

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

VANTAGENS E DESAFIOS DAS BIOTÉCNICAS AVANÇADAS UTILIZADAS NA REPRODUÇÃO EQUINA ASSISTIDA¹

BEATRIZ RAMOS BERTOZZO², BRENO FERNANDES BARRETO SAMPAIO³, ÉRIKA SALTIVA CRUZ BENDER³, RICARDO RODRIGUES PAGNONCELLI³, ELIANE VIANNA DA COSTA E SILVA³, CARMEM ESTEFÂNIA SERRA NETO ZÚCCARI^{3*}

¹Recebido para publicação em 02/10/13. Aceito para publicação em 03/12/13.

²Médica Veterinária Autônoma, Campo Grande, MS, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil.

*Autor correspondente: carmem.zuccari@ufms.br

RESUMO: Relatos apontam que a espécie equina foi a primeira a ser submetida à inseminação artificial. Apesar deste fato, o desenvolvimento da reprodução assistida nos equinos foi lento em comparação às demais espécies voltadas diretamente para a produção animal. A liberação do uso da transferência de embriões pela maioria das associações de raças estimulou o desenvolvimento e a expansão de algumas técnicas de multiplicação animal para uso em equinos. A presente revisão teve por objetivo abordar as biotécnicas avançadas atualmente disponíveis para a espécie, como a superovulação, a transferência de ovócitos, a transferência intratubárica de gametas, a injeção intracitoplasmática de gametas, a produção *in vitro* de embriões e a clonagem, enfatizando suas aplicações prática e clínica, bem como determinados desafios que ainda precisam ser superados em cada biotécnica.

Palavras-chave: clonagem, injeção intracitoplasmática de espermatozóide, produção *in vitro* de embriões, superovulação, transferência de ovócitos, transferência intratubárica de gametas.

ADVANTAGES AND CHALLENGES OF ADVANCED BIOTECH USED IN ASSISTED EQUINE REPRODUCTION

ABSTRACT: Some reports suggest the equine species as the first one to be subjected to the artificial insemination. Despite this fact, the development of assisted reproduction in this species has been slow when compared to other production species. The authorization of the use of embryo transfer by some breed associations stimulated the development and expansion of several reproductive techniques for use in horses. The present study aimed to address the advanced biotechnologies currently available for this species, such as superovulation, transfer of oocytes, gamete intrafallopian transfer, *in vitro* production of embryos and cloning, emphasizing their practical and clinical applications, as well as certain challenges that still need to be overcome in each biotech.

Keywords: cloning, intracytoplasmic sperm injection, *in vitro* production of embryos, superovulation, oocyte transfer, gamet intrafallopian transfer.

INTRODUÇÃO

Acredita-se que a espécie equina tenha sido a primeira a ser submetida com sucesso à inseminação artificial (Allen, 2005). No entanto, em comparação às demais espécies domésticas o desenvolvimento da reprodução equina foi mais lento.

Em 2002 a Associação Americana do Cavalo Quarto de Milha permitiu o registro ilimitado de potros produzidos por égua em cada ano através da transferência de embrião (TE), contribuindo consideravelmente com a popularização desta técnica (SQUIRES *et al.*, 2003).

A busca por animais geneticamente superiores e a possibilidade do uso de indivíduos com subfertilidade adquirida impulsionou o desenvolvimento de algumas técnicas reprodutivas em equinos. A partir da TE várias biotécnicas surgiram, rompendo a barreira da subfertilidade e infertilidade adquiridas, e até da morte do animal.

Alguns procedimentos já são utilizados comercialmente, tais como a superovulação (SOV), transferência de ovitos (TOv) e clonagem. Dentre estas, a SOV é a que possui o maior número de estudos, em contrapartida, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) ainda precisa de maiores investigações para a aplicação em nível comercial. Estudos estão sendo conduzidos na tentativa de compreender melhor os mecanismos que influenciam o sucesso ou insucesso dessas técnicas, e permitir a inserção destas na rotina da reprodução dos equinos.

A presente revisão teve como objetivo abordar as biotécnicas avançadas utilizadas atualmente na reprodução equina assistida, como a superovulação, a transferência de ovócitos, a transferência intratubárica de gametas, a clonagem e as técnicas envolvidas na produção *in vitro* de embriões, que são a fecundação *in vitro*, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide, enfatizando suas aplicações prática e clínica.

DESENVOLVIMENTO

Superovulação (SOV)

O primeiro relato de sucesso da SOV na espécie equina ocorreu na década de 1970 por DOUGLAS *et al.* (1974) utilizando o extrato de pituitária equina (EPE). Algumas substâncias testadas não foram eficientes em promover a SOV em éguas, tais como: hormônio folículo estimulante suíno (CULLINGFORD *et al.*, 2010), imuno neutralização da inibina (Squires,

2006), gonadotrofina coriônica equina e hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH; SQUIRES *et al.*, 2003). Por esse motivo as pesquisas se direcionaram para protocolos que utilizam o EPE, hormônio folículo estimulante equino (e-FSH), combinação entre hormônio folículo estimulante recombinante (re-FHS) e hormônio folículo luteinizante recombinante (re-LH) e o acetato de deslorelina.

