e Hinrichs, 1996). Após a MIV, oócitos com células compactas ou expandidas apresentam taxa de maturação similares. Acredita-se que a maioria do oócitos compactos são provenientes de folículos pequenos, visto que a aquisição da competência meiótica aparentemente ocorre em folículos acima de 20 mm de diâmetro e a maioria dos folículos processados são menores que esse tamanho (Hinrichs e Schmidt, 2000).

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 e 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 e 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 equina, 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).

Transferência de oócito (TO)

Trata-se do procedimento da deposição do oócito maduro, no oviduto de uma receptora previamente inseminada. A fertilização, o desenvolvimento embrionário e fetal ocorrerá no trato reprodutivo da receptora. Trata-se de um método de Técnica de Reprodução Assistida que foi desenvolvida para uso clínico e de pesquisa com o objetivo de se conseguir prenhez de éguas consideradas inférteis. O requerimento básico é a doadora fornecer um oócito viável. O primeiro relato com sucesso TO foi realizado por Carnevale e Ginther em 1995. Nesse estudo, foi reportado uma taxa de prenhez de 83% (Carnevale e Ginther 1995) e posteriormente a mesma autora demonstrou que essa alta taxa de prenhez apresenta repetibilidade quando se utiliza éguas e garanhões férteis (Carnevale et al., 2000, 2001a, 2001b, 2003 e 2004). A receptora pode ser cíclica ou não cíclica. Estudos tem demonstrado mesma taxa de prenhez em ambas categorias (Carnevale et al., 2005).

Receptoras cíclicas

O oócito da receptora é coletado antes da transferência. Se a receptora apresentar dois folículos, evita-se usá-la, para não ter o risco de uma prenhez indesejada. Receptoras cíclicas podem ser usada no início do estro quando o folículo dominante encontra-se pequeno (< 30 mm) e a cérvix relaxando. Prostaglandina pode ser administrada em receptoras que se encontravam em diestro e estradiol também pode ser utilizado para induzir edema endometrial e relaxamento de cérvix. Após a transferência, deverá iniciar tratamento com Progesterona sintética na receptora. É muito importante reiterar que a transferência de oócito tem o potencial de gerar uma gestação com o oócito da própria receptora, por mais cuidados que o técnico venha a ter (Carnevale et al., 2005).

Receptoras acíclicas

Éguas com reduzida atividade folicular podem ser utilizadas como receptoras. A grande vantagem dessas éguas é a menor possibilidade de haver uma ovulação e a sincronização com a doadora tornar-se mais



fácil. Tratamentos com o intuito de reduzir a atividade folicular foram utilizados através da utilização de deslorelina, entretanto os resultados não foram tão satisfatório no que diz respeito a sincronização entre doadora e receptora (Carnevale et al., 1999).

Transferência Intrafalopiana de Gametas (GIFT)

A GIFT caracteriza-se pela deposição cirúrgica de oócitos maduros e espermatozóides capacitados diretamente no oviduto. 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 5×10^6) 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).

Fertilização in vitro (FIV)

Em diversas espécies domésticas assim como na espécie humana, embriões produzidos *in vitro* fazem parte da rotina. Entretanto na espécie equina 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* (Bézar et al., 1989). Devido ainda ao número limitado de abatedouros de equinos 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 equina, técnicas de reprodução assistida como transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e microinjeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) têm sido utilizadas como alternativas.

Microinjeção intra-citoplasmática de espermatozoide (ICSI)

A ICSI têm sido utilizada e os resultados documentados de taxas de prenhez atingem aproximadamente 60% (Choi et al., 2002). 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 e 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). Choi et al. (2002) 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 equinos 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 e Talbot, 1994). Em roedores e marsupiais, foi demonstrada (Dandekar e 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 equina. 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 equina. Futuros estudos serão necessários para compreendermos a função reguladora dessa organela durante a clivagem ou o desenvolvimento embrionário prévio e qual o mecanismo se 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 TE 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 equinos, a primeira transferência nuclear para produção de embriões foi publicada por Li et al. (2000). 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

Produção *in vivo* de embriões equinos a partir da técnica de TE passou a ser rotina na Reprodução Equina. Com relação a produção *in vitro*, apesar do grande avanço adquirido 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 abordando os diversos mecanismos envolvidos estão sendo conduzidos em diversos laboratórios no mundo inteiro. As técnicas de reprodução assistida como ICSI, TO 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 oócitos equinos. Nos estudos em clonagem, que já vem sendo utilizada comercialmente por algumas empresas, pesquisadores abordam outros questionamentos e maiores estudos serão necessários para compreender alguns dos mecanismos propostos e esclarecer essas dúvidas.

