

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ERIKA SOUZA OLIVEIRA
GUSTAVO DIÓGENES CABRAL PESSOA

**FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS DE
TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS, GIFT E ICSI
APLICADOS À REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE
EQUINOS**

RECIFE/2022

ERIKA SOUZA OLIVEIRA
GUSTAVO DIÓGENES CABRAL PESSOA

**FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS DE
TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS, GIFT E ICSI
APLICADOS À REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE
EQUINOS**

Monografia apresentada ao Centro
Universitário Brasileiro – UNIBRA, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária

Professor Orientador: Prof Msc Daniel da
Silva Praia
Professora Coorientadora: M. V. Dayane
Costa Almeida Alexandre

RECIFE/2022

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

P475f Pessoa, Gustavo Diógenes Cabral
Fundamentos das técnicas de transferência de oócitos, gift e ICSI
aplicados à reprodução assistida de equinos / Gustavo Diógenes Cabral
Pessoa, Erika Souza Oliveira. - Recife: O Autor, 2022.

28 p.

Orientador(a): Me. Daniel da Silva Praia.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário
Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2022.

Inclui Referências.

1. Biotecnologias. 2. Equinocultura. 3. Transferência de embrião. I.
Oliveira, Erika Souza. II. Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA. III.
Título.

CDU: 619

Dedicamos este trabalho a
Deus, aos animais, às nossas
famílias e aos professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais, familiares e amigos que sempre acreditaram em mim e me apoiaram, em especial para Dra. Laís Lisboa, Dra. Bruna Camargo e Dr. Gustavo Pessoa.

Erika Souza Oliveira

Agradeço primeiramente a Deus; a minha família, em especial, aos meus pais, Ana Paula e João pessoa, por toda confiança, empenho, esforços e luta para que esse sonho se tornasse realidade. Sem vocês nada disso seria possível! Meus irmãos por todo carinho e admiração. Aos meus avós que sempre me incentivaram. A Erika Sousa de Oliveira por toda dedicação e incentivo na construção desse sonho. Ao professor orientador Dr. Daniel Praia por todo empenho, dedicação, paciência e ensinamento. A todos os professores da graduação. Aos mestres e doutores Eduardo do Vale Morais Melo e Eduardo Coutinho por ter me passado muito conhecimento teórico e prático e conselhos que vou levar para o resto da vida. A meus amigos Audi e Carlos que sempre me apoiaram em dias bons e dias ruins, amizades verdadeiras são poucas. A Maria Eduarda De Melo Cavalcanti, minha esposa que veio a falecer em 16/11/2019, que também fazia medicina veterinária comigo. No sétimo período, Deus a quis pertinho DELE e sei que, de onde estiver, ela vai estar torcendo por mim. Sou muito grato por tudo que fez por mim, enquanto estávamos juntos! A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na concretização desse sonho, o meu muito obrigado!

Gustavo Diógenes Cabral Pessoa

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. Porque somos curiosos...e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente.”

Walt Disney

FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA DE OÓCITOS, GIFT E ICSI APLICADOS À REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE EQUINOS

Erika Souza Oliveira
Gustavo Diógenes Cabral Pessoa
Daniel Praia¹

Resumo: A equinocultura vem adquirindo importância, ao longo dos anos, pelo seu valor econômico e social, conquistando criadores e simpatizantes. O Brasil apresenta o maior rebanho da América Latina e o quinto maior no mundo. Apesar dos grandes avanços no campo das biotecnologias reprodutivas, a infertilidade animal por baixas taxas de concepção e alta mortalidade embrionária precoce permanecem como principais desafios. Esta pesquisa tem como objetivo construir uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de reprodução assistida na espécie equina, a partir de pesquisas sobre as técnicas GIFT e ICSI e uma análise comparativa entre as mesmas. O referencial teórico contemplou discussões acerca das principais técnicas, desde a compreensão da fisiologia reprodutiva e coleta dos materiais biológicos (oócitos e espermatozoides) até a transferência de oócitos e uma análise comparativa entre as mesmas. Os procedimentos metodológicos adotados consistiram em revisão de literatura de um período de 15 anos, por envolver o início das técnicas em equinos. Os dados obtidos indicam que as técnicas são bastante utilizadas, sendo a ICSI a mais, por seus benefícios e taxas de sucesso. Com base nos resultados e discussões apresentadas, considera-se as técnicas utilizadas possuem vantagens e desvantagens, com possibilidades de uso de acordo com as situações, sendo a mais utilizada a ICSI.

