# **ESTADO ATUAL E PERSPECTIVAS DA CLONAGEM EM EQUINOS - REVISÃO DA LITERATURA**

OLIVEIRA JÚNIOR, Paulo Roberto de¹\*; SILVA, Laysa Karolyni Resende e1; SOUZA, Renata Pontes de1; MONTEIRO, Caio Rodrigues2; CARMO, Fausto Moreira da Silva2

*¹Graduando em Medicina Veterinária, UNIPAC – Conselheiro Lafaiete, MG, ²Professor do curso de Medicina Veterinária, UNIPAC – Conselheiro Lafaiete, MG. \*E-mail:* *221-001373@aluno.unipac.br*

**RESUMO:** A clonagem de equinos evoluiu desde o primeiro êxito registrado em 2003. Contudo, ainda enfrenta desafios como a baixa eficiência na maturação in vitro de oócitos e a reduzida taxa de formação de blastocistos. A presente revisão bibliográfica teve como objetivo reunir informações atualizadas sobre a clonagem em equinos, abordando os avanços e os principais desafios dessa biotecnologia. A técnica base da clonagem equina é a transferência nuclear de células somáticas (TNCS), utilizando métodos como eletrofusão ou injeção direta, com protocolos de ativação artificial e cultivo *in vitro*. Apesar dos obstáculos técnicos e das elevadas perdas gestacionais iniciais, avanços têm levado à taxas de gestação mais animadoras, e os potros nascidos geralmente apresentam boa saúde, embora variações fenotípicas possam ocorrer devido ao DNA mitocondrial do oócito receptor. Conclui-se que a clonagem equina é uma ferramenta valiosa para a conservação genética, com potencial como modelo de pesquisa, mesmo diante de suas dificuldades de implementação.

**PALAVRAS-CHAVE:** clones, genética, transferência nuclear de células somáticas

**INTRODUÇÃO**

A clonagem de equinos, predominantemente realizada por meio da TNCS, é uma biotecnologia reprodutiva valiosa, voltada à multiplicação, conservação e recuperação do patrimônio genético de animais de destaque zootécnico. Essa técnica possibilita a reprodução de indivíduos de alto desempenho, a preservação de linhagens genéticas de animais inférteis ou falecidos, além de contribuir para pesquisas sobre relações materno-fetais (Fernandes, 2008; Cortez et al, 2019; Manica, 2021).

Apesar dos avanços, a técnica de clonagem equina ainda possui algumas limitações. Entre os principais entraves técnicos está a dificuldade em obter oócitos maturados *in vitro* com qualidade suficiente para serem usados como citoplastos receptores. A baixa eficiência da fertilização *in vitro* na espécie impulsionou a adoção da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide, utilizada tanto para testar a competência dos oócitos maturados quanto para gerar embriões destinados ao processo de clonagem (Chavatte-Palmer, 2004; Carneiro, 2016). Perante os desafios apresentados, o objetivo do presente estudo foi realizar uma revisão bibliográfica para reunir informações atualizadas sobre a clonagem em equinos, abordando os avanços e os principais desafios dessa biotecnologia.

**REVISÃO DE LITERATURA**

A clonagem em equinos, embora inicialmente tenha se desenvolvido de forma mais lenta em comparação com outras espécies, apresentou avanços notáveis ao longo das últimas duas décadas. Atualmente, essa biotecnologia é utilizada principalmente para a conservação de material genético de alto valor, abrangendo desde animais com características genéticas superiores até indivíduos inférteis, falecidos ou castrados precocemente. Empresas especializadas já atuam comercialmente na clonagem de equinos (Manica, 2021; Carneiro, 2016).
A base da técnica de clonagem é a TNCS, como os fibroblastos, as quais podem ser cultivadas e preservadas criogenicamente. Oócitos são coletados em fase de metáfase II e submetidos à enucleação, etapa na qual seu material genético é removido, transformando-os em citoplastos receptores. A célula doadora é então incorporada ao citoplasto por meio de eletrofusão ou injeção direta. Na primeira, a célula somática é fundida à membrana do citoplasto mediante a aplicação de pulsos elétricos de corrente contínua em um meio condutivo específico. A segunda abordagem consiste na injeção direta da célula doadora no citoplasma do oócito receptor com o uso de um instrumento chamado *piezo drill*. Em equinos, o uso dessa técnica foi descrito pela primeira vez no ano 2000 (Carneiro, 2016). A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), inicialmente voltada para a fertilização assistida, passou a ser empregada também como ferramenta para avaliar o potencial dos oócitos maturados e gerar embriões clonados (Fernandes, 2008; Carneiro, 2016).
Após a fusão da célula doadora com o citoplasto receptor, é necessária a ativação artificial do embrião reconstruído, simulando os estímulos fisiológicos da fertilização natural. Em equinos, diferentes protocolos de ativação têm sido avaliados, incluindo o uso de agentes químicos como ionomicina, que eleva os níveis de cálcio intracelular, desencadeando a ativação inicial do oócito, e 6-DMAP, que atua bloqueando a atividade de quinases, estabilizando o estado ativado do oócito e permitindo a continuidade do desenvolvimento embrionário. Assim, a ionomicina inicia o processo e o 6-DMAP garante sua manutenção. A fase de cultivo *in vitro* é crítica, já que as condições ambientais afetam diretamente o desenvolvimento embrionário até a formação do blastocisto (Chavatte-Palmer, 2004; Fernandes, 2008; Cortez et al, 2019).