O tratamento para a SOV deve ser iniciado antes que ocorra a seleção do folículo dominante, quando o maior folículo atinge aproximadamente 23,5 mm de diâmetro. No caso de éguas com duas ondas foliculares, este deve se iniciar durante a fase de crescimento dos folículos da segunda onda. Uma alternativa é examinar a égua cinco dias após a ovulação e, se o maior folículo tiver entre 23 e 25 mm de diâmetro, iniciar o tratamento superovulatório (SQUIRES, 2006).

O uso do EPE resulta em grande variação da taxa ovulatória, provavelmente pela falta de padronização das concentrações de FSH e LH presentes no extrato *in natura* (SQUIRES *et al.*, 2003). Quando o EPE é associado à gonadotrofina coriônica humana (*human corionic gonadotropin* - hCG), além de promover o desenvolvimento de um número maior de folículos, parece ter efeito benéfico sobre a maturação, resultando em maior número de folículos com células da granulosa expandidas. Tal fato, provavelmente, se deve à estimulação indireta do LH através de mediadores parácrinos das células da teca (BLANCO *et al.*, 2009).

Os protocolos utilizando e-FSH buscam promover o desenvolvimento de um maior número de folículos pré-ovulatórios responsivos ao indutor de ovulação, independente do eixo hipotalâmico-hipofisário, por causar um estímulo direto no ovário. Embora aumente a taxa ovulatória, não produz uma elevação correspondente no número de embriões recuperados, além destes apresentarem alterações morfológicas (ARAUJO *et al.*, 2008; RAZ *et al.*, 2009). As baixas taxas de recuperação podem estar associadas ao estímulo insuficiente de LH, alterações no número de receptores de LH ou alterações na afinidade dos receptores de gonadotrofinas nos folículos de éguas submetidas ao protocolo de superovulação (RAZ *et al.*, 2011). Os mesmos autores relataram que o e-FSH também modifica o tônus e o edema uterino, promove uma variação nas concentrações séricas de progesterona (P_4) e estradiol (E_2), sendo que estas alterações podem estar associadas às altas taxas de folículos anovulatórios e às baixas taxas de prenhez. Além disso, recomendam maiores investigações quanto aos efeitos da e-FSH na secreção e contratilidade

do oviduto e útero, bem como na viabilidade e desenvolvimento embrionário.

Gonadotrofinas recombinantes têm sido tema de recentes pesquisas buscando o sucesso da SOV em éguas. O uso do re-FSH aumenta o número de folículos pré-ovulatórios, resultando em maior concentração de E_2 circulante, que por sua vez diminuem a quantidade de receptores para GnRH na hipófise anterior, impedindo o surgimento do pico de LH, comprometendo, desta forma, a maturação folicular e ovocitária (MEYERS-BROWN *et al.*, 2010). Por outro lado, quando foi testada a associação entre re-FSH e re-LH verificou-se um ambiente mais favorável para a maturação dos ovócitos, resultando em um aumento no número de ovulações e de embriões recuperados, quando comparado ao uso isolado do re-FSH (MEYERS-BROWN *et al.*, 2011).

Um estudo recente descreveu a indução de ovulações duplas com acetato de deslorelina, um análogo sintético do GnRH, que mostrou-se efetivo para aumentar o número de ovulações, com taxa de recuperação embrionária similar àquela obtida à ovulação única (NAGAO *et al.*, 2012).

Em síntese, a SOV busca recrutar o maior número de folículos de uma onda com conseqüente aumento no número de ovulações e embriões produzidos. Porém, ainda existem barreiras que impedem que esta biotécnica se torne rotina na reprodução equina, como a falta de um produto comercial padronizado e o baixo número de embriões produzidos em relação à taxa de ovulação.

Transferência de Ovócitos (TOv)

Entre as novas técnicas de reprodução assistida usadas na espécie equina, a TOv é a que apresenta a maior eficiência. A técnica consiste em recuperar ovócitos de éguas doadoras e transferi-los para o oviduto de receptoras, as quais são inseminadas com o sêmen do garanhão desejado (HINRICH *et al.*, 2000). A TOv surgiu como uma alternativa para produzir embriões a partir de éguas incapazes de fazê-lo pelas técnicas convencionais de transferência embrionária (SQUIRES *et al.*, 2003).

