

Tairini Erica da Cruz

Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide em Equinos

ARAÇATUBA

Junho de 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba

Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide em Equinos

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araçatuba, para obtenção do grau de médico veterinário.

Discente: Tairini Erica da Cruz

Orientador: Professor Alicio Martins Júnior

ARAÇATUBA

Junho de 2014

ENCAMINHAMENTO

Encaminhamos o presente Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso, para que o Conselho de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis.

Estagiária – Tairini Erica da Cruz

Supervisor – Alicio Martins Júnior

ARAÇATUBA

Junho de 2014

Sumário

Resumo.....	5
1. Introdução.....	5
2. Materiais e Métodos.....	7
2.1 Técnica.....	8
3. Resultados e Discussão.....	9
3.1 Fertilização <i>in vitro</i>.....	9
3.2 Qualidade do sêmen.....	10
3.3 Meio.....	11
3.4 Resultados comparados.....	12
4. Conclusão.....	13
5. Referência bibliográfica.....	15

RESUMO

As técnicas de reprodução assistida utilizadas para os equinos estão em grande desenvolvimento, mesmo com a escassa disponibilidade de ovários de abatedouro para serem feitos estudos e a relação animal/indivíduo entrando, neste caso, a política do bem estar animal e outros fatores que serão discutidos ao longo desta revisão.

Podemos afirmar que a técnica de ICSI promove resultados favoráveis à evolução da reprodução assistida, juntamente com outras técnicas, as quais muitas vezes são utilizadas para aprimorar o desenvolvimento e a produção de embriões, não mais necessitando do animal em si e sim de novas técnicas em produção *in vitro*.

Oócito equino tolera o estresse de injeção mecânica de espermatozoides no ooplasma, ou seja, há grande viabilidade da técnica em discussão. O sêmen de baixa qualidade ou com baixo número de espermatozoides pode ser utilizado, seguramente na ICSI, o método pode ser uma ferramenta para avaliar a maturação citoplasmática ou mesmo para substituir outras técnicas já descritas em literatura, mas que não alcançaram a eficiência esperada.

Palavras - chave: Injeção intracitoplasmática de espermatozoide, fertilização *in vitro*, maturação de oócito, inseminação artificial e equino.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida em equinos tem sido relativamente lento em comparação com outras espécies domésticas, como ruminantes e suínos. A limitada disponibilidade de oócitos maturados *in vivo*, o requisito para um grande número de doadoras de oócitos, o bem-estar animal e as questões econômicas envolvidas, são as principais razões pra este atraso, forçando a um desenvolvimento de procedimentos de maturação *in vitro* do oócito (GALI et al., 2007).

A partir de uma perspectiva histórica, desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida no cavalo remonta ao final do século XIX, quando Sir

Walter Heape estabeleceu a primeira gestação equina obtida por meio de inseminação artificial (HEAPE, 1898).

Além da inseminação artificial, a qual agora está bem desenvolvida na indústria de equinos (SQUIRES, 2005), outras tecnologias baseadas nos procedimentos de produção de embriões *in vivo* e *in vitro* surgiram apenas nos últimos anos (GALLI et al., 2007).

Apesar da fertilização *in vitro* (FIV) ser praticamente rotineira nas demais espécies domésticas o mesmo não acontece na espécie equina e diversos obstáculos necessitam ser transpostos para se atingir esse objetivo (CARNEIRO, 2012). Um dos principais obstáculos na FIV equina é a falta de métodos de capacitação dos espermatozoides de garanhão para realizar a ligação e posteriormente fusão com o oócito (VARNER et al., 1987; BLUE et al., 1989). Também tem sido questionado se o processo de maturação *in vitro* de oócitos equinos é fisiológico, uma vez que tem sido difícil provar a competência desta etapa na FIV (FULKA et al., 1981; DELL'AQUILA et al., 1997).

Estudos sobre o procedimento de ICSI em oócitos de mamíferos começaram em 1976, quando UEHARA e YANAGIMACHI (1976) relataram pela primeira vez que espermatozoides humanos desenvolveram-se em pronúcleos masculino, quando injetados no citoplasma de oócitos de hamster.

Subsequentemente, tem havido muitos relatos sobre a ICSI em outras espécies (IRITANI et al., 1995), e descendentes vivos foram obtidos em coelhos (HOSOI et al., 1988) e bovinos (GOTO et al., 1991).

