

SERGIO LUIZ DA SILVEIRA CAMARGO JR.

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DE ÉGUAS VELHAS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,  
para obtenção do grau de médico veterinário.

Preceptor: Prof. Adj. Dr. Marco A. Alvarenga

Botucatu

2009

SERGIO LUIZ DA SILVEIRA CAMARGO JR.

BIOTECNOLOGIAS APLICADAS À REPRODUÇÃO DE ÉGUAS VELHAS

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado  
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,  
para obtenção do grau de médico veterinário.

Área de concentração: Reprodução Animal

Preceptor: Prof. Adj. Dr. Marco A. Alvarenga

Coordenador de estágios: Prof. Ass. Dr. Francisco José Teixeira Neto

Botucatu

2009

CAMARGO JR., S.L.S. Biotecnologias aplicadas à reprodução de éguas velhas. Botucatu, 2009, 23p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

**Resumo:**

A aceitação de biotecnologias pela maioria das associações de raças equinas teve um efeito significativo na indústria do cavalo, ganhando popularidade em todo o mundo, pois além de incrementar o ganho genético, permite a utilização de éguas e garanhões subférteis com alto valor genético na reprodução. A produção *in vitro* de embriões humanos e bovinos tem sido realizada com sucesso, porém a produção de embriões após a fertilização *in vitro* não é eficiente em equinos. Diferentes técnicas estão sendo desenvolvidas para transpor essa barreira, como a transferência de oócito e a injeção de espermatozóide intracitoplasmática (ICSI). A transferência de oócito vem sendo utilizada principalmente em éguas velhas inférteis, pelo fato destas éguas apresentarem patologias reprodutivas como: endometrite, aderências cervicais e uterinas, ovidutos bloqueados, lacerações perineais e falhas de ovulação, permitindo com o uso dessa técnica uma maior produção de descendentes. Durante o processo de recuperação de oócitos, estes devem ser coletados de folículos imaturos que necessitam ser maturados *in vitro* ou folículos pré-ovulatórios através da aspiração guiada por ultrassonografia transvaginal. O oócito recuperado é transferido a uma égua receptora previamente inseminada, através de laparotomia pelo flanco. A injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) é uma técnica de fertilização *in vitro*, na qual um único espermatozóide é aspirado e injetado dentro de um oócito. Os oócitos utilizados podem ser de folículos maduros ou imaturos, devendo esses serem maturados *in vitro*. Sêmen fresco, resfriado ou congelado podem ser utilizados, pois a técnica não necessita de um espermatozóide funcional, capacitado e com reação acrossomal. A utilização do piezo drill resultou em um grande avanço, permitindo com as vibrações por minuto proporcionadas na pipeta de injeção espermática, um maior resultado de oócitos clivados, devido à melhor injeção do espermatozóide no oócito. A transferência do embrião pode ser direta no oviduto cirurgicamente, como também por transferência transcervical após cultura do embrião produzido *in vitro*. Conclui-se que ambas as técnicas são eficazes na reprodução assistida de equinos subférteis, obtendo resultados ainda abaixo do esperado, mas satisfatórios de animais geneticamente superiores.

Palavras chave: éguas, transferência de oócito, injeção espermática intracitoplasmática, infertilidade, fertilização, embrião.

CAMARGO JR., S.L.S. Biotechnologies applied to old mares reproduction. Botucatu, 2009. 23p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

**Abstract:**

The acceptance of biotechnology for the most equine breeders association had a significant effect in the horse industry, gaining popularity around the world, because the increasing on the genetic gain, allowing the use of sub fertile mares and stallions with high genetics value on reproduction. The embryos in vitro production of human and cattle has been used with success, however in vitro embryo production is not efficient in the horse, as oocyte transfer (OT) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The oocyte transfer has been used especially in subfertile old mares presenting reproductive pathologies as: endometrite, cervical and uterine adhesions, blocked oviduct, perineal laceration and ovulation failures. During oocyte recovery process, the oocytes must be collected from immature follicles that need be matured in vitro or in vivo matured oocytes from pre-ovulatory follicles through the transvaginal aspiration guided by ultrasound. The recovered oocyte is transferred to a previously inseminated recipient mare, through the flank laparotomy. The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a procedure of in vitro fertilization that needs only one sperm that is aspirated and injected inside the oocyte. The oocytes used, can be from mature and immature follicles. Fresh, cooled and frozen semen can be used, because the procedure not requires a functional sperm. The use of Piezo drill resulted in a breakthrough the pellucid zone, allowing the vibration per minute provided in the sperm injection pipette, a major result of cleaved oocytes, due to a better sperm injection in the oocyte. The embryo transfer can be straight inside the oviduct, as also transcervical transferred after embryo culture produced in vitro. In conclusion both procedures (OT and ICSI) are effective to be used on equine assisted reproduction, getting results even lower than expected, but satisfactory from animal genetically superior.

Keywords: Mares, oocyte transfer, intracytoplasmic sperm injection, infertility, fertilization, embryo.