Os ovócitos são coletados após administração de hCG ou deslorelina e os critérios para a administração do indutor de ovulação são a presença de um folículo com no mínimo 35 mm de diâmetro, relaxamento uterino e cervical, e edema uterino (CARNEVALE *et al.*, 2005). A recuperação dos ovócitos pode ser realizada por laparotomia, colpotomia, punção de flanco ou aspiração transvaginal guiada

por ultrassom (*ovum pick up* - OPU; Carnevale, 2004).

A lavagem da cavidade folicular durante a OPU resulta em maior taxa de recuperação de ovócitos quando as éguas se apresentam em estro (MARI *et al.*, 2005), com valores variando de 70-80% quando feita imediatamente antes da ovulação (COUTINHO DA SILVA *et al.*, 2002; ULIANI *et al.*, 2009). A taxa de recuperação de ovócitos aspirados de folículos imaturos é cerca de 20%, pois as células do *cumulus oophorus* encontram-se firmemente aderidas à parede do folículo (CARNEVALE e MACLELLAN, 2006).

É possível obter ainda ovócitos com a aspiração e curetagem folicular *post mortem*, resultando em uma alta taxa de recuperação (CARNEVALE e MACLELLAN, 2006). As condições mais apropriadas para o transporte dos ovários são mantê-los a 30°C sem exceder o período de 4 h, evitando alterações morfológicas (HINRICH *et al.*, 2005; Carnevale e MACLELLAN, 2006). RIBEIRO *et al.* (2008) testaram dois períodos de espera entre a aspiração e a manipulação dos ovócitos (período curto - aproximadamente 7 h e período longo - aproximadamente 20 h) e observaram que a aspiração folicular seguida por um longo período de espera resulta em baixa taxa de maturação até o estágio de metáfase II e de desenvolvimento de blastocistos.

Ao se recuperar ovócitos imaturos é necessário cultivá-los *in vitro* até o estágio de metáfase II (COUTINHO DA SILVA, 2008). Os meios comumente utilizados são a solução salina suplementada com substratos energéticos, o Ham's F-10 e o TCM-199. A taxa de maturação *in vitro* varia entre 50 e 70%, porém, a capacidade de desenvolvimento embrionário é menor em comparação aos maturados *in vivo* (CARNEVALE e MACLELLAN, 2006).

Quando o ovócito é recuperado 24 h após a indução da ovulação este é cultivado *in vitro* por 12 a 16 h, e quando a recuperação é feita próxima às 36 h após a indução da ovulação os ovócitos podem ser transferidos diretamente para o oviduto das receptoras (CARNEVALE, 2004; COUTINHO DA SILVA, 2008), que, por sua vez, podem ser cíclicas ou acíclicas. CARNEVALE *et al.* (2005) não encontraram diferença entre as duas categorias, destacando que trabalhar com as acíclicas permite utilizar menor quantidade de éguas e melhor sincronização, necessitando apenas da utilização de progesterona ou progestágenos após a transferência, ao invés de todo o protocolo de sincronização e subsequente escolha da melhor receptora. Adicionalmente, destaca-se que neste caso pode não haver a necessidade de realizar punção folicular nas

receptoras para evitar a fecundação indesejada do próprio ovócito.

O ovócito é transferido por laparotomia de flanco mantendo a receptora em estação. O ovário é exteriorizado e levemente rotacionado para a exposição do oviduto. Posteriormente, uma pipeta de vidro esterilizada contendo o ovócito é inserida cerca de 2 a 3 cm no interior do infundíbulo e o conteúdo da pipeta é depositado no oviduto (SAMPER *et al.*, 2007).

A inseminação da receptora se mostra mais eficaz quando feita entre 12 e 14 h antes da TOv, com uma concentração espermática mínima de 1×10^9 . CARNEVALE *et al.* (2000) obtiveram 57% de prenhez inseminando as receptoras apenas após a TOv, enquanto SCOTT *et al.* (2001) obtiveram 80% de prenhez inseminando-as antes.

Os principais fatores que afetam o sucesso de um programa de TOv são a qualidade do ovócito, do sêmen e a idade da doadora (SQUIRES *et al.*, 2003). CARNEVALE *et al.* (2005) não encontraram diferença ao utilizar sêmen fresco, refrigerado e congelado, de qualidade e concentração variadas. Por outro lado, a idade da doadora teve efeito significativo sobre a taxa de prenhez. Adicionalmente, CARNEVALE *et al.* (2010) observaram que doadoras com mais de 19 anos demonstraram declínio na viabilidade dos ovócitos. A TOv é um método eficiente na obtenção de embriões de doadoras incapazes de produzi-los de maneira convencional e os resultados esperados são de 70% de recuperação de ovócitos, com taxa de prenhez entre 35 e 50% (HINRICHS e CHOI, 2005). Embora lesões ovarianas causadas por aspirações foliculares consecutivas pareçam não comprometer a fertilidade das éguas doadoras (MARI *et al.*, 2005), mais estudos são necessários na busca de se desenvolver métodos não cirúrgicos para a transferência e alcançar melhores taxas de recuperação de ovócitos imaturos.