A aplicação da ICSI em cavalos superou a barreira da ineficiência da FIV, resultando finalmente na primeira gestação oriunda de oócitos maturados *in vitro* (SQUIRES, 1996) levado com sucesso a termo, e documentado por CHOI et al. (2002) resultados atingindo taxas de prenhes de aproximadamente 60%.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão sistemática, na qual se objetivou descrever as principais vantagens da técnica e qual a colocação atual das pesquisas sobre este assunto, que traz, comprovadamente, muitas contribuições para a reprodução equina. A escolha do assunto se baseia no fato de ser uma técnica relativamente nova, de simples execução e que tem sido realizado na prática da clínica reprodutiva, todavia não há um arsenal de pesquisas sobre a técnica mesmo esta trazendo melhores resultados comparados a outros métodos de reprodução assistida em equinos.

O levantamento bibliográfico foi realizado durante os meses de Março e Abril de 2014 e revisado durante Maio e Junho do mesmo ano. As bases de dados utilizadas foram Scielo, Web of Science, PubMed, Science Direct e Google Scholar. A estratégia de busca nas bases de dados informatizados foram: (equine OR animal) and (intracytoplasmic sperm injection) and (*in vitro/vivo* matured equine oocytes) and (artificial insemination OR *in vitro* fertilization).

Pela análise do corpo dos resumos foram selecionados aqueles que atendiam ao critério de inclusão, ou seja, os que incluíam a descrição do procedimento, comparações com outras técnicas utilizadas na espécie ou mesmo outras revisões já estabelecidas. Estes critérios resultaram em quatorze trabalhos, escritos em Inglês, todos publicados entre 1989 e 2014, e com base inicial em livros de biotecnologia da reprodução.

2.1 TÉCNICA DA ÍCSI

Nesta técnica, os oócitos são obtidos, maturados, desnudos,, e em seguida aqueles com o primeiro corpúsculo polar aparente são utilizados. (SQUIRES, 1996). Injeção intracitoplasmática de espermatozoides requer um oócito maduro, ou seja, oócitos em metáfase II, estes podem ser obtidos por aspiração do folículo pré-ovulatório de uma égua, após a estimulação de gonadotrofina, ou pode ser obtido por meio de maturação de oócitos colhidos de folículos imaturos pequenos em post-mortem. (HINRICHS et al., 1995).

Os espermatozoides usados para a ICSI podem ser frescos ou congelado-descongelado; não há diferença significativa no desenvolvimento embrionário entre esses tipos de sêmen. (CHOI et al., 2002).

Como relatado por KIMURA et al. (1995) e KUROKAWA et al. (2003) a suspensão de espermatozoides é misturada com um volume igual de 12% de polivinilpirrolidona (Sigma) e uma gota de 50µl desta amostra é colocada em placa de Petri, que serve como câmara de microinjeção. As manipulações são realizadas em um microscópio invertido Nikon Diaphot (Nikon Inc., Garden City, NY). As injeções são realizadas com uma unidade de Piezo micropipeta - condução (Piezodrill®; Instruments Burleigh Inc. Fisher, NY). O espermatozoide é aspirado para a pipeta (cauda primeiro, se o espermatozoide foi utilizado intacto) e vários pulsos piezo elétrico são aplicados para imobilizar/permeabilizar a membrana plasmática. Relatado por HINRICHS (2005) o espermatozoide selecionado em uma micropipeta deve ter sua membrana quebrada para garantir que não tenha capacidade de se mover e que fatores citosólicos, importantes na ativação dos oócitos, sejam liberados.

Em seguida, proposto por KIMURA et al. (1995) e KUROKAWA et al. (2003), a ponta da pipeta contendo a cabeça do espermatozoide é movida até chegar à zona pelúcida e vários pulsos piezo são aplicados para o avanço da pipeta através da zona. Uma vez no espaço perivitelino, a pipeta é avançada ainda mais contra o oolema até o limite interno de seu córtex. A penetração do oolema é realizada por um ou dois impulsos de piezo de baixa intensidade, sendo a cabeça do espermatozoide injetada.

Inicialmente, os laboratórios que trabalhavam com ICSI em equinos tinham dificuldade em conseguir boas taxas de desenvolvimento do embrião após a injeção de espermatozoide. No entanto, em 2000, a utilização do Piezodrill na ICSI foi relatada, para aumentar, a ativação e taxas de clivagem (CHOI et al., 2004). Este dispositivo provoca vibrações minúsculas na pipeta de injeção; isto não só facilita a penetração na zona pelúcida, mas também garante a ruptura das membranas plasmáticas tanto do oócito quanto do espermatozoide.

