

ESTADO DA ARTE NA REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINO

C. Meira; F.S. Ignácio; J.C.P. Ferreira; D.F. Montechiesi; S.D. Bicudo

Universidade Estadual Paulista - FMVZ – Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - Campus de Botucatu, São Paulo - 18618-000 meira@fmvz.unesp.br

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a congelação de sêmen e a inseminação artificial em equino evoluiu consideravelmente após a publicação de Martin *et al.* (1979), seguido de uma série de estudos visando obter o perfil ideal de composição dos diluidores, efeito da centrifugação, das formas de envase e do processo de refrigeração variáveis importantes para o sucesso da técnica.

Quanto à transferência de embriões (TE), grande evolução também ocorreu a partir da primeira prenhez relatada por Oguri & Tsutsumi (1974). Hoje a técnica é utilizada comercialmente em vários países.

Outros temas relevantes em reprodução assistida equina como: a superovulação, criopreservação de embriões, fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozoide, transferência intrafalopiana de gametas e a clonagem, tiveram especial atenção dos pesquisadores a partir dos anos 80, visando aproveitar o potencial de animais com alto padrão genético.

SUPEROVULAÇÃO EM ÉGUAS

A indução de múltiplas ovulações em equinos tem sido realizada com o objetivo de aumentar o número de embriões obtidos por coleta e conseqüentemente minimizar os custos da TE, bem como aumentar a oferta de oócitos para estudos “*in vitro*”. Os tratamentos superovulatórios na égua e em outras espécies de ovulação única procuram selecionar o maior número de folículos possíveis dentro de uma única onda folicular, estimulando-os a continuarem seu desenvolvimento até a ovulação (Orlandi, 2008).

O GnRH, FSH suíno (FSH-p), FSH equino purificado (FSH-e), extrato de pituitária equina (EPE) e a imunoneutralização da inibina foram utilizados nos processos de superovulação na espécie equina (Squires *et al.*, 1986; Dipert *et al.*, 1992; Squires & Seidel, 1995; McCue, 1996).

A utilização de FSH-p nas doses de 8 a 50 mg em éguas cíclicas demonstrou baixa efetividade, não sendo capaz de aumentar satisfatoriamente o número de ovulações, mantendo média inferior a 1,8 ovulações/égua (Squires *et al.*, 1986; Squires & Seidel, 1995; McCue, 1996) com exceção do trabalho de Krekeler *et al.* (2006), o qual relata 2,28 ovulações em média utilizando 25 mg duas vezes ao dia. Em estudos recentes utilizando a mesma (25 mg) ou o dobro (50 mg) da dose aplicada com a mesma frequência não foi possível obter múltiplas ovulações e/ou aumentar satisfatoriamente o índice de recuperação de embriões (Ignácio *et al.*, 2007, 2008 (Abstract-SBTE-2008); Mendes *et al.*, 2008 (Abstract-SBTE-2008)).

O FSH exerce efeito primordial no recrutamento e emergência da onda folicular e a inibina sintetizada pelos folículos reduz a secreção desse hormônio. Portanto a imunoneutralização ativa ou passiva contra a inibina foi realizada visando manter as concentrações de FSH elevada, prevenindo desta forma, a atresia folicular e, conseqüentemente, a obtenção de múltiplas ovulações, com resultados inconsistentes (McCue, 1996).

O EPE utilizado a partir da década de 70 (Douglas *et al.*, 1974) e o FSHe a partir de 2003 (Niswender *et al.*, 2003) mostraram-se efetivos para induzir múltiplas ovulações em éguas. Ainda assim, grande variabilidade na resposta ovariana é observada na dependência da dose utilizada, dia do ciclo estral e características foliculares no momento do início do tratamento (Scoggin *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2003).

Consideráveis variações são observadas na dose do agente utilizado (4 a 50 mg), com aplicações únicas ou duplas. De maneira geral o tratamento padrão utilizando EPE ou FSHe, consiste em 12,5 mg duas vezes ao dia, iniciando-se o tratamento nos dias 5 a 7 do ciclo estral, sendo a luteólise induzida por administração de PGF2 α no mesmo dia ou até dois dias mais tarde. O tratamento continua até que a maioria dos folículos alcance diâmetro ≥ 35 mm, sendo então a ovulação induzida com dose única de hCG (Scoggin *et al.*, 2002; Niswender *et al.*, 2003). Com a recomendação mencionada são necessários cerca de sete dias de tratamento, com elevado custo, que aliado à relativa indisponibilidade comercial do EPE ou do FSHe limitam seu emprego no processo super-ovulatório.

Pesquisas recentes têm objetivado reduzir o tempo de tratamento sem prejuízo da resposta ovulatória ou embriões recuperados. A estratégia proposta por pesquisadores da Universidade do Colorado-EUA consiste em iniciar o tratamento quando a doadora apresente folículos em desenvolvimento e com diâmetros entre 20 e 25 mm, interrompendo-o quando estes atingem 32 a 33 mm (Squires, 2005), com isto espera-se que o tempo de tratamento seja reduzido para cerca de quatro dias. Na confirmação desta proposta Orlandi (2008) estimulou éguas com 12,5 mg EPE duas vezes ao dia, iniciando o tratamento em diferentes momentos do desenvolvimento folicular e comprovou

que ao iniciar o processo super-ovulatório em éguas com folículos entre 20 e 23 mm pertencente à mesma onda, o tempo de tratamento foi reduzido para 3 a 4 dias, mantendo média de duas ovulações por égua.

A população e o diâmetro folicular ao início do tratamento são possíveis fatores de interferência na resposta ovulatória. Iniciando o EPE (12,5 mg) na presença de folículos ≥ 26 mm de uma onda conhecida, apenas 40% (4/10) das éguas apresentaram dupla ovulação e a codominância em duas éguas no primeiro dia de tratamento, possivelmente influenciaram esta resposta, o que parece indicar uma possível interferência do folículo dominante (≥ 26 mm) sobre a baixa resposta ovulatória (Orlandi, 2008).