Transferência Intratubárica de Gametas (*Gamete Intrafallopian Transfer* - GIFT)

A GIFT se desenvolveu a partir dos estudos com TOv e consiste em transferir ovócitos e espermatozoides conjuntamente para o oviduto de uma égua receptora. Diferente da TOv, a GIFT exige um número consideravelmente menor de espermatozoides, uma vez que estes são depositados diretamente no local de ocorrência da fecundação, sendo uma técnica indicada para a utilização de sêmen com baixo número de gametas ou de qualidade inferior, como no caso de garanhões

subfêrteis, sêmen congelado e sexado (SQUIRES *et al.*, 2003; CARNEVALE, 2004).

Ao comparar os resultados da TOv e GIFT, CARNEVALE *et al.* (2000) obtiveram taxas de prenhez similares, de 57 (8/14) e 27% (3/11), respectivamente. Apesar da diferença numérica, não foi observada diferença significativa entre as técnicas. Os autores sugerem que o resultado inferior da GIFT pode estar relacionado com o comprometimento da capacitação espermática devido à deposição direta no oviduto, sem a passagem do espermatozoide pelo útero. Outra hipótese levantada pelos autores é que a remoção das células do *cumulus* antes da realização da técnica poderia ser benéfica, porém, durante o experimento a transferência dos ovócitos foi feita com células do *cumulus* intactas. COUTINHO DA SILVA *et al.* (2002) também compararam os resultados da TOv e GIFT, e não encontraram diferença significativa nas taxas de prenhez (65% *vs* 55%). Porém, a GIFT tendeu a ser mais eficiente quando os ovócitos foram coletados 22 h após a indução da ovulação, em comparação com 33 h.

Outro estudo comparou os resultados da TOv e GIFT utilizando sêmen fresco, refrigerado e congelado. No primeiro experimento os pesquisadores utilizaram sêmen fresco em ambas as técnicas e o sêmen congelado apenas na GIFT. Quando o sêmen fresco foi utilizado, as taxas de prenhez foram semelhantes, sendo de 57% para TOv e 82% para GIFT. Porém, a taxa de prenhez na GIFT realizada com sêmen congelado foi de apenas 8%. No segundo experimento foi feita a comparação das duas técnicas utilizando-se sêmen refrigerado, onde a taxa de prenhez foi significativamente maior para o sêmen depositado no útero (83%) em comparação ao depositado no oviduto (25%) (COUTINHO DA SILVA *et al.*, 2004).

Os estudos demonstram que a GIFT pode ser empregada na reprodução equina com a obtenção de bons resultados quando o sêmen fresco é utilizado, sem a necessidade de se realizar a aspiração folicular das receptoras, tendo em vista que tanto o ovócito da doadora quanto o sêmen são depositados concomitantemente no oviduto, evitando a fecundação do ovócito da receptora, mesmo que esta se encontre cíclica. Os motivos dos baixos resultados utilizando-se sêmen refrigerado ou congelado ainda são temas de investigações pelos pesquisadores.

Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE é uma biotecnologia utilizada em várias

espécies, principalmente em bovinos devido ao interesse da cadeia produtiva em multiplicar o material genético de fêmeas selecionadas. Adicionalmente, nesta espécie (bovinos) há grande disponibilidade de ovários provenientes de frigoríficos e da liberdade para a realização de pesquisas. Em contraste, as principais limitações nos equinos são a escassa disponibilidade de ovários, a taxa de recuperação de ovócitos muito baixa, e o limitado interesse dos criadores de cavalos e associações de raça (GALLI *et al.*, 2007).

Uma característica da égua é a coleta mais frequente de ovócitos com *cumulus* expandido, fato que quando observado em outras espécies (tais como os ruminantes e suínos), está geralmente relacionado com a aspiração de ovócitos provenientes de folículos atrésicos, os quais são geralmente descartados devido à sua reduzida capacidade de desenvolvimento (GALLI *et al.*, 2008). No entanto, na espécie equina, os ovócitos com *cumulus* expandido maturam normalmente e apresentam desenvolvimento normal (GALLI *et al.*, 2007).

As maiores barreiras para o sucesso da PIVE na espécie equina são a maturação ovocitária e a capacitação espermática. Os estudos com maturação ovocitária *in vitro* são reduzidos devido à baixa disponibilidade de ovários de abatedouro para a realização de pesquisas. A indução e a avaliação da capacitação são procedimentos complexos e o tratamento reduz consideravelmente a vida útil dos espermatozoides (SQUIRES *et al.*, 2003; SAMPER *et al.*, 2007).