Utilização da broca Piezo para realizar ICSI em oócitos maturados *in vitro* resultou em mais de 80% de clivagem, com uma média de mais de oito células por embrião clivado em 96 h de cultivo *in vitro* (CHOI et al., 2004).

Os blastocistos são identificados depois de 7-8 dias de cultura *in vitro*, e cada blastocisto pode ser transferido separadamente para uma égua receptora por transferência transcervical. Em contraste à transferência de oócitos, o número de transferências é limitado pelo valor que o cliente quer pagar. (HINRICHS et al., 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fertilização *in vitro*

Analisado por DELL'AQUILA et al. (1997), os principais problemas encontrados na FIV poderiam estar relacionados com a dificuldade na obtenção de uma capacitação eficiente do sêmen do garanhão. Os resultados foram selecionados mostrando a eficiência da ICSI sobre a FIV mesmo relacionando pontos de vista diferentes para uma discussão, como: obtenção de pró-núcleo ou clivagem, diferenças do cumulus dos produtos e taxa de penetração do espermatozoide, todos indicados pelo trabalho de DELL'AQUILA et al. (1997) e exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado da comparação da ICSI e FIV equina relacionado a taxa de fertilização em diferentes aspectos e taxa de penetração de espermatozoide

	ICSI	FIV
Taxa de fertilização com clivagem	29,8%, 17/57	8,7%, 9/103
Taxa de fertilização com oócitos com cumulus expandido	52,2%, 12/23	17%
Taxa de fertilização com oócitos com cumulus compactos	14,7%, 5/34	4,4%, 3/68
Taxa de penetração de espermatozoide	40,3%, 23/157	13,6%, 14/103

Adotar $P < 0,01$

Estes resultados indicam que a ICSI pode ser aplicada com sucesso em oócitos eqüinos maturados *in vitro* para aumentar as taxas de fertilização. (DELL'AQUILA et al., 1997)

3.2. Qualidade do Sêmen

A partir de oócitos maturados *in vitro*, LAZZARI et al. (2002) compararam a capacidade do desenvolvimento destes oócitos fertilizados através de ICSI com sêmen congelado e descongelado de garanhões com motilidade ou fertilidade diferentes, obtendo como resultado à equivalência de resultados a clivagem ou nas taxas de desenvolvimento embrionário; portanto, afirmaram que a ICSI permite a utilização de sêmen proveniente de garanhões de boa, pobre e sem fertilidade, desde que um espermatozoide com motilidade seja selecionado para a ICSI. Esses resultados também foram observados por GALLI et al. (2002).

Outrora CHOI et al. (2006) utilizando sêmen fresco ou congelado, em dois ciclos de congelamento e descongelamento, de um mesmo garanhão e juntamente com a técnica de ICSI, compararam o desenvolvimento de oócitos maturados *in vitro* e repetiram o procedimento para os maturados *in vivo*. Com base na formação de pró-núcleo e clivagem pós-fecundação, não houve diferença significativa entre as taxas de desenvolvimento para os diferentes procedimentos utilizados. Todavia, em relação aos oócitos maturados *in vivo* houve uma taxa maior de núcleos em ambos os grupos de espermatozoides, quando comparada com aqueles maturados *in vitro*.

Contradizendo LAZZARI et al. (2002), CHOI et al. (2005) mostraram uma menor taxa de desenvolvimento de blastocisto quando, o garanhão é subfértil a partir da comparação com garanhão fértil; afirmaram também que por meio da técnica ICSI houve produção de blastocistos transferíveis a partir de espermatozoides imóveis.

3.3 Meio

A evolução das tecnologias de MIV e de ICSI tem centrado esforços para projetar sistemas de cultivo adequados para embriões em estágio de clivagem precoce (CHOI et al., 2002).

Para executar qualquer técnica de reprodução assistida em equinos é importante a ativação do oócito *in vivo* e *in vitro*, mesmo não sendo um mecanismo totalmente compreendido atualmente. No entanto, é aceito que o aumento na concentração intracelular de cálcio livre ($[Ca_2^+]$) seja necessário para a ativação do oócito (GRONDAHAL et al., 1997).

O meio TALP Hepes revelou-se inadequado para a ICSI, pois foi observado que as células espermáticas de garanhão freqüentemente aglutinam-se, quando deixadas no meio até serem usadas para a ICSI, provavelmente devido à baixa concentração de cálcio neste meio (DELL'AQUILA et al., 1997).