Doses elevadas de EPE aumentam o número de ovulações e embriões recuperados por égua. Quando 25mg de EPE duas vezes ao dia são utilizadas, as médias de ovulações podem variar de 4,7 (Scoggin *et al.*, 2002) a 7,1 (Alvarenga *et al.*, 2001), sendo o maior resultado uma resposta atípica em relação ao encontrado na literatura. O uso de 12,5 mg resultou em 3,4 ovulações (Scoggin *et al.*, 2002). O aumento no número de ovulações parece implicar em menor índice de recuperação de embriões por ovulação, 49% para 25 mg (Alvarenga *et al.*, 2001), 43,2% (25 mg) e 67,6 % (12,5 mg) (Scoggin *et al.*, 2002). A causa do baixo índice de embriões por ovulação não está completamente elucidada. Há uma menor porcentagem de oócitos viáveis (60%) oriundos de éguas super-ovuladas em relação às não estimuladas (90%), bem como baixa taxa de obtenção de oócitos do oviduto de éguas com mais que três ovulações. Estes fatos foram atribuídos à presença de grande coágulo na fossa de ovulação, o que pode impedir a captação do oócito pelas fimbrias (Carmo *et al.*, 2006).

Baixas doses de EPE ou FSHe (4 a 8 mg) têm sido utilizadas com o objetivo de reduzir custos e aumentar em torno de 50% o número de ovulações, possibilitando a recuperação de pelo menos um embrião por coleta (Rocha Filho, 2004).

PRODUÇÃO *in vitro* E *in vivo* DE EMBRIÕES.

Fecundação in vitro (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)

Diferente do que acontece em bovinos, o resultado da FIV não é satisfatório na espécie equina. Relata-se o nascimento de dois potros com aplicação desta técnica e em ambos os casos os óocitos utilizados foram maturados *in vivo* (Palmer *et al.*, 1991; Bézard *et al.*, 1992).

As barreiras ao processo da FIV em eqüinos são principalmente, a maturação oocitária e a capacitação espermática.

A obtenção de oócitos a partir da aspiração de folículos *in vivo* é relativamente simples na espécie equina devido ao grande tamanho do folículo pré-ovulatório, mas, a taxa de recuperação oocitária de folículos imaturos é baixa em função da forte ligação do oócito à parede folicular (Hinrichs, 1998). A superovulação pode ser utilizada visando aumentar o número de folículos pré-ovulatórios, no entanto, não garantem grande número de oócitos e nem resultados consistentes.

Vários tratamentos para capacitar espermatozóides eqüino foram utilizados, sendo o cálcio ionóforo o único que apresentou bons resultados (Squires *et al.*, 2003).

Devido ao baixo sucesso dos métodos convencionais de FIV, técnicas como a ICSI tem sido empregada. 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.*, 2003).

A ICSI transpõe barreiras como a adesão e penetração espermática ao oócito (Squires *et al.*, 2003) e quando comparada à técnica de FIV, apresenta maior taxa de fertilização (Dell'Aquila *et al.*, 1997). Métodos para uma produção eficiente de zigotos eqüinos (Choi *et al.*, 2002) e de cultura *in vitro* de embriões eqüinos pós ICSI até o estadio de blastocisto foram desenvolvidos (Choi *et al.*, 2004; Hinrichs *et al.*, 2005). No entanto tais métodos podem estar associados ao desenvolvimento apenas do trofoblasto pós-transferência o que sugere inadequado desenvolvimento da massa celular interna dos blastocistos cultivados (Hinrichs *et al.*, 2007), se apontado como causa a inadequação nas concentrações de cálcio (White *et al.*, 2004).

A ICSI tem se mostrada promissora e o nascimento de dois potros já foram relatados por Li *et al.* (2001) e cinco por Galli *et al.* (2007).

Transferência de oócitos e intrafalopiana de gametas (GIFT)

A transferência de oócitos (TO) é uma alternativa para o aproveitamento genético de éguas incapazes de produzir embriões devido a causas adquiridas. A técnica consiste em transferir oócito da doadora para o oviduto da receptora, a qual é inseminada convencionalmente, antes e/ou imediatamente após a transferência (Carnevale, 2004). Desta forma, a fertilização e o desenvolvimento embrionário e fetal ocorrem *in vivo*, na receptora. O primeiro nascimento de potro a partir da TO ocorreu no final da década de 80, sendo a eficiência de prenhez de 7% (1/15) (Mckinnon *et al.*, 1988). Com a evolução da técnica, Carnevale & Ginther (1995) obtiveram 92% (11/12) de desenvolvimento embrionário.

Os oócitos utilizados são obtidos por aspiração de folículos pré-ovulatórios, assim, a maturação oocitária ocorre *in vivo*. O momento da aspiração é determinado a partir da aplicação do hCG ou GnRH na doadora com folículo(s) ≥ 35 mm, podendo ser realizada 24 a 36 horas após (Carnevale, 2004). Várias técnicas de colheita de oócitos tem sido descritas, mas a aspiração guiada por ultra-sonografia é a menos invasiva e apresenta índice de recuperação de 77% quando realizada em folículos pré-ovulatórios (Carnevale *et al.*, 2005). Oócitos coletados 36 horas após a administração do hCG estão prontos para a transferência imediata, já aqueles obtidos 24 horas após são usualmente cultivados *in vitro* por 12 a 16 horas antes da transferência (Carnevale, 2004).

Éguas cíclicas ou não cíclicas podem ser usadas como receptoras. As cíclicas são sincronizadas com a doadora e tem seu folículo pré-ovulatório aspirado para evitar que seu oócito seja fertilizado. A TO é realizada por procedimento cirúrgico com o animal em estação e acesso pelo flanco, similar aos métodos descritos para a transferência cirúrgica de embriões (Squires & Seidel, 1995).