A adição de procaína ao meio de capacitação espermática Whittens modificado demonstrou resposta positiva na indução da hiperativação e na PIVE. A taxa de fertilização PIVE utilizando o sêmen incubado em meio com procaína foi 66% (4/6). Porém, em contraste, na sua ausência não houve fecundação (McPARTLIN *et al.*, 2009).

O desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* na espécie equina ainda é um desafio aos pesquisadores. Durante o período intrauterino inicial o embrião equino migra pelo corpo do útero e é envolto em uma cápsula glicoproteica que o protege. A uterocalina é a principal proteína secretada pelas glândulas endometriais sob o estímulo da progesterona e faz parte da cápsula glicoproteica do embrião. A adição *in vitro* desta proteína, apesar de resultar na formação da cápsula, não apresentou regularidade em sua estrutura, diferindo de embriões com desenvolvimento *in vivo*, o que pode significar que a uterocalina é importante para a formação da cápsula, mas que

provavelmente existam outros fatores maternos envolvidos na formação deste envoltório (SMITS *et al.*, 2012a).

Com o insucesso da PIVE desenvolveu-se a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). DELL'AQUILA *et al.* (1997) compararam a PIVE e ICSI e observaram que a formação dos pró-núcleos ou ocorrência da clivagem foram de 8,7% e 29,8%, respectivamente, sendo que na PIVE o desenvolvimento embrionário não ocorreu. Portanto, atualmente, a ICSI é uma técnica mais eficiente na produção *in vitro* de embriões para a espécie equina do que a PIVE.

Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI)

A ICSI é uma técnica de reprodução assistida bastante utilizada em humanos, principalmente nos casos de infertilidade masculina. Em equinos, pode ser empregada para produzir embriões viáveis de éguas incapazes de produzi-los pelas técnicas de rotina e também como ferramenta de pesquisa (McKINNON *et al.*, 2009).

A técnica, ainda em desenvolvimento para equinos, consiste em injetar um único espermatozoide no interior do citoplasma do ovócito, eliminando as etapas fisiológicas da capacitação espermática, ligação do espermatozoide ao ovócito, reação acrossomal, fusão das membranas dos gametas e penetração no ovócito (SQUIRES *et al.*, 2003). A ICSI é indicada nos casos de falhas na ovulação, obstrução do oviduto, patologias uterinas severas, problemas de ligação ou penetração do espermatozoide no ovócito proveniente de égua senil, sêmen de baixa qualidade, baixo número de espermatozoides e morte da égua doadora ou do ganhão (CARNEVALE *et al.*, 2007; CARNEVALE *et al.*, 2010).

A célula espermática utilizada na injeção pode se originar de preparações de sêmen fresco, refrigerado, congelado ou liofilizado, não havendo diferença entre as taxas de clivagem (CHOI *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2011). Quando injetado espermatozoide proveniente de sêmen liofilizado, a célula é imóvel, por isso o ovócito deve ser ativado para que haja a formação do blastocisto. CHOI *et al.* (2011), em um experimento realizado na espécie equina, injetaram, juntamente com o espermatozoide, extrato espermático para induzir essa ativação, não apresentando diferença na taxa de clivagem quando comparado à injeção com espermatozoide derivado de sêmen congelado.

Alguns experimentos mostraram desenvolvimento anormal do embrião cultivado *in vitro* após a ICSI. Este fato está associado com uma clivagem tardia em relação àquela *in vivo* (GRÖNDAHL *et al.*, 1997). A alteração está relacionada às anormalidades na expansão do blastocisto entre o 6^o e 7^o dia, não havendo ruptura da zona pelúcida, nem a formação da cápsula embrionária, como ocorre normalmente no processo *in vivo* (CHOI *et al.*, 2004).

LAZZARI *et al.* (2002) observaram o desenvolvimento embrionário após a ICSI com sêmen congelado de diferentes fertilidades, não havendo diferença significativa na taxa de formação de blastocisto, desde que a célula injetada seja móvel. Adicionalmente, CHOI *et al.* (2006) demonstraram que é possível descongelar, diluir, subdividir e recongelar o sêmen sem afetar a taxa de formação de blastocisto nesta biotécnica, indicando que as células que sobrevivem ao reprocessamento são viáveis para utilização na ICSI, aumentando o rendimento do uso de palhetas, principalmente quando estas não podem ser repostas como no caso de ganhão que veio a óbito.

A idade da doadora do ovócito influencia as taxas de prenhez após a ICSI. CARNEVALE *et al.* (2010) relataram idade média de 15,35 anos para receptoras prenhes e 18,03 anos para as não-prenhes, aos 50 dias de gestação, confirmando um declínio na qualidade do ovócito associado ao envelhecimento da doadora.