Diversas condições de cultivo tem sido relatadas para o desenvolvimento de oócitos de equinos fertilizados através de ICSI, incluindo meios definidos como G1. 2 (CHOI et al., 2002), DMEM-F12 e CZB (CHOI et al., 2004b) e SOF modificado (GALLI et al., 2002). Na maioria destes sistemas, no entanto, as taxas de blastocisto permaneceram baixas, variando de 4 a 16%.

Recentemente, um sistema de cultivo *in vitro* foi desenvolvido utilizando o meio DMEM/F-12, sob uma atmosfera de gás mista, o qual produziu taxas de desenvolvimento de blastocisto semelhantes àquelas observadas *in vivo* (27-38%) (HINRICHS et al., 2005; CHOI et al., 2006a, b).

TREMOLEDA et al. (2003) utilizando meio SOF modificado restringiu-se a contagem do número de células, comparando embriões produzidos *in vivo* e os produzidos por cultivo *in vitro*, constatando que no dia sete do desenvolvimento os embriões produzidos *in vitro* tinham um número significativamente menor de células, assemelhando-se a embriões do dia cinco e não de embriões do dia sete. GALLI et al. (2001) demonstraram que esta diferença é, então, levada em conta, quando os embriões são transferidos para receptoras sincronizadas, com a vantagem de ter os embriões em estágio de desenvolvimento precoce

melhorando a sua criopreservação. Afirmaram que é notoriamente difícil de congelar embriões eqüinos recuperados *in vivo* por causa de seu grande volume.

3.4 Resultados comparados

A Tabela 2 resume resultados de diferentes autores que se propuseram pesquisar sobre a ICSI equina.

Tabela 2 - Resumo dos resultados comparando taxa de sobrevivência pós ICSI, taxa de desenvolvimento e taxa de fertilização

Método	Taxa	Autor
	76,5% para oócitos	
	91,3% para oócitos- expandidos	DELL'AQUILLA et al., 1997
	87%	GRONDAHL et al., 1997
	61,60%	. LI et al., 2000b; 2001
Taxa de sobrevivência pós ICSI	72% sêmen fresco	
	55% sêmen congelado	CARNEIRO, 2012
	38%	GALLI et al., 2014
	36%	GALLI & LAZZARI, 2001; LAZZARI et al., 2002; GALLI et al., 2002, 2000
	36%	CHOI et al., 2014
Taxa de desenvolvimento	36%	GALLI & LAZZARI, 2011
	30%	. LI et al., 2000b; 2001
Taxa de fertilização	50%	GRONDAHL et al., 1997

DELL'AQUILA et al. (1997) obtiveram taxas de sobrevivência após ICSI de 76,5% para oócitos compactos e de 91,3% para oócitos expandidos. GRONDAHL et al. (1997) o procedimento de ICSI, observando 94 (87%) de oócitos considerados viáveis. Os 14 (13%) oócitos que não sobreviveram à injeção tiveram o oolema rompido, colapsado durante a injeção ou o ócito fragmentado pouco depois. Os 10 oócitos com simulação de injeção (sem qualquer deposição de espermatozoides) sobreviveram à manipulação. CARNEIRO (2012) obteve taxa de clivagem pós-ICSI com sêmen fresco (72%) e congelado (55%), LI et al. (2000; 2001) utilizando oócitos microinjetados e cultivados em meio contendo ou não camadas de células do *cumulus*, obtiveram uma média de oócitos clivados de 61,6%.

GALLI et al. (2014) alcançaram melhorias nas condições da maturação *in vitro* do oócito e meios de cultura de embrião, permitindo altas taxas de desenvolvimento e maturação embrionária *in vitro* e embriões cultivados por ICSI, que variaram de 5 a 10% nos primeiros estudos para até 38% nos mais recentes. GALLI et al. (2014), LAZZARI et al. (2002) e GALLI et al. (2002, 2000) demonstraram claramente que o ambiente *in vivo* suporta o elevado desenvolvimento do blastocisto e aproximadamente 36% dos oócitos injetados, tanto em ovidutos de égua como de ovinos desenvolveram-se bem. CHOI et al. (2004) relataram a recuperação de blastocisto, após a injeção, com uma taxa de 36%, demonstrando que a ICSI pode resultar em eficiente produção de embriões, quando cultivados em ambiente ótimo. O cultivo *in vivo* apresenta um maior desenvolvimento de blastocisto, sendo aproximadamente de 36% dos oócitos injetados em ambos ovidutos de égua e ovelha (GALLI & LAZZARI, 2011). LI et al. (2000; 2001) relataram que co-cultivo de oócitos equinos com células do oviduto e células do cumulus pós-ICSI resultou em 30% de formação de blastocisto.