**SUMÁRIO:**

|   |    |
|---|----|
| RESUMO.....   | 3  |
| ABSTRACT.....   | 4  |
| 1. Introdução.....                                    | 6  |
| 2. Transferência de oócito.....                       | 7  |
| 2.1 Uso clínico da transferência de oócito.....       | 8  |
| 2.1.1 Coleta de oócitos.....                          | 9  |
| 2.1.2 Cultura de oócitos.....                         | 11 |
| 2.1.3 Técnica de transferência propriamente dita..... | 11 |
| 3. Injeção espermática intracitoplasmática.....       | 14 |
| 4. Conclusão.....                                     | 17 |
| 5. Referências Bibliográficas.....                    | 18 |

## 1. Introdução:

Por muitos anos, a inseminação artificial foi a técnica de reprodução assistida mais amplamente utilizada na indústria de reprodução equina (Squires, 2005). Algumas biotecnologias têm sido desenvolvidas para melhorar a produção de éguas e garanhões valiosos considerados subférteis, como também para utilização de gametas depois da morte do animal. A produção *in vitro* de embriões humanos e bovinos tem sido realizada com sucesso, porém a produção de embriões após a fertilização *in vitro* não é eficiente em equinos. Diferentes técnicas estão sendo desenvolvidas para transpor essa barreira, como a transferência de oócito, a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e a injeção de espermatozóide intracitoplasmática (ICSI).

O relato do primeiro potro experimental gerado por transferência de oócito ocorreu no fim dos anos 80 (McKinnon et al., 1988). Entretanto o uso clínico deste procedimento não começou antes do fim dos anos 90 (Hinrichs et al., 2000). A transferência de oócito está sendo utilizada para a obtenção de gestações de éguas consideradas inférteis utilizando métodos padrões de reprodução ou transferência de embriões (Carnevale et al., 2001a). Entretanto, é necessário que estas produzam oócitos viáveis para o sucesso da técnica (Carnevale, 2006).

Oócitos podem ser coletados de folículos imaturos ou de folículos no processo de maturação. A coleta de oócitos de folículos pré-ovulatórios possuem vantagens e desvantagens quando comparados a outros estágios do ciclo reprodutivo. O número de folículos pré-ovulatórios em uma égua são limitados por ser uma espécie monovular, além disto, a superovulação em equinos leva a alterações de maturação de oócitos e dificuldades na manipulação ovariana durante a aspiração folicular (Carmo, 2007). Entretanto, a taxa de coleta de oócitos é usualmente maior em folículos pré-ovulatórios após a indução da ovulação com hCG e/ ou GnRH do que em folículos imaturos, (Carnevale 2001b). Sendo assim, os oócitos coletados são transferidos cirurgicamente para uma égua receptora previamente inseminada, com o objetivo de melhorar o

ambiente uterino para sobrevivência e transporte do espermatozóide, fertilização do oócito e desenvolvimento embrionário.

Métodos eficientes de recuperação de oócito de éguas vivas têm sido utilizados, contudo a utilização dos oócitos em técnicas de maturação *in vitro* possui um caráter limitado (Squires, 1996, Hinrichs 1998a), pois a fertilização *in vitro* (FIV) padrão, que consiste na cultura de oócitos com espermatozoides capacitados, não é eficiente em cavalos, devido a não capacitação dos espermatozoides, não ocorrência de reação acrossomal, alterações na zona pelúcida ou maturação *in vitro* incompleta do oócito, caracterizando na inabilidade do espermatozóide em penetrar a zona pelúcida *in vitro*. Existem relatos de apenas dois potros nascidos com a produção convencional da FIV, ambos resultando da inseminação de um oócito maturado *in vivo* (Palmer et al., 1991; Bezard et al., 1992). Entretanto, a eficiente fertilização *in vitro* em oócitos equinos, é possível utilizando a injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) (Squires et al., 1996; Grondahl et al., 1997; Li et al., 2000), pois transpassa eventos críticos da fertilização, como a reação acrossomal, vínculo e penetração da zona pelúcida e fusão espermatozóide e oócito.

As taxas de fertilização foram melhoradas com a dissecação parcial da zona pelúcida, remoção parcial da zona pelúcida, injeção espermática subzonal e perfuração da zona pelúcida (Alvarenga & Landin-Alvarenga, 2008). Além disso, a utilização do piezo drill, promoveu um grande avanço na obtenção de oócitos clivados, devido as vibrações por minuto causada na pipeta de injeção espermática, facilitando a injeção do espermatozóide (Katayose et al., 1999) Oócitos equinos fertilizados pela ICSI, têm sido utilizados com um desenvolvimento efetivo no sistema de cultura de embriões equinos, sendo que esses embriões equinos produzidos têm sido transferidos transcervicalmente e cirurgicamente no oviduto (Squires et al., 1996; McKinnon et al., 2000) das éguas receptoras, resultando em nascimentos de potros normais.

## **2. Transferência de Oócito:**

A transferência de oócito é uma biotecnologia utilizada na reprodução de éguas, de alto valor genético, das quais não podem ser coletados

embriões por causa da alta incidência de falhas de ovulações em éguas de idade avançada (>18 anos), ovidutos bloqueados, e patologias de útero e cérvix. O sucesso do processo é dependente de vários fatores, sendo o principal o ambiente reprodutivo saudável da receptora para garantir a sobrevivência e o transporte espermático, fertilização do oócito e desenvolvimento embrionário (Carnevale 2006).