Assim, destaca-se que além de aumentar a eficiência no uso do sêmen e permitir a utilização de ganhões com baixa fertilidade, a ICSI elimina o risco de endometrite nas éguas receptoras quando comparada à TOv, uma vez que dispensa a inseminação das mesmas. Além disso, o manejo é facilitado porque não é preciso remover o ovócito da receptora. Entre as desvantagens da técnica estão à necessidade de equipamento específico e mão de obra especializada para realizá-la, o risco de ruptura dos ovócitos durante o processo e a baixa taxa de clivagem observada nos ovócitos maturados *in vitro* (HINRICHS, 2005). Portanto, a aplicação da ICSI seria maior se as taxas de formação de blastocisto *in vitro* fossem mais satisfatórias.

Clonagem

A clonagem é definida como o processo de gerar um indivíduo com carga genética idêntica ao original. A clonagem de equídeos só passou a ser reportada a partir de 2002, sete anos após o primeiro relato de um clone de mamífero, com o nascimento de burros e potros clonados (GALLI *et al.*, 2003; WOODS *et al.*, 2003).

A clonagem padrão é realizada pela técnica da transferência nuclear de células somáticas. O único papel do animal clonado é doar uma amostra de tecido, que geralmente é obtida por biopsia de pele. Neste caso então, as células teciduais, geralmente fibroblastos, são mantidas em meio de cultura até que tenham crescido suficientemente, sendo depois isoladas do tecido (HINRICHS, 2006).

A genética das doadoras de ovócitos não é importante, pois a cromatina e o corpúsculo polar são aspirados por uma pipeta, tornando o ovócito enucleado, que passa a ser chamado de ovoplasto ou citoplasto. A célula somática é selecionada e posicionada no espaço perivitelíneo abaixo da zona pelúcida do ovócito, utilizando-se um micromanipulador. Em seguida, procede-se a fusão entre as membranas da célula doadora e do citoplasto através de pulsos elétricos.

Outra maneira de se fazer a transferência é romper a membrana da célula somática e injetar o núcleo diretamente no citoplasma do ovócito. O ovócito reconstituído é então ativado quimicamente para que ocorra a descondensação da cromatina da célula somática e a primeira mitose, originando um embrião com duas células. A ativação química é realizada através do influxo de íons cálcio no interior do ovócito, que na fecundação normal é realizada pelo espermatozoide. Na transferência nuclear esta ativação química do ovócito pode ser feita com ionomicina ou uma associação de ionomicina e extrato espermático. Os ovócitos recombinados e ativados são transferidos para o oviduto de receptoras por laparotomia de flanco, ou, podem ser cultivados *in vitro* por 7 a 8 dias até o estágio de blastocisto e transferidos pela via transcervical para o útero de receptoras (HINRICHS, 2006; HINRICHS *et al.*, 2007).

O primeiro clone de um equídeo foi produzido por WOODS *et al.* (2003), sendo transferidos 305 embriões que resultaram no nascimento de três burros. GALLI *et al.* (2003) produziram o primeiro equino clonado, resultando no nascimento de uma potra, que curiosamente foi gerada pela égua que doou a célula somática, ou seja, estava gestando seu próprio clone. No Brasil o primeiro relato de sucesso com a clonagem de equinos foi em 2012 com o nascimento do clone de um dos principais ancestrais da raça Mangalarga, o ganhão Turbante JO (NASCIMENTO, 2012).

Recentemente, CHOI *et al.* (2013) obtiveram sucesso na produção de um potro fazendo a transferência nuclear em ovócitos recuperados de folículos imaturos. Estes ovócitos foram recuperados de um animal vivo via OPU e submetidos à maturação *in vitro*.

Apesar do sucesso na produção de clones equinos a eficiência da técnica ainda é baixa, somente entre 0,7% (HINRICH, 2005) e 2,7% (WOODS *et al.*, 2003) dos embriões produzidos resultam no nascimento de um potro. Porém, GAMBINI *et al.* (2012) relataram taxas de prenhez superiores utilizando o desenvolvimento embrionário *in vitro* agregado, ou seja, durante o período de cultivo *in vitro*, ao invés de cultivar apenas um embrião por poço, cultivaram três embriões por poço, mostrando maior eficiência (37,1% vs 9,0%).

VANDERWALL *et al.* (2005) avaliaram as características clínicas de gestações de clones equinos e relataram uma taxa de perda embrionária de 89%, e todos os casos ocorreram precocemente, até os 80 dias de gestação. A elevada taxa de desenvolvimento embrionário anormal foi atribuída a um erro de reprogramação genética entre o núcleo da célula doadora e a célula receptora, fato também observado em outras espécies domésticas.