GRONDAHL et al. (1997) preocuparam-se com a taxa de fertilização, observando (formação de pró-núcleos 20 h pós-injeção) em seus estudos, dados relativamente altos de 50%, concluindo então que o oócito equino, após maturação *in vitro*, é capaz de exibir a ativação, até certo ponto, por injeção de espermatozoide.

Contrariamente aos autores citados, HINRICHS (2005) relatou ineficiência associada com o procedimento de ICSI, sendo necessário um longo tempo para a micro manipulação, injeção e retirada da micropipeta, além do risco de lise do oócito durante o processo de injeção e a redução na taxa de clivagem de embriões em comparação com a fertilização *in vivo* (DIAS GONÇALVES, et al., 2008).

4. CONCLUSÃO

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), recentemente, tornou-se eficiente o suficiente para ser considerada para uso clínico (HINRICHS

et al., 1995). As técnicas de reprodução assistidas, como a ICSI podem ser usadas no sentido de transpor algumas das barreiras envolvidas na MIV de oócitos equinos (GONÇALVES, et al., 2008).

A vantagem da ICSI em comparação com FIV é a capacidade de ampliar a escolha do garanhão a ser utilizado, incluindo aqueles portadores de baixa motilidade espermática e baixo desempenho reprodutivo *in vivo*. (GALLI, 2007). Esta técnica é particularmente interessante, uma vez que evita diversos passos do processo de fertilização, como a ligação à zona pelúcida, penetração na zona e a fusão da membrana, além disso, a técnica não exige a capacitação do esperma ou reação acrossomal. (DELL'AQUILA et al., 1997).

As baixas taxas de fertilização *in vitro* em equinos são devidas à interação espermatozoide/oócito anormal. A injeção intracitoplasmática de um único espermatozoide pode ser de valor não só para aumentar a taxa de fertilização e produção de embriões, quando comparada com a FIV, mas também como uma ferramenta útil à verificação das condições de maturação intracitoplasmática *in vitro*. Este procedimento pode também ser utilizado para produzir embriões, a fim de aumentar o potencial reprodutivo de éguas valiosas e raças equinas ameaçadas de extinção (DELL'AQUILLA et al., 1995).

É pouco provável que as éguas valiosas que morrem prematuramente estejam localizadas perto de laboratório apto para realizar a ICSI; assim, métodos para o transporte de ovários ou de oócitos devem ser investigados. Embarque por via aérea tem sido usado para obter os ovários para o laboratório dentro de cerca de 10 h post-mortem (CARNEVALE et al., 2003).

Mesmo com a adoção desta técnica, relativamente nova, é de suma importância o investimento em novas pesquisas. A busca de material para esta revisão foi dificultada pelo baixo arsenal de publicações sobre o assunto, além da maioria dos trabalhos serem internacionais e concentrados em poucos autores, o que nos propicia a oportunidade de estudos e investimentos nesta técnica no Brasil.

5. REFERÊNCIAS

- BLUE, B. J.; MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. JR.; MUSCARI, K. T. Capacitation of stallion spermatozoa and fertilization of equine oocytes *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, p. 111-116, 1989.
- CARNEIRO, G. F. Técnicas de Reprodução Assistida aplicadas a Equinos (Assisted Reproductive Techniques applied in Horses). **Ciência Animal** Fortaleza, CE, Brasil, v. 22, p. 308-324, 2012.
- CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; SQUIRES, E. L. Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanatized mares. **J Am Vet Med Assoc**, v. 36, p. 60–62, 2003.
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; LOVE, L. B.; VANER, D.D.; BRINSKO, S.; HINRICHS, K. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction** v.123, p. 455–465, 2002.
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S.; HINRICHS, K. Developmental *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, p. 455-65, 2002.
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; VANER, D. D.; HINRICHS, K. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze thaw cycles. **Theriogenology**, v.6, p.808–819. 2006a
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; VANER, D. D.; HINRICHS, K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 66, p.955–963, 2006b.
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; VARNER, B.; HINRICHS, K. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze thaw cycles, USA, **Theriogenology**, v. 65, p. 808-819, 2005
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze thaw cycles. **Theriogenology**, v 6, p.808–819, 2006.
- CHOI, Y. H.; LOVE, C.C.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; HINRICHS, K. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozenthawed sperm. **Reproduction**. v.23, p. 455–465, 2002.