A GIFT, realizada primeiramente por Carnevale *et al.* (1999), 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 espermatozoides móveis (2 a 5×10^5) e a taxa de desenvolvimento embrionário varia de 27 a 82%. Esta taxa depende do sêmen utilizado, sendo menor para o sêmen congelado ou resfriado em comparação ao sêmen fresco (Carnevale *et al.*, 2000; Coutinho da Silva *et al.*, 2001).

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 embrionários para oócitos enucleados foi realizada no Canadá (Willadsen, 1989). No entanto, a produção de um clone produzido a partir de um indivíduo adulto foi relatada pela primeira vez em 1997 com o nascimento da ovelha Dolly (Wilmut *et al.*, 1997). Estes autores demonstraram a possibilidade de induzir células já diferenciadas, para o estado de quiescência e estas serem capazes de apresentar desenvolvimento embrionário normal.

O sucesso na formação de um produto vivo a partir de células somáticas abriu portas para várias pesquisas na mesma linha usando outras espécies. Em equinos, a primeira transferência nuclear para produção de embriões foi publicada por Li *et al.* (2000). Parte deste atraso deve-se aos baixos resultados obtidos na FIV, no entanto, com o desenvolvimento 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). Mesmo assim, foi relatado o nascimento de três mulas clonadas por Woods *et al.* (2003) e alguns meses depois, o nascimento da primeira potra clonada a partir de células diferenciadas (Galli *et al.*, 2003). Outros dois produtos foram obtidos nos Estados Unidos por Hinrichs *et al.* (2006). Além disso, potros clonados já foram produzidos por empresas comerciais (Hinrichs *et al.*, 2006). As taxas de perdas embrionárias e fetais foram elevadas durante os experimentos, porém os potros nascidos não necessitaram de assistência obstétrica e parecem se desenvolver normalmente (Galli *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2003).

Diversas implicações decorrentes da técnica, como: (1) expressão epigenética devido à reprogramação incompleta dos núcleos das células somáticas após a transferência para o oócito receptor; (2) fatores associados à cultura de embriões *in vitro* que podem afetar o produto e/ou o parto; (3) presença de DNA mitocondrial do oócito receptor no clone; (4) variações individuais, como manchas da pelagem e marcas determinadas geneticamente variam devido à migração das células durante o desenvolvimento fetal; (5) efeitos ambientais influenciam no desenvolvimento fetal, no crescimento e comportamento do potro; (6) “envelhecimento” precoce devido a curtos fragmentos de telômeros formados durante a fase de gametogênese (Hinrichs *et al.*, 2006). Ainda com muitas dificuldades, mas unida aos vários estudos, a técnica de clonagem na espécie equina já vem sendo utilizada comercialmente com a obtenção de produtos viáveis.

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

O primeiro potro nascido a partir de embrião equino congelado, foi relatado por Yamamoto *et al.* (1982) e no Brasil por Meira & Alvarenga. (1993).

A congelação ou vitrificação de embriões, podem ser aplicadas na preservação de material genético, exportação, aproveitamento de embriões excedentes dentro da estação de monta e aproveitamento de ciclos estrais de éguas doadoras de raças com estação reprodutiva definida pelo ano hípico.

O sucesso da congelação é dependente de fatores como: a velocidade de resfriamento, tamanho e estadios embrionários, crioprotetor utilizado, entre outros. Os ritmos de resfriamento tiveram por base os utilizados para embriões bovinos, com pequenas variações. Especialmente, da temperatura ambiente até a temperatura do “seeding” (-6 a -7°C).

Os pesquisadores são unânimes quanto ao maior sucesso de prenhez para embriões pequenos (<300µm de diâmetro, nas fases de mórula ou blastocisto inicial) comparados aos grandes (>300µm, nas fases de blastocisto ou

blastocisto expandido), pois os maiores sofrem sérios danos celulares no processo de congelação e descongelação (Meira *et al.*, 1993; Squires *et al.*, 2003). O insucesso de embriões grandes na congelação está, possivelmente, relacionado à baixa permeabilidade da cápsula embrionária ao crioprotetor. Os tratamentos pré-congelação de embriões grandes com tripsina visando aumentar a permeabilidade da cápsula, e/ou a utilização de substâncias que contribuem na estabilização do citoesqueleto celular como a citocalasina, não contribuíram para a sobrevivência satisfatória dos embriões após a descongelação, sendo relatados índices de prenhes variáveis entre zero e 42% (Maclellan *et al.*, 2002).

Embora a primeira gestação de embrião equino vitrificado tenha ocorrido em 1994 (Hochi *et al.*, 1994), avanço significativo no domínio desta técnica ocorreu recentemente, a qual vem sendo utilizada na rotina da reprodução assistida equina. Tal avanço se deve aos excelentes resultados obtidos por Eldridge-Panuska *et al.* (2005) 62% e Hudson *et al.*, (2006) 75% de prenhez.