A técnica consiste na aspiração guiada por ultra-som de um folículo pré-ovulatório, previamente induzido com hCG associado a um análogo do GnRH (acetato de deslorelina) 24 a 36 horas antes da aspiração folicular, podendo ou não necessitar de maturação. A receptora é previamente inseminada (6 a 12 horas antes) para que os espermatozóides capacitados estejam disponíveis no oviduto no momento da transferência de oócito.

### **2.1 Uso clínico da transferência de oócito:**

Transferência de oócito tem sido usado como procedimento clínico, em éguas com subfertilidade que não podem produzir embriões viáveis por causa de falha reprodutiva associada com anormalidades oocitárias, de ovulação, de oviduto, de útero e cérvix (Carnevale, 2004).

É sabido que a fertilidade de éguas doadoras diminui depois 15 a 18 anos de idade. Carnevale (2008) relatou comparações morfológicas através da microscopia de luz e eletrônica de oócitos de folículos pré-ovulatórios de éguas jovens (3-19 anos) e velhas (>19anos), que os oócitos de éguas velhas apresentaram uma maior quantidade de vesículas (>1% de volume) em relação as éguas jovens, como também o número médio de vesículas por oócito de éguas velhas foi maior do que éguas jovens. Além disso, muitos oócitos provenientes de éguas velhas apresentaram anomalias, dentre elas uma vesícula ocupando mais que 50% do ooplasma, uma vesícula dentro do núcleo, oócitos com formas atípicas, seções do ooplasma sem organelas e partes do oolema sem microvilosidades.

Taxas de gestação após a transferência de oócito de éguas jovens são melhores que os oócitos transferidos de éguas velhas. Quando os oócitos foram coletados de folículos de éguas jovens (6-10 anos) e éguas velhas (20-26 anos) e

transferidos em ovidutos de éguas receptoras jovens (3-7 anos), um número significativamente maior de oócitos de éguas jovens obteve mais desenvolvimento de vesículas embrionárias, do que os oócitos de éguas velhas (11/12, 92% e 8/26, 31% respectivamente) (Carnevale & Ghinter, 1995).

Carnevale et al. (2001b) relataram que gestações foram estabelecidas a partir de três éguas de um grupo de quatro éguas doadoras  $\leq 16$  anos após uma única transferência. Em contrapartida, apenas uma gestação foi estabelecida de um grupo de seis éguas doadoras  $\geq 20$  anos após uma transferência, e apenas uma éguas não obteve gestação depois de repetidas transferências. Para se obter uma gestação de uma égua doadora velha, foi requerido de 2 a 4 transferências.

### **2.1.1 Coleta de oócitos:**

A maioria dos oócitos são coletados a partir de folículos pré-ovulatórios, pois oócitos imaturos apresentam dificuldades em maturar *in vitro*. Desta forma, a maturação folicular ocorre *in vivo*, e os efeitos deletérios que podem ocorrer *in vitro* são minimizados. Assim como, nos equinos, a anatomia da ligação do oócito com a parede folicular interfere na eficiência de recuperação oocitária *in vivo*. Na égua, o folículo possui um pedículo que liga as células da teca com a parede folicular. Essa projeção é uma extensão das células da granulosa pela camada da teca. No pedículo de ligação apresenta uma extensão das células da granulosa e polissacarídeos que compõe esse pedículo como um componente de fixação das células do *cumulus* (Hawley et al., 1995), sendo assim esta ligação só é desfeita com a indução da ovulação. Devido a isso, no momento da aspiração é necessário escarificar a parede folicular para o desprendimento do *cumulus*, diferentemente dos bovinos, onde as células do *cumulus* com o oócito ficam soltas dentro do folículo.

A atividade ovariana deve ser monitorada através da ultrasonografia transretal para determinar o desenvolvimento folicular. Coletas de oócitos são programados baseando-se no momento da administração dos indutores de ovulação. As éguas doadoras são induzidas com associação de hCG (1500-2000 UI, i.v.) e acetato de deslorelina (1mg/ml), sendo que esta combinação

proporciona uma melhor resposta do folículo e um oócito de maior qualidade em éguas velhas (Carnevale et al., 2000). Os critérios preconizados para a administração de hCG e GnRH são: (I) folículo com diâmetro  $\geq 35$  milímetros, (II) cérvix relaxada e tônus uterino, (III) edema uterino e comportamento estral. Carnevale (2004) preconiza que a recuperação dos oócitos seja feita 24 a 36 horas após a administração de hCG (1500-2500UI, i.v.)

A recuperação dos oócitos pode ser feita por laparotomias (Volgelsang et al., 1986), punção de flanco (Palmer et al., 1986), colpotomias (Hinrichs & Kenney, 1987) e aspiração transvaginal guiada por ultra-som (Carnevale & Ghinter, 1993; Cook et al., 1993). O método de escolha para a aspiração folicular é a aspiração guiada por ultra-som com transdutor curvilíneo ou linear por não comprometer as habilidades reprodutivas e permitir utilizá-lo em ciclos consecutivos. O transdutor é acoplado a um guia com a agulha de aspiração e posicionado no interior da vagina, lateral a projeção cervical e ipsilateral ao ovário que contem o folículo pré-ovulatório. Manipulações retais são realizadas para posicionar o ovário com o folículo pré-ovulatório contra o transdutor e a agulha. Uma agulha (diâmetro 12, lúmen duplo) é colocada dentro do guia, no posicionamento em que se pode perfurar a parede vaginal e o folículo pré-ovulatório.