- CHOI, Y. H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Reproduction** v. 127, p.187–194, 2004b.
- CHOI, Y. H.; ROASA, L. M.; LOVE, C. C.; VAMER, 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. **Biol Reprod.** v. 70, p. 1231–1238, 2004.
- DELL'AQUILA, M. E.; CHO, Y. S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G. M.; MARITATO, E. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1139-1156, 1997.
- FULKA, J. J.R.; OKOLSKI, A. Culture of horse oocytes *in vitro*. **J Reprod Fertil**, v. 61, p. 213-215, 1981.
- GALLI, C., COLLEONI, S., DUCHI, R. et al. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 39–55, 2007.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; TURINI, R.; DUCHI, G.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G., et al. Frozen-thawed embryos produced by ovum pickup of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. **Theriogenology**, v. 8, 2002.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. 40th Anniversary Special Issue. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology** cap. 81. p.138–151, 2014.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. ***In vitro* and *in vivo* culture in the sheep oviduct of equine embryos obtained by IVM and ICSI.** 5 ed. Loosdrecht, T. A. E. Stout and J. F. Wade, 2011.
- GONÇALVES, P. B. D. et al. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2 ED. Roca; 2008.
- GOTO, K.; KINOSHITA, A.; TAKUMA, Y.; OGAWA, K. Birth of calves tier the transfer of oocytes fertilized by sperm injection. **Theriogenology**, v. 35, p. 205-223, 1991.

- GRONDAHL, C.; HANSEN, T. H.; HOSSAINI, A.; HEIZE, I.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Intracytoplasmic Sperm Injection of In Vitro-Matured Equine Oocytes' **Biology of reproduction**. 57, p.1495-1501, 1997.
- HEAPE, W. On the artificial insemination of mares. **Veterinarian**, v.71, p. 202–212., 1898.
- HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. Department of Veterinary Physiology and Pharmacology, USA, **Theriogenology**, v. 64, p. 535–541, 2005.
- HINRICHS, K.; CHOI, Y.H.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D. Transfer of in vitro produced equine embryos, **Animal reproduction science**, v. 98, p. 38–39, 2005a.
- HINRICHS, K.; SCHIDT, A.L.; SELGRATH, J. P. Activation of horse oocytes. **Biol Reprod.**, v. 1, p. 319-324, 1995.
- HOSOI, Y.; MIYAKE, M.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa, **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v. 3, p. 331-338, 1998.
- IRITANI, A.; HOSOI, Y.; POLGE, C. In vitro fertilization by assisted microinjection head or dead sperm in domestic and non-domestic animals, Milano, **Elsevier Biolinur**, v. 47, p.197-202, 1995.
- KI MURA, Y.; YANAGIMACHI, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. **Biol Reprod.**, v. 52, p.709–720, 1995.
- KUROKAWA, M.; FISSORE, R. A. ICSI-generated zygotes exhibit altered calcium oscillations, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 down-regulation, and embryo development. **Mol Hum Reprod.**, v. 9, p.523–533, 2003.
- LAZZARI, G.; CROTTI, G.; TURINI, P.; DUCHI, R.; MARI, G.; ZAVAGLIA, G.; BARBACINI, S.; GALLI, C. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of *in vitro* matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. **Theriogenology**, v. 58, p. 709–712, 2002.
- LI, X.; MORRIS, L. A.; ALLEN, W. R. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection. **Reproduction & Fertility**, v. 119, p. 253-60, 2000.
- LI, X.; MORRIS, L. H.; 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.
- SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. *Veterinary Clinics of North America Equine Practice*, v12, p. 31-45, 1996.
- SQUIRES, E. L. Integration of future biotechnologies into the equine industry, **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, p.187–198, 2005.
- TREMOLEDA, J. L.; STOUT, T. A.; LAGUTINA, I.; Lazzari, G.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. **Biol. Reprod**, v.69, p.1895–1906, 2003.
- UEHARA, T.; YANAGIMACHI, R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. **Biol Reprod**, v. 15, p. 457-470, 1976.
- VARNER, D. D.; WARD, C. R.; STOREY, B. T.; KENNEY, R. M. Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. **Am. J. Vet.**, v. 48, p. 1383-1389, 1987.