A refrigeração de embriões equinos a 5°C independente de seu tamanho, mantendo-os a essa temperatura por até 24 horas é uma realidade, permitindo assim o transporte a longas distâncias, mantendo-se a viabilidade embrionária e índices de gestação, similares aos embriões transferidos a fresco (Squires *et al.*, 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um grande avanço no conhecimento envolvendo as biotécnicas aplicadas a reprodução assistida ocorreu ao longo dos anos. Entretanto, diversos aspectos nas diferentes biotécnicas não estão completamente elucidados, sendo isto, motivação para novos estudos. No entanto, o conhecimento gerado já pode ser utilizado na rotina da reprodução assistida equina e algumas das tecnologias desenvolvidas se aplica sem reservas no setor produtivo e com sucesso comprovado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga, M.A.; McCue, P.M.; Squires, E.L.; Neves Neto, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. *Theriogenology*, v. 56, 879-887, 2001.
- Bézar, J. *In vitro* fertilization in the mare. *Proc Int Sci Conf Biotech Horse Reprod*, p.12, 1992.
- Carmo, M.T.; Losino, L.; Aquilar, J.J.; Araújo, G.H.M.; Alvarenga, M.A. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.337-339, 2006.
- 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.; Ginther, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono.*, v.1, p.209-214, 1995.
- Carnevale, E.M.; Alvarenga, M.A.; Squires, E.L.; Choi, Y.H. Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. *Proceedings of the Annual Conference Society for Theriogenology*, Nashville, TN, pp.44, 1999.
- Carnevale, E.M.; Maclellan, L.M.; Coutinho da Silva, M.A.; Scott, T.J.; Squires, E.L. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology*, v.54, p.982-987, 2000.
- Carnevale, E.M.; Coutinho da Silva, M.A.; Panzani, D.; Stokes, J.E.; Squires, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, v.64, p.519-527, 2005.
- Choi, Y.H.; 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 sperm. *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.
- 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. *J Anim. Sci.*, v.80, p.1275-1279, 2002.
- 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.
- Dipert, K.D.; Hofferer, S.; Palmer, E.; Jasko, D.J.; Squires, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. *Theriogenology*, v.38, p.695, 1992.
- Douglas RH, Ginther OJ, Nuti L. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology*, v.2, p.133-141, 1974.
- Eldridge-Panuska, W.D.; Caracciolo Di Brienza, V.; Seidel Jr, G.E.; Squires, E.L.; Carnevale, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v. 63, p.1308-

- 1319, 2005.
- 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.
- Hinrichs, K. Production of embryos by assisted reproduction in the horse. *Theriogenology*, v.49, p.13-21, 1998.
- Hinrichs K. Equine Cloning. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.22, p.857-866, 2006.
- Hinrichs K.; Choi, Y.H.; Love, L.B. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biology of Reproduction*, v.72, p.1142-1150, 2005.
- Hinrichs, K.; Choi, Y.H.; Walckenaer, B.E.; Varner, D.D.; Hartman, D.L. *In vitro* produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology*, v.68, p.521-529, 2007.
- Hochi, S.; Fujimoto, T.; Braun, J.; Oguri, N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, v.42, p.483-488, 1994.
- Ignácio, F.S.; Bergfelt, D.R.; Orlandi, C.; Montechiesi, D.F.; Wechsler, F.S.; Meira, C. Ovarian response to pFSH and embryo recovery following follicular wave emergence induced by follicle ablation in mares. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1245, 2007.
- Krekeler, N.; Hollinshead, F.K.; Fortier, L.A.; Volkmann, D.H. Improved ovulation and embryo recovery rates in mares treated with porcine FSH. *Theriogenology*, v. 66, p.663-687, 2006.
- Li, X.; Morris, L.H.; Allen, W.R. Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei [abstract]. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Ser.*, v.25, p.77, 2000.
- Li, X.; Morris, L.H.A.; Allen, W.R. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction*, v.121, p.925-932, 2001.
- MacLellan, L.J.; Carnevale, E.M.; Coutinho Da Silva, M.A.; McCue, P.M.; Seidel Jr, G.E.; Squires, E.L. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology*, v.58, p.717-720, 2002.
- Martin, J.C.; Klug, W.; Günzel, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large straws. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.27, p.47-51, 1979.
- McCue, P.M. Superovulation. *Vet. Clin. North Amer. Equine Practice*. v.12, n.1, p.1-11, 1996.
- McKinnon, A.O.; Carnevale, E.M.; Squires, E.L.; Voss, J.L.; Seidel Jr. G.E. Heterogeneous and xenogenous fertilization of *in vivo* matures equine oocytes. *J. Equine Vet. Sci.*, v.8, p.143-147, 1988.
- Meira, C.; Alvarenga, M.A. Potros nascidos de embriões congelados no Brasil. *ARS Veterinária*, v.9, p.181, 1993.
- Meira, C.; Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Oba, E.; Landim-Alvarenga, F.C. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. *Equine Vet. J. suppl.*, 15, p.64-66, 1993.
- Niswender, K.D.; Alvarenga M.A.; McCue P.M.; Hardy Q.P.; Squires E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *J. Equine Vet. Sci.*, v.23, p.497-500, 2003.
- Oguri, N.; Tsutsumi, Y. Non-surgical egg transfer in mares. *Journal Reproduction Fertility*, v.41, p.313-320, 1974.
- Orlandi, C.M.B. Resposta ovariana e concentrações plasmáticas de FSH em éguas submetidas à aspiração folicular e tratadas com extrato de pituitária equina (EPE). 2008. 68f Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho".
- Palmer, E.; Bézard, J.; Magistrini, M.; Duchamp, G. *In vitro* fertilization in the horse: a retrospective study. *Journal Reproduction Fertility (Suppl.)*, v.44, p.375-384, 1991.
- Rocha Filho, A.N. Efeito do tratamento com baixa dose de extrato de pituitária ou FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Scoggin C.F.; Meira C.; McCue P.M.; Carnavale E.M.; Nett T.M.; Squires E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology*, v. 58, n.1, p.151-164, 2002.
- Squires, E.L. Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.69-81, 2005.
- Squires, E.L.; Seidel, G.E. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin* 8. Colorado State University, Fort Collins, CO, pp.24-26, 1995.
- Squires, E.L.; Seidel, G.E. Jr. Superovulation. In: *Collection and transfer of equine embryos*. *Anim. Reprod. and Biotechnology Lab., Bulletin* n.8, Fort Collins, Colorado, 1995. p.32-38.
- Squires, E.L.; Garcia, M.C.; Ginther, O.J.; Voss, J.L.; Seidel Jr., G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulation hormone for superovulating mares. *Theriogenology*, v.26, p. 661-670, 1986.
- Squires, E.L.; Carnevale, E.M.; McCue, P.M.; Bruemmer, J.E. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*,

v.59, p.151-170, 2003.