O fluido folicular é aspirado do folículo utilizando uma bomba de vácuo na pressão de 150 mm Hg ou por grandes seringas. Após a remoção do fluido folicular, o lúmen folicular pode ser lavado com meio no volume de 50 a 100 mL, podendo ser solução tampão de fosfatos (PBS) ou meio para recuperação embrionária contendo soro fetal e heparina (10UI/mL) para prevenir a coagulação. Após o processo de aspiração folicular, o líquido recuperado é colocado em uma placa de petri para o complexo *cumulus*-oócito ser procurado com o auxílio de um estéreo microscópio binocular. Embora a presença de uma grande massa de células do *cumulus* que compõe o complexo *cumulus*-oócito facilite a procura no líquido com a presença de sangue, essa grande massa celular dificulta a manipulação do oócito. A taxa de recuperação oocitária pode variar com a experiência do veterinário. Carnevale (2003), durante três anos,

obteve uma taxa de recuperação de 98% (331/339) por ciclo de doadoras de caráter comercial e 76% (331/434) por folículo.

### **2.1.2 Cultura de oócitos:**

Os folículos pré-ovulatórios são aspirados e quando os oócitos são recuperados, apresentam-se em metáfase I ou II (Bezard et al. 1997). O intervalo entre a indução de ovulação e a transferência de oócito deve ser entre 36 e 44 horas. A maioria dos oócitos coletados até 24 horas após a indução com hCG estão em metáfase I e necessitam ser suplementados com um tempo de cultura para completar a maturação (Carnevale et al., 2005).

Sendo assim, após a coleta e classificação dos oócitos, os oócitos recuperados são transferidos para um meio de cultura de tecido (TCM-199) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,2mM de piruvato, e 50 µg/mL de gentamicina (Carnevale & Ghinter, 1995; Hinrichs et al., 1998b). Oócitos devem ser cultivados a uma temperatura de 38,2 - 39°C em uma atmosfera de 5 a 6 % de CO<sub>2</sub> e ar por 12 a 18 horas.

A maioria dos oócitos recuperados após 36 horas da administração de hCG apresentam-se em metáfase II podendo ser transferidos imediatamente para o oviduto da receptora. Carnevale et al. (2002) relataram taxas similares na coleta de oócitos e desenvolvimento embrionário de oócitos coletados 24 a 36 horas após a administração de hCG e transferidos imediatamente. Sendo assim, não foram observadas diferenças quando os oócitos foram aspirados 24 horas após a administração de hCG e transferidos imediatamente ou incubados *in vitro* durante 12 e 16 horas. Esses resultados eliminam a necessidade de um incubador com CO<sub>2</sub> de alto custo, tornando o procedimento mais prático para ser realizado a campo.

### **2.1.3 Técnica de transferência propriamente dita:**

A técnica de transferência de oócito envolve a utilização da égua receptora com o objetivo do trato reprodutivo possuir um ambiente saudável para a sobrevivência, transporte e capacitação espermática, fertilização do oócito e desenvolvimento embrionário, por isso, é de extrema importância a seleção de éguas receptoras com tratos reprodutivos de alta qualidade para um programa de

transferência de oócito. As éguas receptoras devem ser jovens (3-10 anos), selecionadas pela sanidade do trato reprodutivo e comprimento do ligamento ovariano para a facilitação da exteriorização do ovário no momento do procedimento cirúrgico.

Podem ser utilizadas éguas ciclantes e não-ciclantes. A utilização de éguas ciclantes como receptoras de oócitos necessita de sincronização dos ciclos e remoção do oócito da receptora para se ter certeza que a gestação é da égua doadora. As éguas receptoras recebem 2000 UI de hCG no mesmo momento da égua doadora, e o oócito da égua receptora é recuperado 24 horas após a administração de hCG, e apenas as éguas receptoras que tiveram os oócitos recuperados são utilizadas. Éguas não-ciclantes podem ser utilizadas eliminando a necessidade de sincronização dos ciclos com as éguas doadoras e a recuperação do oócitos de folículos pré-ovulatórios antes do momento da transferência. A preparação das éguas receptoras é realizada através da utilização de hormônios exógenos. No começo da estação de monta éguas em anestro e transicionais são utilizadas como receptoras (Carnevale & Ghinter, 1995; Hinrichs et al., 1998a).