Palavras-Chave: Biotecnologias. Equinocultura. Transferência de embrião.

¹ Professor orientador UNIBRA. Doutorando em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. E-mail:

FUNDAMENTALS OF OOCYTE TRANSFER TECHNIQUES, GIFT AND ICSI APPLIED TO ASSISTED REPRODUCTION OF EQUINE

Abstract: Over the years, horse breeding has grown in importance due to its economic and social value, winning over breeders and supporters. Brazil has the largest cattle herd in Latin America and the fifth largest in the world. Despite significant advances in reproductive biotechnology, animal infertility due to low conception rates and high early embryonic mortality remains a major challenge. The objective of this study was to carry out a literature review of the main technologies of assisted reproduction in horses through research on GIFT and ICSI technologies and a comparative analysis between them. The theoretical framework includes a discussion of the main techniques that range from the understanding of reproductive physiology and collection of biological materials (oocytes and spermatozoa) to the transfer of oocytes and comparative analysis between them. The methodological procedure employed included a 15-year literature review regarding the beginnings of equine technology. The data obtained show that these techniques are widely used, with ICSI being the most important for its benefits and success rate. Based on the results presented and on the discussion, it is considered that the techniques used each have their pros and cons, with the possibility of use depending on the situation, the most used being ICSI.

Keywords: Biotechnologies. Horse breeding. Embryo transfer.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 METODOLOGIA	12
3 DESENVOLVIMENTO	13
3.1 Histórico da biotécnicas da reprodução	13
3.2 Foliculogênese	14
3.3 Maturação Ovocitária e Ovulação	17
3.4 Fertilização e Clivagem.....	18
3.5 Coleta e obtenção de oócitos.....	19
3.6 Maturação in vitro de oócitos	19
3.7 Fertilização in vitro de oócitos	20
3.8 Transferência de óocitos	20
3.9 Seleção e manejo da égua doadora e receptora	20
3.10 Transferência intrafalopiana de gametas (GIFT).....	23
3.11 Injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI)	23
3.12 Análise comparativa entre técnicas.....	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A equinocultura vem adquirindo importância, ao longo dos anos, pelo seu valor econômico e social, conquistando criadores e simpatizantes. O Brasil apresenta o maior rebanho da América Latina e o quinto maior no mundo. Com essa nova realidade, a área ganhou bastante visibilidade e investimentos nos seus segmentos, estimulando pesquisas em nutrição, sanidade, reprodução, clínica e cirurgia, com foco no melhor manejo e bem estar na criação (PALHARES, GONZAGA, 2019).

As biotecnologias da reprodução envolvem técnicas com a principal finalidade de aumentar a eficiência reprodutiva em especial nos equinos, cujo desempenho é bastante avaliado. Dentro das biotécnicas, pode-se dividir em inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE), pois a fertilização *in vitro* de oócitos na espécie equina permite a divisão celular, mas não a fecundação e o desenvolvimento embrionário de forma eficiente (PIMENTEL, CARNEIRO, 2008).

Apesar dos grandes avanços no campo das biotecnologias reprodutivas, a infertilidade animal por baixas taxas de concepção e alta mortalidade embrionária precoce permanecem como principais desafios. A aplicabilidade das técnicas reprodutivas envolve um médico veterinário, com conhecimento anatômico e fisiológico, para ter garantias de aumento na produtividade nas propriedades (REGHIM, 2021).

Na espécie equina, a transferência de embriões tornou-se um procedimento amplo na indústria, onde a égua concebe um embrião e este é doado e transferido ao útero de outra égua (receptora). Essa técnica visa obter mais de um potro por égua doadora por ano, ou deseja-se obter potros, porém o tutor não quer que a mesma desenvolva a gestação por motivos como: competições, alto valor econômico e genético, potencial risco de vir a óbito durante a gestação ou parto, ou por outros problemas, como dano pélvico ou comportamento materno (SADURNÍ ROCA, SERRANO PEREZ, 2020).

A transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) clássica é caracterizada pela deposição do oócitos maduros e espermatozoides capacitados no oviduto. Já nos equinos, utiliza-se a GIFT modificada, onde transferem-se oócitos para o oviduto da receptora inseminada. Desta forma, permite a fecundação *in vivo*, com espermatozoides capacitados naturalmente (PIMENTEL, CARNEIRO, 2008).

A Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) envolve a injeção de espermatozoide dentro do oócito maturo, em metáfase II, que passam por um processo de desnudamento, por meio de micromanipulador em microscópio invertido. Aqueles oócitos que apresentarem o primeiro corpúsculo polar aparente serão utilizados. Quando o embrião *in vitro* estiver no estágio de blastocisto, o mesmo poderá ser transferido via transcervical para o útero da égua receptora (CARREÑO OROZCO, 2021).

A técnica ICSI tornou-se a mais viável quando se fala em fecundação *in vitro*

(FIV) de oócitos equinos, porém seus custos são elevados e necessita tanto de equipamentos próprios quanto de mão de obra especializada. Apesar dessa limitação, a técnica permitiu melhor compreensão do processo embrionário bem como da FIV na espécie, com protocolos cada vez mais acessíveis aos proprietários (PALHARES, GONZAGA, 2019).

O presente trabalho objetiva construir uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de reprodução assistida na espécie equina, focando em GIFT e ICSI, desde a compreensão da fisiologia reprodutiva e coleta dos materiais biológicos (oócitos e espermatozoides) até a transferência de oócitos e uma análise comparativa entre as mesmas.

2 METODOLOGIA

O procedimento técnico utilizado, para a construção do presente trabalho, foi a pesquisa bibliográfica por meio de consultas em livros de referência e bases eletrônicas de dados, como Google Acadêmico, Scientific Electronic Library online (SciELO), EBSCO host, e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS).

Como parâmetro de seleção dos documentos, foram utilizados os descritores: transferência de embrião em equinos; transferência de embrião por GIFT em equinos; transferência de embrião por ICSI em equinos; biotécnicas aplicadas em equinos; reprodução em equinos; fisiologia da reprodução; vantagens e desvantagens no uso de ICSI e GIFT em éguas.

O espaço temporal inicial foi dos últimos cinco anos (2018-2022), porém, pela maioria dos trabalhos serem compostos por trabalhos de conclusão de curso e a história da descoberta das biotecnologias ser maior, esse intervalo foi ampliado, sendo utilizado trabalhos de 2008 a 2022. Os idiomas utilizados foram inglês, espanhol e português.

3 DESENVOLVIMENTO

A equinocultura vem ganhando destaque, em diálogo íntimo com o crescimento da população e do consumo mundial, levando a avanços no campo das biotecnologias. Na Medicina Veterinária, seu uso requer conhecimento técnico, bem como conhecimento anatomofisiológico da espécie que pretende atuar. Do ponto de vista reprodutivo, os avanços biotecnológicos trouxeram técnicas que aumentaram significativamente as taxas de prenhez, como a inseminação artificial, a sexagem de sêmen, a transferência (de oócitos e de embriões), a criopreservação de embriões e a produção *in vitro* de embriões. Esses avanços trouxeram benefícios como a manutenção de égua de alto valor zootécnico, o comércio de seus embriões (doadoras), sem interrupção de suas atividades esportivas, assim como o “aproveitamento” de éguas inférteis ou de baixo valor genético (receptoras) para gerar e cuidar dos filhotes a partir do nascimento (REGHIM, 2021).

3.1 Histórico da biotécnicas da reprodução

O desenvolvimento das biotécnicas para fins reprodutivos iniciou-se na Escola de Agricultura de Cambridge (Inglaterra), por volta do século 19. Os estudos geraram quatro gerações:

“(1) a inseminação artificial (IA), a congelação de gametas e embriões, (2) a múltipla ovulação e a transferência de embriões (MOET) (produção *in vivo* de embriões); (3) a produção *in vitro* (PIV) de embriões. [...] A quarta geração abrange processos menos eficientes e ainda, pode-se considerar, experimentais, que compreendem a clonagem por transferência nuclear (TN), a engenharia genética, incluindo a transgenia, a edição genômica e a biologia das células-tronco.” (RODRIGUES, BERTOLINI, 2018).

O uso da transferência de embriões (TE) teve seu início em meados de 1891, com sucesso em coelhos, pela Universidade de Cambridge (Inglaterra). A partir daí, outras espécies passaram a se beneficiar da técnica. Nos equinos, o sucesso foi na Inglaterra, em 1972, por uma técnica cirúrgica, enquanto os pesquisadores Oguri e Tsutsumi conseguiram fazer a colheita, mas sem concepção confirmada. Em 1974, Oguri e Tsutsumi transferiram os embriões pelo método não cirúrgico transcervical e conseguiram uma taxa de sucesso de 40% para concepções (CARNEIRO, 2016).