Referências

- Alm H, Hinrichs K.** Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J. Reprod. Fertil*, v.107, 215–220, 1996.
- Alm H, Torner H.** *In vitro* maturation of horse oocytes. *Theriogenology*, v. 42, 345, 1994.
- Andrade LS.** O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. *Fisiologia e manejo da reprodução equina*, 2º ed, Recife, p.57-63,1986.
- Alvarenga MA.** Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v.38(Supl.1), p.s319-s333, 2010.
- Bézar J.** *In vitro* fertilization in the mare. *Proceedings International Scientific Conference Biotechnology Horse Reproduction*, p.12, 1992.
- Bézar J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E.** Timing of *in vivo* maturation of equine



- preovulatory oocytes and competence for *in vitro* maturation of immature oocytes collected simultaneously. *Equine Vet J Suppl*, 25, 33-37, 1997.
- Bogh IB, Brink NS, Jensen HE, Lehn-Jensen H, Greve T.** Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Vet J*, v.35, 575-579, 2003.
- Carneiro GF, Lorenzo PL, Pimentel CA, Pegoraro LM, Bertolini M, Ball BA, Anderson GB, Liu IKM.** 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. *Biol Reprod*, v.65, p.899-905, 2001.
- Carneiro GF, Liu IKM.** Transferência de Embriões. *Campo Virtual*, Recife, PE, Brasil, v.5, p.2-2, 2002.
- Carneiro GF, Liu IKM, Hyde D, Anderson GB, Lorenzo PL, Ball BA.** quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol Reprod Dev*, v.63, p.451-458, 2002a.
- Carneiro GF, Munro CJ, Leutenegger CM, Lorenzo PL, Ball BA, Liu IKM.** 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, p.685-688, 2002b.
- Carneiro GF, Liu IKM.** Temporal effect of igf-i on nuclear and cytoplasmic maturation in equine oocytes. *Theriogenology*, v. 59, p.485-485, 2003.
- Carneiro GF.** particularities and difficulties related to equine embryo transfer in Northeast of Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae (Online)*, v. 38, p. s324-s334, 2010.
- Carneiro GF, Liu IKM, Lorenzo PL.** Grânulo corticais pós-fertilização na espécie equina: um novo conceito. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 19, 2011, Recife, PE, p.245, Resumo.
- Carnevale EM, Ginther OJ.** Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. (Monography) *Biol Reprod*, v.1, p. 209-14, 1995.
- Carnevale EM, Alvarenga M, Squires EL, Choi YH.** Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In: Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Nashville, Tennessee 22-24 September, 1999, p.44.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Scott TJ, Squires EL.** Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology* 54, 981-987, 2000.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Checure CM, Scoggin CF, Squires EL.** Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.305-314, 2001a.
- Carnevale EM, Squires EL, Maclellan LJ, Alvarenga MA, Scott TJ.** Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. *J Am Vet Med Assoc*, v.218, p.87-91, 2001b.
- Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Squires EL.** Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanized mares. *J Am Vet Med Assoc*, v.222, p.60-62, 2003.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Preis KA, Stokes JE, Squires EL.** Establishment of pregnancies from oocytes collected from the ovaries of euthanized mares. *Proc Am Assoc Equine Pract*, v.50, p.531-533, 2004.
- Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, Stokes JE, Squires EL.** Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program from subfertile mares. *Theriogenology*, v.64, p.519-527, 2005.
- Choi YH, 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 YH, Love CC, Love LB, Varner DD, 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, 2002.
- Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hyland D, Carter J, Pinto C, Carter J, Paccamonti D, Godke RA.** Live foals produced from sperm- injected oocytes derived from pregnant mares. *J Equine Vet Sci*, v.18, p.736-40, 1998.
- Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, Seidel GE, Squires EL.** Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. *J Anim Sci*, v.80, p.1275-1279, 2002.
- Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis K A, Seidel GE, Squires EL.** Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v.61, p.705-713, 2004.
- Dandekar P, Talbot P.** Perivitelline space of mammalian oocytes: extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol Reprod Dev*, v.31, p.135-143, 1992.
- Dell'aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, 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. *Hum Reprod*, v.12, p.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. (Monograph) *Biol Reprod*, v.1, p.233-241, 1995.
- Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienza, V, Seidel JR, GE, Squires, EL, Carnevale, EM.** Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1308-1319, 2005.