O protocolo hormonal utilizado em éguas não ciclantes consiste na administração de benzoato de estradiol (3 mg diário) por 3-7 dias antes da transferência e após o tratamento com o benzoato de estradiol, administra-se progesterona injetável (200mg por dia) ou 0,044 mg/kg de progesterona oral (Altrenogest) após a transferência de oócito. Independente da utilização de éguas ciclantes e não-ciclantes, a progesterona exógena é requerida para a manutenção da gestação (Carnevale et al., 2001b) e deve ser suplementada, usando éguas ciclantes e não-ciclantes, até 110-120 dias. Apesar do corpo lúteo formado após a aspiração do folículo pré-ovulatório da égua receptora, a secreção de progesterona pode ser atrasada ou reduzida em éguas ciclantes (Hinrichs, 1991). Em éguas não-ciclantes, a ausência de corpo lúteo exige um suplementação de progesterona. Carnevale et al. (2001c) relatou que a taxa de gestação em transferências em nível comercial foi similar para éguas receptoras ciclantes e não-ciclantes (8/15, 53% e 37/93, 39%).

A transferência de oócito consiste em uma laparotomia a partir do flanco da égua receptora com procedimento cirúrgico similar ao descrito anteriormente por Squires e Seidel (1995) na técnica cirúrgica de transferência de embrião. Após a sedação e anestesia local é feita uma incisão entre a última costela e a tuberosidade ilíaca coxal. O ovário é localizado e exteriorizado através da incisão. O oócito é colocado em uma pipeta de vidro com uma pequena quantidade de meio (<0,05mL). A pipeta é introduzida aproximadamente 3cm dentro do oviduto e o oócito é depositado gentilmente. O ovário é repostado na cavidade abdominal, as camadas musculares e a pele são suturadas separadamente. As éguas receptoras rotineiramente são tratadas com drogas antiinflamatórias parenterais e antibióticos de amplo espectro por 5 a 7 dias.

Antes da transferência as éguas receptoras devem ser inseminadas para os espermatozoides estarem disponíveis no oviduto no momento do procedimento. Éguas receptoras de oócito podem ser inseminadas apenas uma vez (6-12 horas) antes da transferência, pois o oócito equino apresenta fertilidade de aproximadamente 12 horas após a ovulação (Ginther, 1992). As éguas receptoras devem ser inseminadas (12 horas antes) com no mínimo 500 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva podendo ser sêmen fresco ou resfriado. É de extrema importância a utilização de sêmen de garanhões com alta fertilidade, contudo, quando se utiliza sêmen de baixa qualidade outra inseminação deve ser feita 2 horas após a transferência. Existe a possibilidade de acúmulo de fluido após a segunda inseminação (Carnevale et al., 2005), provavelmente devido a relaxamento uterino associado com os sedativos utilizados. As éguas receptoras com acúmulos de fluido devem ser tratadas com ocitocina (20 UI) e lavagem uterina até 12 horas após a detecção de fluido uterino.

Gestações têm sido diagnosticadas quando as receptoras são inseminadas apenas antes (Maclellan et al., 2002) ou depois (Carnevale et al., 2000) da transferência de oócito. Carnevale et al.(2002) em um estudo onde éguas receptoras foram inseminadas com sêmen de dois diferentes garanhões, um antes da transferência de oócito e outro depois, observaram que 94% dos

embriões recuperados aos dezesseis dias de gestação foram gerados a partir da primeira inseminação, sendo que a confirmação foi feita através do teste de paternidade.

### **3. Injeção de espermatozóide intracitoplasmática (ICSI):**

O processo de fertilização no cavalo *in vivo* tem sido descrito (Betteridge et al., 1982; Grondahl et al., 1993) e a formação de blastocistos e o estabelecimento de gestações tem sido alcançados pela transferência de oócitos maturados *in vitro* em éguas receptoras. Por outro lado, existem poucos relatos de FIV em oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*. As razões da baixa taxa de FIV e desenvolvimento dos oócitos equinos permanecem incerto. A capacitação espermática (Alm et al., 2001), maturação de oócito (Li et al., 2001) e mudanças na zona pelúcida (Hinrichs et al., 2002) têm sido relatadas como possível razão da baixa taxa de aproveitamento da FIV. A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) é uma técnica de fertilização *in vitro*, na qual um único espermatozóide é aspirado e injetado dentro de um oócito. Exige um oócito maturo, ou seja, um oócito em metáfase II, que pode ser obtido através da aspiração de folículos pré-ovulatórios após a administração de gonadotrofinas ou através da maturação *in vitro* (Hinrichs, 2005).

A ICSI apresenta vantagens em relação a transferência de oócito na produção de embriões. Baixa qualidade espermática, baixa concentração espermática e ganhões que vieram a óbito e possuem poucas doses de sêmen congelado, que não seriam utilizados na transferência de oócito, podem ter sucesso na ICSI. Em relação as éguas, patologias de oviduto são incomuns, ocorrendo dificuldade de diagnosticar, mas patologias uterinas são comumente diagnosticadas. Tratamentos de infecções uterinas podem ter alto custo e insucesso em algumas éguas, resultando em falhas na recuperação embrionária. Outras patologias, tais como: lacerações cervicais, adesões uterinas e cervicais e acúmulo de fluido uterino, irão afetar a recuperação de embriões. Éguas que vieram a óbito ou eutanaziadas podem ter os ovários retirados para coletar os folículos presentes. O procedimento consiste em abertura do folículo e curetagem do mesmo para se obter o complexo *cumulus*-oócito e células da

granulosa. Oócitos coletados de folículos que não estão próximos da ovulação precisam ser maturados, para retornarem a meiose. Esses oócitos podem ser maturados em cultivo *in vitro* com a utilização de gonadotropinas, entretanto, somente cerca de 50 % irão maturar, e aqueles que maturarem possuem uma menor habilidade de produzir uma gestação do que oócitos maturados *in vivo* (Hinrichs & Choi, 2005).