Apesar do progresso, a técnica ainda enfrenta obstáculos técnicos importantes. Entre os principais desafios está a ineficiência da maturação *in vitro* dos oócitos equinos, o que limita a obtenção de citoplastos receptores de qualidade adequada para a transferência nuclear (Fernandes, 2008). Além disso, a escassez de abatedouros de equinos restringe o acesso a material biológico para pesquisa. As taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto por transferência nuclear permanecem modestas, oscilando entre 3% e 10%. Uma possível explicação para esse desempenho reduzido pode estar associada às baixas concentrações de cálcio intracelular nas células equinas, afetando o sucesso do cultivo embrionário *in vitro* (Ribeiro, 2008; Carneiro, 2016).
Nos primeiros estudos, os índices de sucesso gestacional com embriões clonados eram baixos, com 75 a 100% das gestações sendo perdidas (Gomes e Seneda, 2013), e taxas de fusão entre oócitos e células doadoras e taxas de clivagem menores que 15% (Carneiro, 2016). No entanto, o avanço e a aplicação de diversas biotecnologias reprodutivas e melhorias nos protocolos de transferência nuclear têm proporcionado taxas de gestação mais animadoras, com relatos de que mais de 50% dos embriões transferidos podem chegar ao nascimento. Um aspecto particularmente promissor da clonagem equina é o fato de que, apesar das elevadas perdas embrionárias e fetais durante o processo, os potros nascidos geralmente não manifestam os sérios problemas de saúde observados em clones de outras espécies - perdas embrionárias e fetais, abortamento e morte perinatal, anomalias, deficiências placentárias, rejeição imunológica e disfunções multissistêmicas - e, frequentemente, não necessitam de auxílio no momento do parto (Manica, 2021; Carneiro, 2016).
Clones não são cópias geneticamente idênticas dos animais originais, pois, apesar de compartilharem o DNA nuclear, recebem o DNA mitocondrial do oócito receptor, o que pode causar variações fenotípicas e comportamentais. No entanto, a capacidade reprodutiva, especialmente em machos, geralmente é mantida, já que o DNA mitocondrial não é transmitido à descendência. A clonagem é útil tanto na preservação de genética valiosa quanto como ferramenta em pesquisas sobre desenvolvimento embrionário e relações materno-fetais (Fernandes, 2008; Cortez et al, 2019).
As perspectivas para avanço do uso das técnicas de clonagem em equinos incluem a necessidade de aprofundar o entendimento dos mecanismos biológicos e técnicos envolvidos, melhorar a eficiência da produção de clones viáveis e aperfeiçoar técnicas como a maturação *in vitro* de oócitos e os protocolos de cultivo embrionário. O médico veterinário assume um papel essencial atuando tanto na pesquisa quanto na aplicação prática da técnica, realizando procedimentos como aspiração folicular, transferência de embriões, acompanhamento gestacional, manejo nutricional, sanitário e neonatal de clones e éguas receptoras (Fernandes, 2008; Manica, 2021).

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A clonagem de equinos desponta como uma ferramenta biotecnológica relevante para a conservação de genótipos valiosos, mesmo diante de limitações específicas da espécie, como a baixa eficiência na maturação in vitro de oócitos e na transferência nuclear. Apesar das perdas gestacionais ainda frequentes, os potros resultantes geralmente apresentam boa saúde, o que reforça o potencial da espécie como modelo em pesquisas sobre clonagem.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
CARNEIRO, G. F. Produção in vivo e in vitro de embriões em equinos / In vivo and in vitro production of equine embryos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p. 158-166, out./dez. 2016.
CHAVATTE-PALMER, P. et al. Health status of cloned cattle at different ages. *Cloning Stem Cells*, v. 6, p. 94–100, 2004.
CORTEZ, J. V., et al. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up-intracytoplasmic sperm injection program. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 31, p. 1894-1903, 2019.
FERNANDES, C. B. Contribuição para a clonagem em equinos por meio de transferência nuclear. Botucatu – SP, 2008. *Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”*.
GOMES, R. G.; SENEDA, M. M. Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 37, n. 4, p. 318-322, out./dez. 2013.
MANICA, B. Relatório de Estágio Curricular Obrigatório. *Relatório de Estágio (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS*, 2021.
RIBEIRO, B. I. et al. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Anim. Reprod. Sci*., v. 108, p. 171-179, 2008.