- Eppig JJ.** Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.485-489, 1996.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C.** Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*, v.169, p.39-42, 2000.
- Fleury, J, Alvarenga, MA, Figueiredo, JB, Papa, FO.** Transferência de embriões em equinos. *Arq Brás Méd Vet Zootec*, v.39, p.485-487, 1987.
- 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.705-708, 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 and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, V.98, p.39-55, 2007.
- Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.** Biotécnicas: Aplicação á Reprodução Animal. São Paulo: Varela, p.340. 2002.
- Goudet G, Bezar J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E.** Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol Reprod*, v.57, p.232-245, 1997.
- Hawley LR, Enders AC, Hinrichs K.** Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. (Monograph 1) *Biol Reprod*, p.243-252, 1995
- Hartman DL.** Embryo Transfer. In: Mckinnon AO, Squires EL, Waala WE, Varner DD. (2nd Ed.). *Equine Reproduction*. Oxford: Wiley-Blackwell. 2011, chap. 303, p.2871-2879.
- Hinrichs K, Matthews G L, Freeman DA, Torello EM.** (1998). Oocyte transfer in mares. *J Am Vet Med Assoc*, v.212, p.982-986.
- Hinrichs K, Schmidt AL.** Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. *Biol Reprod*, v.62, p.1402-1408, 2000.
- Hinrichs K, Choi YH, Love LB.** Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol Reprod*, v.72, p.1142-1150, 2005.
- Hinrichs K.** Equine Cloning. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 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.
- Hinrichs K.** Assisted reproduction techniques in the horse. *Reprod Fertil Dev*, v.25, p.80-93, 2013.
- Hoodbhoy T, Talbot P.** Mammalian cortical granules: Contents, fate and function. *Mol Reprod Dev*, v.39, p.439-448, 1994.
- Jacobson CC, Choi YH, Hayden SS, Hinrichs K.** (2010). Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v.73, p.1116-1126.
- 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 LY, Meintjes M, Graff KJ, Paul JB, Denniston RS, Godke RA.** *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured oocytes aspirated from pregnant mares. (Monograph 1) *Biol Reprod*, p.309-17, 1995.
- Li X, Morris LH, Allen WR.** Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei. *J Reprod Fertil Abstr Ser*, v.25, p.77, 2000. Abstract.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).** Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do cavalo, p.1-56, 2016.
- Mara L, Casu S, Carta A, Dattena M.** Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*, v.138, p.25-38, 2013.
- Maserati MP, Fleury P.** Somatic cell nuclear transfer in the equine with donor cells in G2 and oocytes in telophase II. In: Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Gramado, RS, Brazil, August 20th to 23rd, 2015, and 31st Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE); Ghent, Belgium, September 11th and 12th, 2015. Abstracts.
- Mckinnon AO, Lacham-Kaplan O, Trounson AO.** Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen/thawed spermatozoa into *in vivo*-matured mares oocytes. *J Reprod Fertil*, v.56(Suppl), p.513-27, 2000.
- Mckinnon AO, Squires EL.** Embryo transfer and related Technologies. In: Samper JC, Pycock JF, Mckinnon AO (Ed.). *Current Therapy in Equine Reproduction*. Philadelphia: W.B. Saunders. 2007, cap. 51, p.319-334.
- Meira C, Henry M.** Evolution of two non-surgical equine embryo transfer methods. *J Reprod Fertil*, Colchester,



v.44(supl), p.712-713, 1991.

OguriN, Tsutsumi Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and na attempt at nonsurgical aggs transfer in horse. J Reprod Fertil, v.31, p.187, 1972.

OguriN, Tsutsumi Y. Nonsurgical eggs transfer in mares. J Reprod Fertil, v.41, p.313, 1974.

Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. *In vitro* fertilization in the horse: a retrospective study. J Reprod Fertil, v.44(Suppl.), p.375-384, 1991.

Riera RL. Equine embryo transfer. In: Samper, J.C. (Ed.). Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p.185-199.

Shabpareh V, Squires EL, Seidel GE, Jasko DJ. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. Theriogenology, v.40, p.1161-1175, 1993.

Squires EL. Maturation and fertilization of equine oocytes. Vet Clin North Am Equine Pract, v.12, p.31-45, 1996.

Squires EL, Mccue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. Theriogenology, Los Altos, v.51, p.91-104, 1999.

Warssaman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neil JD (Eds). The Physiology of Reproduction. New York: Raven, 1994. p.79-122.

Willadsen SM. Cloning of sheep and cow embryos. Genome, v.31, p.956-62, 1989.

Willis P, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. Equine oocyte *in vitro* maturation: influences of sera, time, and hormones. Mol Reprod Dev, v.30, p.360-368, 1991.

Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, v.385, p.810-813, 1997.

Woods GL, White KL, Vanderwall DK, LI GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. Science, v.301, p.1063, 2003.

Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. Equine Vet J, v.8(suppl), p.101-104, 1989.