Em outras espécies tais como ruminantes e porcos, a presença de *cumulus* expandido é ligada a coleta de oócitos de folículos atresícos e esses oócitos são geralmente descartados imediatamente por causa da sua extremamente baixa capacidade de desenvolvimento. Entretanto em cavalos, Hinrichs et al.(2005) em uma série de estudos demonstraram que os oócitos com *cumulus* expandido foram mais capazes de completar a maturação que oócitos com *cumulus* compacto (Hinrichs & Williams, 1997; Hinrichs & Schmidt, 2000). Como em bovinos, oócitos classificados como expandidos são originados de folículos em começo de atresia, os quais aparecem para induzir competência meiótica. Isso é algo surpreendente porque, em outras espécies, a presença de uma compacta e saudável células do *cumulus* é considerada um indicador para boa morfologia oocitária. Por não serem encontradas lises oocitária em oócitos coletados por aspiração guiada por ultra-som, esse achado implica que modificações *post-mortem* ocorrendo nos grandes ovários equinos são responsáveis pela degeneração dos oócitos originários de abatedouros (Galli et al., 2007).

Taxas de maturação nuclear têm sido similar (Zhang et al. 1989, Hinrichs et al., 1995), ou maiores que (Hinrichs & Williams, 1997; Hinrichs & Schmidt, 2000), aquelas dos oócitos compactos. Recentemente, Hinrichs et al. (2005) demonstraram que oócitos com *cumulus* compacto e *cumulus* expandido tem competência de desenvolvimento similar (38 e 32%) quando submetidos a tempo suficiente de maturação. Tem sido relatado que enquanto oócitos equinos expandidos levam 24 horas para maturação *in vitro*, oócitos compactos levam mais de 30 horas (Zhang et al. 1989, Hinrichs et al. 1993). Hinrichs et al. (2005) sugeriram que a competência de desenvolvimento de oócitos equinos foi afetada

pelo tempo requerido entre recuperar e cultivar e duração da maturação. A maturação dos oócitos, que ocorre logo após a coleta, é realizada com um meio de cultura de tecidos, com a adição de 10% de soro fetal bovino, 0,2mM de piruvato e 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de gentamicina. Os oócitos são maturados a 38,5°C e uma atmosfera de 6% de CO<sub>2</sub> e ar. (Altermatt, 2009)

Os espermatozóides utilizados na ICSI podem ser fresco, resfriado ou congelado, não existindo diferença significativa na taxa de desenvolvimento embrionário entre sêmen fresco e congelado. É um método que não necessita de um espermatozóide funcional, capacitado e com reação acrossomal. O procedimento utiliza a micro manipulação, um espermatozóide é selecionado, sua cauda é quebrada para se tornar imóvel, sendo que suas propriedades citolíticas são liberadas para ocorrer à ativação do oócito, após isso ocorre à injeção do espermatozóide no oócito (Hinrichs, 2005). A injeção evita a necessidade de ligação do espermatozóide ao oócito e posterior penetração.

Com a utilização do Piezo drill, aumentou as taxas de ativação e clivagem (Choi et al., 2002). Essa técnica consiste em causar vibrações por minuto na pipeta de injeção, isso não só apenas auxilia na penetração da zona pelúcida como também na garantia da ruptura das membranas plasmáticas do espermatozóide e do oócito. Na utilização do Piezo drill na ICSI com oócitos maturados *in vitro*, resultaram em uma taxa de 80% de clivagem, com a media > 8 células após 96 horas de cultura de embrião.

Na fertilização de oócitos mamíferos, o espermatozóide se liga a zona pelúcida e penetra na membrana plasmática pela fusão celular, a qual resulta em ativação do oócito. Como fator de ativação e o recomeço da meiose, ocorre a formação do pronúcleo, início da síntese de DNA e a primeira clivagem (Swan, 1991; Ben-Yosef & Shalgi, 1998). Uma vez que o espermatozóide se incorpora ao oócito ocorre a ativação do ooplasma, provocando a descondensação da cromatina e a fase inicial espermatozóide e oócito está iniciada. Dentre as técnicas utilizadas como ativação dos oócitos, está o aumento de padrão de Ca<sup>2+</sup> que auxilia na fertilização normal (Nakada & Mizuno, 1998), como também ionomicina e etanol, geram pico variados de cálcio intracelular no oócito. Já o

timerosal, induz picos padrões de cálcio intracelular, simulando o mesmo que ocorre em uma fertilização normal com um espermatozóide (Swan, 1991). Já o Inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) atua como segundo mensageiro no transporte intracelular de cálcio, promovendo uma ativação do oócito.