White, K.L.; Woods, G.L.; Vanderwall, D.K.; Li, G.P. Sessions, B.R., Bunch, T.D. Why clone horses and mules?
IEEE Eng Med Biol Mag, v.23, p.32-36, 2004.

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

Wilmut, I.; Schnieke, A.E.; McWhir, J.; Kind, A.J.; Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult
mammalian cells. *Nature.*, v.385, p.810-813, 1997.

Woods, G.L.; White, K.L.; Vanderwall, D.K.; Li, G.P.; Aston, K.I.; Bunch, T.D.; Meerdo, L.N.; Pate, B.J. A mule
cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v.301, p.1063, 2003.

Yamamoto, Y.; Oguri, N.; Tsutsumi, Y.; Hachinohe, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos.
Journal Reproduction Fertility (Suppl.), v.32, p.399-403, 1982.

STATE OF THE ART IN EQUINE ASSISTED REPRODUCTION

C. Meira; F.S. Ignácio; J.C. Ferreira; D.F. Montechiesi; S.D. Bicudo

Universidade Estadual Paulista - FMVZ – Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - Campus de Botucatu, São Paulo - 18618-000 meira@fmvz.unesp.br

INTRODUCTION

Knowledge on equine freezing semen and artificial insemination have improved significantly after Martin *et al.* (1979) publication, continued by successive studies aiming to achieve important variants for the technique advance, as the ideal extender composition profile, centrifugation effects and cooling process.

Regarding to equine embryo transfer, large progress also occurred since the first pregnancy was reported by Oguri & Tsatsumi (1974), and now, this technique has been used commercially in several countries.

Other relevant issues on equine assisted reproduction, as superovulation, embryo cryopreservation, *in vitro* fertilization, intracytoplasmic sperm injection, gamete intrafallopian transfer, and cloning, had special attention from researchers since the 80's, looking for taking advantage of high genetic potential animals.

SUPEROVULATION IN THE MARE

Induction of multiple ovulations in horses have been applied with the objective of increasing the number of recovered embryos per collection and consequently reducing the costs of the embryo transfer (ET), as well as increasing the offer of oocytes for “*in vitro*” studies. Superovulatory treatments in monovulatory species, like mares, aim to select a higher number of follicles as possible from a same follicular wave stimulating their development until ovulation (Orlandi, 2008).

GnRH, porcine FSH (pFSH), purified equine FSH (eFSH), equine pituitary extract (EPE), and the inhibin immunoneutralization have been used in superovulatory treatments in horses (Squires *et al.*, 1986; Dipert *et al.*, 1992; Squires & Seidel, 1995; McCue, 1996).

Treatments with pFSH used in cycling mares with doses from 8 to 50mg have showed lower efficacy, because it is not able to satisfactorily increase the number of ovulations, maintaining means lower than 1.8 ovulations/mares (Squires *et al.*, 1986; Squires & Seidel, 1995; McCue, 1996). An exception is made for Krekeler (2006), they reported a mean of 2.28 ovulations after treatment with 25mg BID of pFSH, but recent studies using the same (25 mg) or the double (50 mg) dose with the same frequency were not able to induce multiple ovulations and increase embryo recovery rates (Ignácio *et al.*, 2007, 2008 (Abstract-SBTE-2008); Mendes *et al.*, 2008 (Abstract-SBTE-2008)).

FSH has a primordial effect in recruitment and emergence of follicular waves, and the Inhibin synthesized by follicles decrease the secretion of FSH. Therefore, active or passive inhibin immunoneutralization aims to keep high the FSH concentration, preventing the follicular regression, and consequently, obtaining multiple ovulations with inconsistent results (McCue, 1996).

EPE treatments have been used since the 70's (Douglas *et al.*, 1974) and eFSH since 2003 have showed effectiveness on inducing multiple ovulations in mares (Niswender *et al.*, 2003). Nevertheless, a high variability on ovarian response is observed on the dependence of the used dose, estrous cycle day and follicular characteristics at the moment of the start of treatment (Scoggin *et al.*, 2002; Squires *et al.*, 2003).

Significant variations have been reported for the dose of the used agent (4 to 50 mg), with one (SID) or two (BID) applications. Generally, the standard protocol used for EPE or eFSH treatments consists of 12.5 mg BID initiated between days 5 and 7 of the estrous cycle. PGF2 α is used at the same or two days later to induce the luteolysis. Treatment is maintained until the majority of follicles reach ≥ 35 mm. Subsequently, ovulation is induced with a single dose of hCG (Scoggin *et al.*, 2002; Niswender *et al.*, 2003). With the mentioned recommendation, seven days of treatment are necessary, which added to the commercial unavailability of hormone, increase the treatment cost, make the treatment implantation difficult.

Recently studies aims to decrease number of treatment days without affecting negatively the ovulatory response and embryo recovery rate. The proposed strategy suggested from researchers at the University of Colorado – USA consists on starting treatment when developing follicles from the donors reach diameters between 20 and 25 mm and stopping when they reach 32 to 33 mm (Squires, 2005), so a decrease on treatment length to four days is expected. Supporting this hypothesis, Orlandi (2008) stimulated mares with 12.5 mg EPE -BID, beginning the treatment at different moments of follicular development, proved that superovulatory treatment in mares started with follicles between 20 and 23 mm at the same follicular wave. She obtained a reduction on time of treatment to 3 or 4 days, maintaining a satisfactory ovulatory response.

Follicular population and diameter at the beginning of treatment are possible factors that interfere on ovulatory response. When EPE (12.5 mg) was started on the presence of follicles ≥ 26 mm from a known wave only 40% (4/10)

of mares presented double ovulations and the established codominance in two mares at the beginning of treatment possibly influenced on the response. These findings suggest the influence of the dominant follicle (≥ 26 mm) upon the lower ovulatory response (Orlandi, 2008).