No Brasil, seu uso foi descrito apenas em 1987, após autorização de uso pela Associação Brasileira do Cavalos Mangalarga Marchador, pelo médico veterinário João Junqueira Fleury, que obteve sucesso tanto por método cirúrgico, quanto pelo não cirúrgico (CARNEIRO, 2016; REGHIM, 2021).

A transferência de oócitos (TO) foi desenvolvida para fins de uso clínico e de pesquisa em éguas inférteis, onde o primeiro relato de sucesso foi obtido por Carnevale e Ginther em 1995. A transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) foi realizada por Carnevale e colaboradores em 2000, depositando o sêmen e o oócito no oviduto da fêmea receptora, de forma simultânea. A fertilização *in vitro* (FIV) não foi bem sucedida na espécie equina, acreditando-se que isso se deve a fatores de

maturação do espermatozoide. Dessa forma, faz-se uso do GIFT e da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). Nesta última, os sucessos documentados, de ICSI em oócitos maturados *in vitro*, foram documentados por vários pesquisadores, desde 1996, por Squire e colaboradores. Desde então, estuda-se as taxas de sucesso para tipos de amostras de sêmen (fresco, resfriado e congelado), bem como sua clivagem (CARNEIRO, 2016).

3.2 Foliculogênese

Por definição, o ciclo estral é o intervalo entre duas ovulações, de forma consecutiva, com duração média entre 21 e 24 dias. O ciclo estral das éguas é do tipo poliétrico sazonal, ou seja, quando há estro em estações reprodutivas, cuja época apresenta fotoperíodo positivo (primavera e verão). Assim, com uma maior incidência solar, ocorrem ciclos ovulatórios sucessivos dentro do período médio, sendo considerados animais reprodutores de “dias longos” (BETTENCOURT et al, 2018).

De acordo com as fases estrais, em equinos não existem proestro e metaestro bem delimitados, fazendo com que se admita apenas as fases de diestro e estro. No diestro, ou fase lútea, pode-se identificar o corpo lúteo (CL), que produzem a progesterona pós-ovulação (entre 5 e 6 dias), onde a fêmea não aceita o macho e o trato reprodutivo está se preparando para uma futura prenhez. Já na fase estral, ou folicular, nota-se a presença de um folículo dominante no ovário, com elevados níveis de estrógeno sendo liberado. A fêmea, nesse momento, apresenta interesse pelo garanhão, edema uterino e preparação do trato reprodutivo para a cópula (MACIEL, 2020).

Do ponto de vista hormonal, a GnRH (fator de liberação de gonadotrofinas) é liberada pelo hipotálamo, por pulsos, que estimulam a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), pela adenohipófise na corrente sanguínea, onde os níveis de FSH se elevam duas vezes (figura 1). Em éguas, existem dois tipos de ondas foliculares, as ondas maiores (presença de um folículo dominante e outros subordinados) e as ondas menores (o maior folículo gerado não atinge o diâmetro de um folículo dominante), variando entre as raças. Como exemplo, os Quarto de Milha costumam apresentar uma única onda folicular principal, no final do diestro, que culminará com o estro e a ovulação. Já os Puro Sangue Inglês apresentam uma onda secundária no início do diestro, onde o folículo dominante pode ou não ovular (REGHIM, 2021).