Oócitos fertilizados podem ser transferidos para o oviduto por métodos similares aos usados para transferências de oócitos, ou podem ser cultivados in vitro por 7 a 8 dias até o estágio de blastocisto, sendo depois transferido, por via transcervical, para o útero da égua receptora. A transferência direta é realizada cirurgicamente através de laparotomia pelo flanco (Galli et al., 2007)

A ICSI é uma biotecnologia que necessita de mais tempo para ser realizada, podendo apresentar risco de lise do oócito durante o procedimento, o que leva a redução da fertilização, sendo um método de mais baixa eficiência quando comparado a transferência de oócito, onde coleta-se um oócito maturo de um folículo pré-ovulatório e utiliza-se sêmen de boa qualidade.

#### **4. Conclusão:**

A reprodução assistida equina tem apresentado lentos progressos quando comparada a outras espécies pelas dificuldades impostas pela maturação oocitária e capacitação espermática, porém na última década a transferência de oócito e a ICSI têm permitido que éguas e garanhões subférteis e de alto valor genético passem a produzir descendentes. A aplicação dessas técnicas em equinos apresenta resultados eficientes, sendo biotecnologias valiosas para produção de animais genética e economicamente superiores, já sendo aplicadas comercialmente na Europa e Estados Unidos da America.

## 5. Referências Bibliográficas:

- ALM, H., TORNER, H., BLOTTNER, S. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horses oocytes. **Theriogenology**. 56. p. 817-829. 2001.
- ALTERMATT, J.L., SUH, T.K., STOKES, J.E., CARNEVALE, E.M. Effects of age and equine follicle-stimulating hormone (eFSH) on collection and viability of equine oocytes assessed by morphology and developmental competency after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reprod Fert Develop**. 21. p. 615-623. 2009.
- ALVARENGA, M.A, LANDIN-ALVARENGA, F.C. New assisted reproductive techniques applied for the horse industry. In Samper, J.C. editor: Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Elsevier Health Sciences.St. Louis, Missouri. p. 209-221. 2008.
- BEN-YOSEF, D. AND SHANGI, R.. Early ionic events in activation of the mammalian egg. **Reviews of Reproduction** 3, p. 6-103. 1998.
- BETTERIDGE, K.J., EAGLESOME, M.D., MITCHELL, D. Development of horse embryos up to twenty-two days after ovulation: observation on fresh specimens. **J. Anat.**. 135. p. 191-209. 1982.
- BEZARD, J. In vitro fertilization in the mare. **Proceedings of the international Scientific Conference on Biotechnics in Horse Reproduction, Crakow, Poland** abstract 12. 1992.
- BEZARD, J.; MEKARSKA, A.; GOUDET, G.; PALMER, E. Meiotic stage of the preovulatory equine oocyte at collection and competence of immature oocytes for in vitro maturation: effect of interval from induction of ovulation to follicle puncture. **Theriogenology**. 47. p. 386. 1997.
- CARMO, M.T. **Estudos da maturação oocitária de éguas superovuladas com o extrato de pituitária equina**. 2001. 150p. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

- CARNEVALE, E.M., GHINTER, O.J. Use of linear ultrasonic transducer for transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **J. Equine Vet. Sci.** 13. p. 331-333. 1993.
- CARNEVALE, E.M.; GHINTER, O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction Monograph.** 1. p.209-214. 1995.
- CARNEVALE, E.M.; USON, M.; BOZZOLA, J.J.; KING, S.S.; SCHMITT, S.J.; GATES, H.D. Comparison of oocytes from young na old mares with lighth and electron microscopy. **Theriogenology.** 51. p. 299. 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.** 54. p. 982-987. 2000.
- CARNEVALE, E.M.; CHECURA, C.H.; COUTINHO DA SILVA, MACLELLAN, L.J.; SQUIRES, E.L. Use of deslorelin acetate to supress follicular activity in mares used as recipients for oocyte transfer. **Theriogenology** 55. p.358. 2001a.
- CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; MACLELLAN, L.J.; ALVARENGA, M.A. SCOTT, T.J. Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 218. p. 87-91. 2001b.
- CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; CHECURA, C.M.; SCOGGIN, C.F.; SQUIRES, E.L. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Ani Reprod Sci.** 68. p. 305-314. 2001c.
- CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; MACLELLAN, L.J.; NEVES NETO, J.R.; SQUIRES, E.L. Effects of culture media and time of insemination on oocyte transfer. **Theriogenology.** 58. p. 759-762. 2002.
- CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SQUIRES, E.L. How to collect and transfer oocytes. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, LA.** p. 293-294. 2003.

CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. **Ani Reprod Sci.** 82-83. p. 617-624. 2004.

CARNEVALE, E.M., COUTINHO DA SILVA, M.A., PANZANI, D. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program of subfertile mares.

**Theriogenology.** 64. p. 519-527. 2005.

CARNEVALE, E.M.; MACCLELLAN, L.J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. **Vet. Clin. Equine.** 22. p. 843-856. 2006.

CARNEVALE, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology.** 69. p. 23-30. 2008

CHOI, Y.H.; OKADA, Y.; HOCHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI, N. In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae.

**Theriogenology.** 42. p. 795-802. 1994.

CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S.; HINRICH, 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** 123, p. 455-465. 2002.

COOK, N.L., SQUIRES, E.L., RAY, B.S., COOK, V.M., JASKO, D.J. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. **J. Equine Vet. Sci.** 15. p. 71-74. 1993.

GALLI, C.; OLLEONI, 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. **Ani Reprod Sci** 98. p. 39-55. 2007.