Higher doses of EPE increase the number of ovulations and recovered embryos per mare. When 25mg of EPE - BID were used, mean ovulations can vary from 4.7 (Scoggin *et al.*, 2002) to 7.1 (Alvarenga *et al.*, 2001). However, the greater mean is an uncommon response in relation to the described previously. The use of 12.5 mg resulted in 3.4 ovulations (Scoggin *et al.*, 2002). Increased number of ovulations reflects on lower embryo recovery rate per ovulation, 49% for 25 mg (Alvarenga *et al.*, 2001), 43.2% (25 mg) and 67.6 % (12.5 mg) (Scoggin *et al.*, 2002). The cause of lower embryo/ovulation level is not totally elucidated. There are a lower percentage of viable oocytes (60%) from superovulated mares compared to control (90%) and lower oocytes recover from mares oviducts with more than three ovulations. This fact was attributed to the presence of large blood clots in the ovulatory fossa that could affect the oocyte capture by the infundibulum frimbias (Carmo *et al.*, 2006).

Lower doses of EPE or eFSH (4 to 8 mg) have been used with the objective of reduction in costs and an increase of over 50% in the number of ovulations, making possible a recover of at least one embryo per collection (Rocha Filho, 2004).

IN VITRO AND IN VIVO EMBRYO PRODUCTION

In vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection

Different from bovine, results of *in vitro* Fertilization (IVF) is not satisfactory in horses. It is reported the birth of two foals using conventional IVF and, in both cases, oocytes used were *in vivo*-maturated (Palmer *et al.*, 1991; Bézard *et al.*, 1992).

Major barriers for IVF process in horses are the oocyte maturation and the sperm capacitation.

Oocytes recovery via *in vivo* follicle aspiration is a relatively simple technique due to the large size of the preovulatory follicle. However, a low recovery rate of oocytes from immature follicles is attributed to its strong attachment to follicular wall (Hinrichs, 1998). Superovulation can be applied to increase the number of preovulatory follicles, although it does not warrant a higher rate of oocytes and neither a consistent response.

Treatments for equine spermatocapacitation have been done showing better results when using the calcium ionophore A23187 (Squires *et al.*, 2003).

Despite the unsuccessful results from conventional IVF techniques, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) techniques have been developed. In this technique, the oocytes are collected, matured, denuded, and only those oocytes containing the first polar body are used. The semen sample, fresh or frozen-thawed, is washed, placed in a media with polyvinylpyrrolidone and the sperm is scored across the tail. The spermatozoa had are then injected into the oocyte, and the oocyte is either chemically activated or not activated and then either cultured *in vitro* or transferred into the oviduct of a recipient (Squires *et al.*, 2003).

ICSI eliminates problems related to sperm binding and penetration to the oocyte (Squires *et al.*, 2003), and when compared to the IVF technique, it shows a higher fertilization rate (Dell'Aquila *et al.*, 1997). Efficient methods for production of equine zygotes (Choi *et al.*, 2002) and *in vitro* culture of equine embryos by ICSI until the blastocyst stage were developed (Choi *et al.*, 2004; Hinrichs *et al.*, 2005). However, these methods can be related to development of only trophoblasts gestation post-transfer. This suggests an inadequate internal cellular mass development of the cultured blastocysts (Hinrichs *et al.*, 2007), which the cause probably is from the different concentrations of calcium (White *et al.*, 2004).

ICSI is a promising technique and birth of two foals were reported by Li *et al.* (2001) and five foals reported by Galli *et al.* (2007).

Oocyte transfer and GIFT

Oocyte transfer (OT) is an alternative for the genetic use of subfertile mares because of acquired reproductive problems and that fails on producing embryos. This technique consist on transferring donor mares oocytes to the oviduct of recipients conventionally inseminated right before or right after transfer (Carnevale, 2004). Therefore, the fertilization and embrionary/fetal development occur *in vivo* in the recipients. The first foal was born from an oocyte transfer in the late 1980s, with 7% of pregnancy efficiency (1/15; Mckinnon *et al.*, 1988). However, with the advance of the technique, Carnevale & Ginther (1995) obtained 92% (11/12) of embrionary development.

Oocytes for these use are collected from aspiration of preovulatory follicles, therefore, maturation occurs *in vivo*. The moment of aspiration is based on the time of hCG or GnRH administration in donors with follicles ≥ 35 mm, occurring 24 or 36 hours after the hormonal application (Carnevale, 2004). Numerous techniques of oocyte collection have been reported. Although, ultrasound-guided aspiration is the less invasive method and it shows a 77% recuperation rate when performed in preovulatory follicles (Carnevale *et al.*, 2005). Oocytes collected 36 hours after hCG administration are ready to be immediately transferred while oocytes recovered 24 hours after are usually *in vitro* cultured for 12 to 16 hours before transfer (Carnevale, 2004).

Cycling and non-cycling mares can be used as recipients. Cycling mares are synchronized with the donor and her preovulatory follicle is aspirated to avoid its oocyte fertilization. OT is surgically performed with the animal standing and by flank access, similar to methods described for surgical embryos transfer (Squires & Seidel, 1995).

Gamete intrafallopian transfer (GIFT) was firstly performed by Carnevale *et al.* (1999) and involves simultaneous deposition of semen and oocyte into the oviduct. This technique allows the use of low sperm doses (2×10^5 mobile sperms) and the embryonic development rate after GIFT ranges from 27 to 82%. This rate depends on the used spermatozoa, being lower for frozen-thawed or cooled spermatozoa in comparison to fresh semen (Carnevale *et al.*, 2000; Coutinho da Silva *et al.*, 2001).