A produção de indivíduos por meio da clonagem não garante que terão o mesmo fenótipo, comportamento e desempenho do original, uma vez que vários fatores como ambiente, manejo, nutrição e treinamento influenciam na formação dessas características. Algumas associações de raças não permitem o registro de animais clonados com a justificativa da presença de DNA mitocondrial heterogêneo, fato este que pode ser contornado ao se utilizar uma doadora de ovócito que seja da mesma linhagem da mãe do animal a ser clonado (CHOI *et al.*, 2013).

Na medicina veterinária equina atual, embora muito pouco aplicada, a clonagem tem por objetivo preservar genética superior e de espécies em extinção como o cavalo de PRZEWALSKI e QUAGGA, permitir a reprodução de éguas ou garanhões que já morreram ou não podem mais se reproduzir e de machos que foram castrados e que tornaram animais de alto desempenho e valor (VANDERWALL *et al.*, 2005; SMITS *et al.*, 2012b).

CONCLUSÃO

O crescente interesse por parte da indústria equina resultou no surgimento de biotecnologias que fornecem a solução para grande parte dos problemas reprodutivos. Dentre essas técnicas a TOV é a mais eficiente e bastante utilizada comercialmente e a SOV vem ganhando espaço devido ao desenvolvimento de produtos com concentrações conhecidas de FHS e LH, como o e-FSH, re-FSH e re-LH. Já a clonagem vem sendo

desenvolvida por alguns laboratórios particulares, enquanto a GIFT, a PIVE e a ICSI ainda não possuem uma eficiência adequada para serem utilizadas em nível comercial. Estudos estão sendo conduzidos na tentativa de compreender melhor os mecanismos que influenciam o sucesso ou insucesso dessas técnicas, e permitir a inserção destas na rotina da reprodução equina, como ocorreu com a inseminação artificial e a transferência de embriões.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.310-329, 2005.

ARAUJO, G.H.M.; ROCHA FILHO, A.N.; LOPES, E. P.; MOYA, C.F.; ALVARENGA, M.A. Use of a low dose of equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.380-383, 2008.

BLANCO, I.D.P.; DEVITO, L.G.; FERREIRA, H.N.; ARAUJO, G.H.M.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Aspiration of equine oocytes from immature follicles after treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.203-209, 2009.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; 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.981-987, 2000.

CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.617-624, 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.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.22, p.843-856, 2006.

CARNEVALE, E.M.; STOKES, J.; SQUIRES, E.L.;

- CAMPOS-CHILLON, L.F.; ALTERMATT, J.; SUH, T.K. Clinical use of intracytoplasmic sperm injection in horses. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 53, 2007. Orlando, Florida, USA. **Proceedings...** Orlando: AAEP, 2007, p.560.
- CARNEVALE, E.M.; FRANK-GUEST, B.L.; STOKES, J.E. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.258-259, 2010.
- CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; LOVE, L.B.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.; HINRICHS, K. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v.123, p.455-465, 2002.
- CHOI, Y.H.; ROASA, L.M.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; HINRICHS, K. Blastocyst formation rates *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1231-1238, 2004.
- CHOI, Y.H.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HINRICHS, K. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. **Theriogenology**, v.65, p.808-819, 2006.
- CHOI, Y.H.; NORRIS, J.D.; VELEZ, I.C.; JACOBSON, C.C.; HARTMAN, D.L.; HINRICHS, K. A viable foal obtained by equine somatic cell nuclear transfer using oocytes recovered from immature follicles of live mares. **Theriogenology**, v.79, p.791-796, 2013.
- CHOI, Y.H.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; HARTMAN, D.L.; HINRICHS, K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. **Reproduction**, v.142, p.529-538, 2011.
- 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.
- COUTINHO DA SILVA, M.A.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; PREIS, K.A.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v.61, p.705-713, 2004.
- COUTINHO DA SILVA, M.A. When should a mare go for assisted reproduction? **Theriogenology**, v.70, p.441-444, 2008.
- CULLINGFORD, E.L.; SQUIRES, E.L.; McCUE, P. M.; SEIDEL JR., G.E. Attempts at superovulation of mares with porcine follicle stimulating hormone and recombinant equine follicle stimulating hormone. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.6, p.305-309, 2010.
- DELL'AQUILA, M.E.; CHO, Y.S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G.M.; MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matured equine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.1139-1156, 1997.
- DOUGLAS, R.H.; NUTI, L.; GINTHER, O.J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, v.2, p.133-142, 1974.
- GALLI, C. ; 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. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.39-55, 2007.
- GALLI, C.; LAGUTINA, I.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G. Somatic cell nuclear transfer in horses. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.331-337, 2008.
- GAMBINI, A.; JARAZO, J.; OLIVERA, R.; SALAMONE, D.F. Equine Cloning: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. **Biology of Reproduction**, v.87, n.1, p.1-9, 2012.
- GRÖNDAHL, C.; HANSEN, T.H.; HOSSAINI, A.; HEINZE, I.; GREVE, T.; HYTTTEL, P. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1495-1501, 1997.
- HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology**, v.64, p.535-541, 2005.
- HINRICHS, K. Equine cloning. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.22, p.857-866, 2006.