GINTHER, O.J. Reproductive Biology of the Mare. Segunda Edicao. Equiservices, Cross Plains, WI. p. 299-300. 1992.

GRONDAHL, C., GRONDAHL, N.C., GREVE, T., HYTTEL, P. *In vivo* fertilization and initial embryogenesis in the mare. **Eq Vet J Suppl.** 15. 79-83. 1993.

- GRONDAHL, C.; HANSEN, T.H.; HOSSAINI, A.; HEINZE, I.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Intracitoplasmatic sperm injection of in vitro-matured equine oocytes. **Biology Reproduction**. 57. p. 1495-1501. 1997.
- HAWLEY, L.R., ENDERS, A.C., HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology Reprod. Mono.** 1. p. 243-252. 1995.
- HINRICHS, K., KENNEY, R.M. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. **Theriogenology**. 27. p. 237. 1987.
- HINRICHS, K. The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. **Theriogenology**. 36. 157-168. 1991.
- HINRICHS, K.; SCHIMIDT, A. L.; FRIEDMAN, P. P.; SELGRATH, J. P.; MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biol Reprod** 48. p. 363-370. 1993.
- HINRICHS, K.; SCHIMIDT, A. L.; SELGRATH, J. P. Activation of horse oocytes. **Biology of Reproduction Monograph Series** 1. p. 319-370. 1995.
- HINRICHS, K.; WILLIAMS, K. A. Relationship among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biol Reprod** 57. p. 377-384. 1997.
- HINRICHS, K. Production of embryos by assisted reproduction in the horse. **Theriogenology** 49. p. 13-21. 1998a.
- HINRICHS, K.; MATTHEWS, G.L.; FREEMAN, D.A.; TORELLO, E.M. Oocyte transfer in mares. **J Am Vet Med . Assoc.** 212. p. 982-986. 1998b.
- HINRICHS, K.; BETSCHART, R.W.; MCCUE, P.M.; SQUIRES, E.L. Effect of time of follicle aspiration on pregnancy in nonovulating rate after oocyte transfer in the mare. **J Reprod Fertil Suppl.** 56. p. 493-498. 2000.
- HINRICHS, K.; SCHIMIDT, A. L. Meiotic competence in horse oocytes: interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology, and season. **Biol Reprod** 62. p. 1402-1408. 2000.

HINRICHS, K., LOVE, C.C., BRINSKO, S.P. *in vitro* fertilization of *in vitro* matured equine oocytes: effect maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. **Bio Reprod.** 67. p. 256-262. 2002.

HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology.** 64. p. 535 – 541. 2005.

HINRICHS, K. AND CHOI, Y. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clin Tech Equine Pract** 4. p. 210-218. 2005.

KATAYOSE, H.; YANAGIDA, K.; SHINOKI, T.; KAWAHARA, T.; HORIUCHI, T.; SATO, A. Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a piezo-derived pipette. **Theriogenology** 52. p. 1215-1224. 1999.

LI, L.Y.; MEINTJES, M.; GRAFF, K.J.; PAUL, J.B.; DENNISTON, R.S.; GODKE, R.A. In vitro fertilization and development of in vitro-matured oocytes aspirated from pregnant mares. **Biology of Reproduction Monograph.** 1. p. 309-317. 1995.

LI, X.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN W.R. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. **J Reprod Fert.** 119. p. 253-260. 2000.

LI, X., MORRIS, L.H., ALLEN, W.R. Influence of co-culture during maturation on the development potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reproduction.** 121. p. 925-932. 2001.

MACLELLAN, L.J.; CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SCOGGIN, C.F.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from superstimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology.** 58. p. 911-919. 2002.

MCKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L.; SEIDEL JR.; G.E. Heterogenous and xenogenous fertilization of in vivo matured equine oocytes. **J. Equine Vet Sci.** 8. p. 143-147. 1988.

MCKINNON, A.O.; LACHAM-KAPLAN, O.; TROUNSON, A.O. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection

(ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into in vivo matured mare oocytes.

**J Reprod Fert.** 56. p. 513-517. 2000.

NAKADA, K. AND MIZUNO, J. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. **Theriogenology** 50. p. 269-282. 1998.

PALMER, E. DUCHAMP, G., BEZARD, J., MAGISTRINI. M., KING, A., BOUSQUET, D., BETTERIDGE, K. Recovery of follicular fluid and oocytes of mares by non-surgical puncture of the preovulatory follicle. **Theriogenology**. 25. p. 178. 1986.

PALMER, E.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study **J Reprod Fert.** 44. p.375-385. 1991.

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. p. 24-26. 1995.

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

SQUIRES, E. L. Integration of future biotechnologies into equine industry. **Anim Reprod Sci.** 89. p. 187-198. 2005.

SWAN, K. Thimerosal causes calcium oscillations and sintetizes calcium-induced calcium release in unfertilized hamster egg. **FEBS Letters** 278. p. 175-178. 1991.

VOGELSANG, M.M., KRAEMER, D.C., BOWEN, M.J., POTTER, G.D. Recovery of equine follicular oocytes by surgical and non-surgical techniques. **Theriogenology**. 25. p. 208. 1986.

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