Cloning

In mammals, cloning of embryos by embryo splitting was performed soon after the development of ET techniques. Embryonic cloning by transfer of individual embryonic blastomeres to enucleated oocytes was first reported in Canada (Willadsen, 1989). However, production of a clone of an adult individual was first published in 1997 with the birth of the sheep Dolly (Wilmut *et al.*, 1997). These authors showed the possibility of induction of a differentiated cell to the quiescence stage and capability their development in embryo.

Successful production of live offspring from somatic cell opened the doors for a remarkable amount of work in a variety of species. In horses, the first nuclear transfer for embryo production was published by Li *et al.* (2000). Part of this delay in horses is a consequence of the low results obtained in IVF, however, when ICSI became repeatable, this was used to test *in vitro* matured oocytes and to provide embryos for the study of equine embryonic culture requirements (Hinrichs *et al.*, 2005).

Initially, work in nuclear transfer was frustrating because fusion rates between oocytes and donor cells were low and cleavage rates were lower than 15% (Hinrichs, 2006). Even though, the births of three cloning mules were reported by Woods *et al.* (2003) and, few months later, the first cloning foal from adult differentiated cells (Galli *et al.*, 2003). Other two clones were produced in the United States of America by Hinrichs *et al.*, (2006). Also, cloned foals have already been produced by commercial companies (Hinrichs *et al.*, 2006). High embryonic and fetal loss rates were reported, however foals were born without veterinary assistance and show normal development (Galli *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2003).

Various implications secondary to cloning, as: 1) epigenetic problems due to incomplete reprogramming of the somatic cell nucleus post transfer to the recipient oocyte; 2) factors associated to the *in vitro* embryo culture that can affect the offspring and/or birth; 3) presence of mitochondrial DNA of the recipient oocyte in the clone; 4) individual variations, such as white markings that are genetically determined due to migration patterns of cells during the fetal development; 5) environmental factors influencing fetal development, growing rate, and behavior of the foal; 6) premature aging due to formation of short telomeres fragments during gametogenesis, which is skipped in cloning techniques (Hinrichs *et al.*, 2006). Even though, many difficulties are still present, equine cloning techniques is already in commercial use and providing viable offsprings.

EMBRYO CRYOPRESERVATION

The first foal born from a frozen-thawed equine embryo was reported by Yamamoto *et al.* (1982), and in Brazil by Meira & Alvarenga (1993).

Freezing or vitrification of embryos can be applied to the preservation and exportation of genetic material, storage of remain embryos from a reproductive season, and to take advantage of estrous cycle of athlete donors mares which have their reproductive season defined by the competitive year schedule.

Success of cryopreservation depends of several factors, as freezing speed, size and developmental stage of the embryo, and cryoprotector chosen. Cooling rates were based on the ones used for bovine, with little variations. In particular, room temperature until "seeding".

Researchers are unanimous about the higher success of smaller embryos pregnancies (diameter $<300\mu\text{m}$, morula or initial blastocyst stages) than for large embryos ($>300\mu\text{m}$, blastocyst or expanded blastocyst stages), since the large ones suffer severe cellular damages during the freezing and thawing processes (Squires *et al.*, 2003; Meira *et al.*, 1993). Probable, the reason for the unsuccessful of large embryos freezing is correlated to low permeability of the embryonic capsule in the cryoprotector. Pre-freezing treatments of large embryos with trypsin, which aims to improve the permeability of the capsule and/or the use of substances that contribute to cellular cytoskeleton stabilization, did not contribute for the post-thawed survival of the embryos, being reported pregnancy rates between zero and 42% (MacLellan *et al.*, 2002).

Even though the first pregnancy from a vitrified equine embryo occurred in 1994 (Hochi *et al.*, 1994), a significant improvement of the technique management occurred during the last years and it have been in used on clinical routines. This improvement is due to excellent results obtained by Elgrige-Panuska *et al.* (2005) with 62% and Hudson *et al.* (2006) with 75% of gestation.

Equine embryos cooling at 5°C is not dependent of its size, keeping them at this temperature for until 24 hours is a reality, allowing the transport of long distances, maintaining the embryonic viability and pregnancy rate,

similar to fresh embryos (Squires *et al.*, 2003).

CONCLUSION

Significant advances on the knowledge of applicable biotechnologies in assisted reproduction occurred over the last years. However, various aspects of different techniques are not completely known to the moment, making additional studies necessary. However, actual knowledge can be already used in the equine assisted reproduction routine and some developed technologies are applied unconditionally at the production section with proved success.

REFERENCES

- Alvarenga, M.A.; McCue, P.M.; Squires, E.L.; Neves Neto, J.R. Improvement of ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with EPE twice daily. *Theriogenology*, v. 56, 879-887, 2001.
- Bézar, J. *In vitro* fertilization in the mare. *Proc Int Sci Conf Biotech Horse Reprod*, p.12, 1992.
- Carmo, M.T.; Losino, L.; Aquilar, J.J.; Araújo, G.H.M.; Alvarenga, M.A. Oocyte transport to the oviduct of superovulated mares. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.337-339, 2006.
- 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.; Ginther, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono.*, v.1, p.209-214, 1995.
- Carnevale, E.M.; Alvarenga, M.A.; Squires, E.L.; Choi, Y.H. Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. *Proceedings of the Annual Conference Society for Theriogenology*, Nashville, TN, pp.44, 1999.
- Carnevale, E.M.; Maclellan, L.M.; Coutinho da Silva, M.A.; Scott, T.J.; Squires, E.L. Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology*, v.54, p.982-987, 2000.
- Carnevale, E.M.; Coutinho da Silva, M.A.; Panzani, D.; Stokes, J.E.; Squires, E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, v.64, p.519-527, 2005.
- Choi, Y.H.; 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 sperm. *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.
- 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. *J Anim. Sci.*, v.80, p.1275-1279, 2002.
- 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.
- Dipert, K.D.; Hofferer, S.; Palmer, E.; Jasko, D.J.; Squires, E.L. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH analogue. *Theriogenology*, v.38, p.695, 1992.
- Douglas RH, Ginther OJ, Nuti L. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology*, v.2, p.133-141, 1974.
- Eldridge-Panuska, W.D.; Caracciolo Di Brienza, V.; Seidel Jr, G.E.; Squires, E.L.; Carnevale, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v. 63, p.1308-1319, 2005.
- 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.
- Hinrichs, K. Production of embryos by assisted reproduction in the horse. *Theriogenology*, v.49, p.13-21, 1998.
- Hinrichs K. Equine Cloning. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.22, p.857-866, 2006.