- HINRICHES, K.; CHOI, Y.H. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, p.210-218, 2005.
- HINRICHES, K.; CHOY, Y.H.; VARNER, D.D.; HARTMAN, D. L. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and / or ionomycin. **Reproduction**, v.134, p.319-325, 2007.
- HINRICHES, K.; PROVOST, P.J.; TORELLO, E.M. Treatments resulting in pregnancy in nonovulating, hormone-treated oocyte recipient mares. **Theriogenology**, v.54, p.1285-1293, 2000.
- 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.709-712, 2002.
- MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, I.; BELLUZZI, S. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v.88, p.299-308, 2005.
- McKINNON, A.O.; TROUNSON, A.O.; SILBER, S.J. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In: ANNUAL RESORT SYMPOSIUM OF THE AMERICAN ASSOCIATION PRACTITIONERS, 11, 2009. Gold Coast, Australia. **Proceedings...Gold Coast: AAEP**, 2009, p.58-80.
- McPARTLIN, L.A.; SUAREZ, S.S.; CZAYA, C.A.; HINRICHES, K.; BEDFORD-GUAUS, S. J. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.81, p.199-206, 2009.
- MEYERS-BROWN, G.A.; McCUE, P.M.; NISWENDER, K.D.; SQUIRES, E.L.; DELUCA, C.A.; BIDSTRUP, L.A.; COLGIN, M.; FAMULA, T.R.; ROSER, J. F. Superovulation in mares using recombinant equine follicle stimulating hormone: ovulations rates, embryo retrieval, and hormone profiles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, p.560-568, 2010.
- MEYERS-BROWN, G., BIDSTRUP, L.A., FAMULA, T.R.; COLGIN, M.; ROSER, J. F. Treatment with recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) followed by recombinant equine luteinizing hormone (reLH) increases embryo recovery in superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v.128, p.52-59, 2011.
- NAGAO, J.F.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; FREITAS, DELL'AQUA C.P.; DELL'AQUA JR, J.A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.69-73, 2012.
- NASCIMENTO, S.O. Lendário Turbante JO está de volta ao mundo. **Revista Globo Rural**, v.324, p.29-36, 2012.
- RAZ, T.; GREEN, G.M.; CARLEY, S.D. ; CARD, C.E. Folliculogenesis, embryo parameters and post-transfer recipient pregnancy rate following equine-follicle stimulating hormone (eFSH) treatment in cycling donor mares. **Australian Veterinary Journal**, v.89, n.4, p.138-142, 2011.
- RAZ, T.; HUNTER, B.; CARLEY, S.; CARTÃO, C. Reproductive performance of donor mares subsequent to eFSH treatment in early vernal transition: comparison between the first, second, and mid-season estrous cycles of the breeding season. **Animal Reproduction Science**, v.116, p.107-118, 2009.
- RIBEIRO, B.I.; LOVE, L.B.; CHOI, Y.H.; HINRICHES, K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.171-179, 2008.
- SAMPER, J.C.; PSYCOCK, J.F.; McKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2007. 492p.
- SCOTT, T.J.; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; SCOGGIN, C. F.; SQUIES, E. L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro* or within oviducts of mares. **Theriogenology**, v.55, p.705-715, 2001.
- SMITS, K.; GOVAERE, J.; PEELMAN, L. J.; GOOSSENS, K.; GRAFF, D.C.; VERCAUTEREN, D.; VANDELE, L.; HOOGEWIJS, M.; WYDOOGHE, E.; STOUT, T.; SOOM, A. V. Influence of the uterine environment on the development of *in vitro*-produced equine embryos. **Reproduction**, v.143, p.173-181, 2012a.
- SMITS, K.; HOOGEWIJS, M.; WOELDERS, H.; DAELS, P.; SOOM, V. Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.239-248, 2012b.
- SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L. Superovulation in mares. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.22, p.819-830, 2006.

ULIANI, R.C.; ALVARENGA, M.A.; LANDIN E ALVARENGA, F.C. ICSI Uma nova opção para resolução de problemas de fertilidade em equinos. **Revista + Equina**, v.4, p.24, 2009.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; ROSER, J.F.;

SCHLAFER, D.H.; SELTON, D.C.; TESTER, D.F.; WHITE, K. L. Equine cloning: applications and outcomes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.91-98, 2005.

WOODS, G.L.; WHITE, K.L.; VANDERWALL, D.K.; LI, G.P.; ASTON, K.I.; BUNCH, T.D.; MEERDO, L.N.; PATE, P.L. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. **Science**, v.301, p.1063-1065, 2003.