- Hinrichs K.; Choi, Y.H.; Love, L.B. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biology of Reproduction*, v.72, p.1142-1150, 2005.
- Hinrichs, K.; Choi, Y.H.; Walckenaer, B.E.; Varner, D.D.; Hartman, D.L. *In vitro* produced equine embryos: production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology*, v.68, p.521-529, 2007.
- Hochi, S.; Fujimoto, T.; Braun, J.; Oguri, N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, v.42, p.483-488, 1994.
- Ignácio, F.S.; Bergfelt, D.R.; Orlandi, C.; Montechiesi, D.F.; Wechsler, F.S.; Meira, C. Ovarian response to pFSH and embryo recovery following follicular wave emergence induced by follicle ablation in mares. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1245, 2007.
- Krekeler, N.; Hollinshead, F.K.; Fortier, L.A.; Volkmann, D.H. Improved ovulation and embryo recovery rates in mares treated with porcine FSH. *Theriogenology*, v. 66, p.663-687, 2006.
- Li, X.; Morris, L.H.; Allen, W.R. Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei [abstract]. *J. Reprod. Fertil. Abstr. Ser.*, v.25, p.77, 2000.
- Li, X.; Morris, L.H.A.; Allen, W.R. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction*, v.121, p.925-932, 2001.
- Maclellan, L.J.; Carnevale, E.M.; Coutinho Da Silva, M.A.; McCue, P.M.; Seidel Jr, G.E.; Squires, E.L. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology*, v.58, p.717-720, 2002.
- Martin, J.C.; Klug, W.; Gúnzel, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large straws. *J. Reprod. Fertil. Suppl*, v.27, p.47-51, 1979.
- McCue, P.M. Superovulation. *Vet. Clin. North Amer. Equine Practice*. v.12, n.1, p.1-11, 1996.
- McKinnon, A.O.; Carnevale, E.M.; Squires, E.L.; Voss, J.L.; Seidel Jr. G.E. Heterogeneous and xenogenous fertilization of *in vivo* matured equine oocytes. *J. Equine Vet. Sci.*, v.8, p.143-147, 1988.
- Meira, C.; Alvarenga, M.A. Potros nascidos de embriões congelados no Brasil. *ARS Veterinária*, v.9, p.181, 1993.
- Meira, C.; Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Oba, E.; Landim-Alvarenga, F.C. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. *Equine Vet. J. suppl.*, 15, p.64-66, 1993.
- Niswender, K.D.; Alvarenga M.A.; McCue P.M.; Hardy Q.P.; Squires E.L. Superovulation in cycling mares using equine follicle stimulating hormone (eFSH). *J. Equine Vet. Sci.*, v.23, p.497-500, 2003.
- Oguri, N.; Tsutsumi, Y. Non-surgical egg transfer in mares. *Journal Reproduction Fertility*, v.41, p.313-320, 1974.
- Orlandi, C.M.B. Ovarian response and FSH plasma concentrations in cyclic mares submitted to follicle ablation preceding equine pituitary extract (EPE) administration. 2008. 68f Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho".
- Palmer, E.; Bézard, J.; Magistrini, M.; Duchamp, G. *In vitro* fertilization in the horse: a retrospective study. *Journal Reproduction Fertility (Suppl.)*, v.44, p.375-384, 1991.
- Rocha Filho, A.N. Efeito do tratamento com baixa dose de estrato de pituitária ou FSH purificado equino no crescimento folicular, taxa de ovulação e recuperação embrionária em éguas. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Scoggin C.F.; Meira C.; McCue P.M.; Carnavale E.M.; Nett T.M.; Squires E.L. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology*, v. 58, n.1, p.151-164, 2002.
- Squires, E.L. Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.69-81, 2005.
- Squires, E.L.; Seidel, G.E. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin* 8. Colorado State University, Fort Collins, CO, pp.24-26, 1995.
- Squires, E.L.; Seidel, G.E. Jr. Superovulation. In: *Collection and transfer of equine embryos*. *Anim. Reprod. and Biotechnology Lab.*, Bulletin n.8, Fort Collins, Colorado, 1995. p.32-38.
- Squires, E.L.; Garcia, M.C.; Ginther, O.J.; Voss, J.L.; Seidel Jr., G.E. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulation hormone for superovulating mares. *Theriogenology*, v.26, p. 661-670, 1986.
- Squires, E.L.; Carnevale, E.M.; McCue, P.M.; Bruemmer, J.E. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v.59, p.151-170, 2003.

- White, K.L.; Woods, G.L.; Vanderwall, D.K.; Li, G.P. Sessions, B.R., Bunch, T.D. Why clone horses and mules? IEEE Eng Med Biol Mag, v.23, p.32-36, 2004.
- Willadsen, S.M. Cloning of sheep and cow embryos. *Genome*, v.31, p.956-62, 1989.
- Wilmot, I.; Schnieke, A.E.; McWhir, J.; Kind, A.J.; Campbell, K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Woods, G.L.; White, K.L.; Vanderwall, D.K.; Li, G.P.; Aston, K.I.; Bunch, T.D.; Meerdo, L.N.; Pate, B.J. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v.301, p.1063, 2003.
- Yamamoto, Y.; Oguri, N.; Tsutsumi, Y.; Hachinohe, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *Journal Reproduction Fertility (Suppl.)*, v.32, p.399-403, 1982.