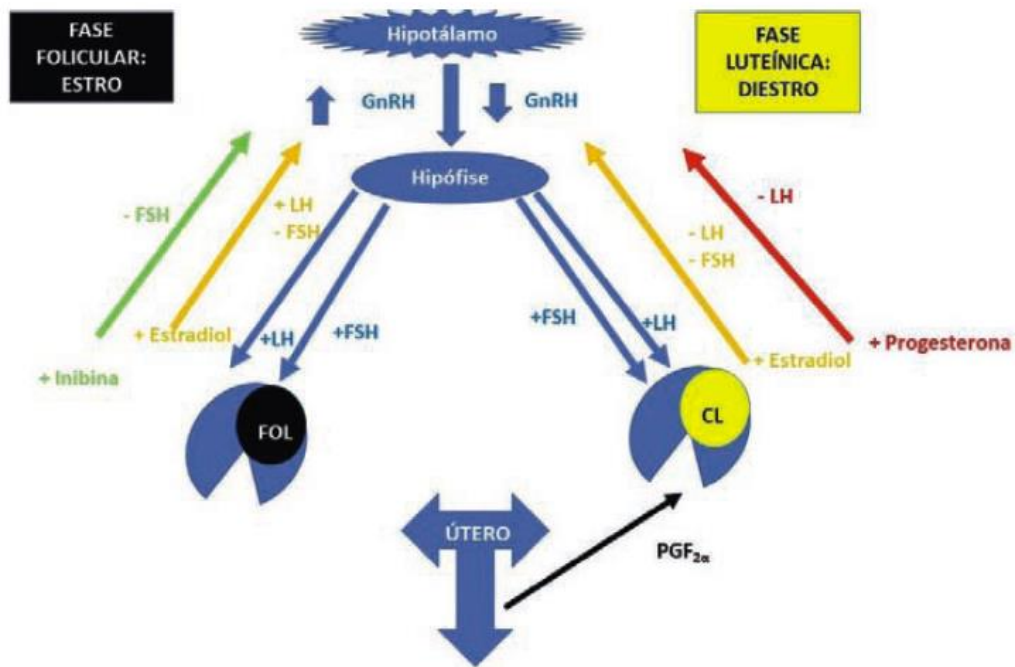


Figura 1. Regulação hormonal do ciclo estral (BETTENCOURT et al, 2018).

Os níveis de FSH começam a diminuir pela ação da inibina e do estradiol, que são secretados pelas células da granulosa dos folículos. O estradiol inibe a secreção de GnRH (hipotálamo), reduzindo a secreção de FSH, enquanto a inibina bloqueia o FSH. Ou seja, os folículos maiores tenderão a secretar maiores níveis de inibina e estradiol, realizando o feedback negativo para FSH, resultando em atresia de folículos menores dependentes do FSH para seu crescimento. Já os folículos grandes precisarão mais de LH, que eleva seus níveis a partir do estradiol do folículo dominante. Nesse momento a liberação de GnRH estimula mais ainda a liberação de LH para maturar o folículo e o oócito, finalizando com a ovulação. Vale salientar que o pico de LH é atingido 24 horas após a ovulação, diminuindo gradativamente no decorrer dos dias (MACIEL, 2020; REGHIM, 2021).

Com o aumento dos níveis de progesterona e de LH, o nível de estradiol faz um feedback positivo, levando a um pico de LH e posterior ovulação. Caso não ocorra a fecundação, por falhas na concepção ou na sinalização do conceito, o organismo inicia o processo de luteólise, onde o endométrio produz e libera prostaglandinas alfa (PGF_{2α}) para involuir o corpo lúteo, enquanto ocorre o aumento dos níveis de FSH da onda folicular subsequente (MACIEL, 2020).

Os oócitos e sua produção iniciam pela formação das células germinativas primordiais (CGPs), que migraram para as futuras gônadas, colonizando-as. Esse processo, do ponto de vista embriológico, dura entre o dia 50 e o dia 150-160 de gestação, cuja origem celular vem do mesoderma extraembrionário. Já os processos migratório e proliferativo vêm do endoderma do saco vitelino (CARNEIRO, 2018b).

Os oócitos primários, rodeados pelas células da granulosa, são desenvolvidos a partir de diferenciação das oogônias (em prófase I) por meiose, que retomaram suas divisões durante a ovulação (puberdade). Esse retorno se deve

ao estímulo do LH, que matura o núcleo do oócito e leva ao estágio de metáfase II (oócito secundário) pouco antes do processo ovulatórios. Uma particularidade dos equinos é a mudança estrutural da zona pelúcida (ZP), com formação de glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3) e posterior enrijecimento (CARNEIRO, 2018b).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, composto por oócito e células somáticas (granulosa e tecais), com funções endócrina e exócrina, permitindo a viabilidade do oócito até sua maturação e o processo de ovulação em si. Os folículos primordiais (prófase I) ficam latentes até a puberdade, quando sofrem ações hormonais (gonadotrofinas pituitárias e esteroides ovarianos), passando para folículos primários e secundários (FIGUEIREDO et al, 2008).

Sua classificação é dividida em folículos pré-antrais (ou não cavitários) e antrais (ou cavitários). Na fase pré-antral, ocorre a ativação do folículo primordial (fig. 2-A), que segue para o folículo primário (fig. 2-B), com células da granulosa em formato cuboide. No folículo secundário (fig. 2-C), nota-se a presença de novas camadas celulares, que evolui gradativamente para o folículo antral (fig. 2-D), com presença de um antro, ZP, diferenciação das células da teca (membrana basal) e da granulosa (cumulus) e uma parede celular em torno do oócito com retorno do processo meiótico (FIGUEIREDO et al, 2008; CARNEIRO, 2018b; MARCIEL, 2022).

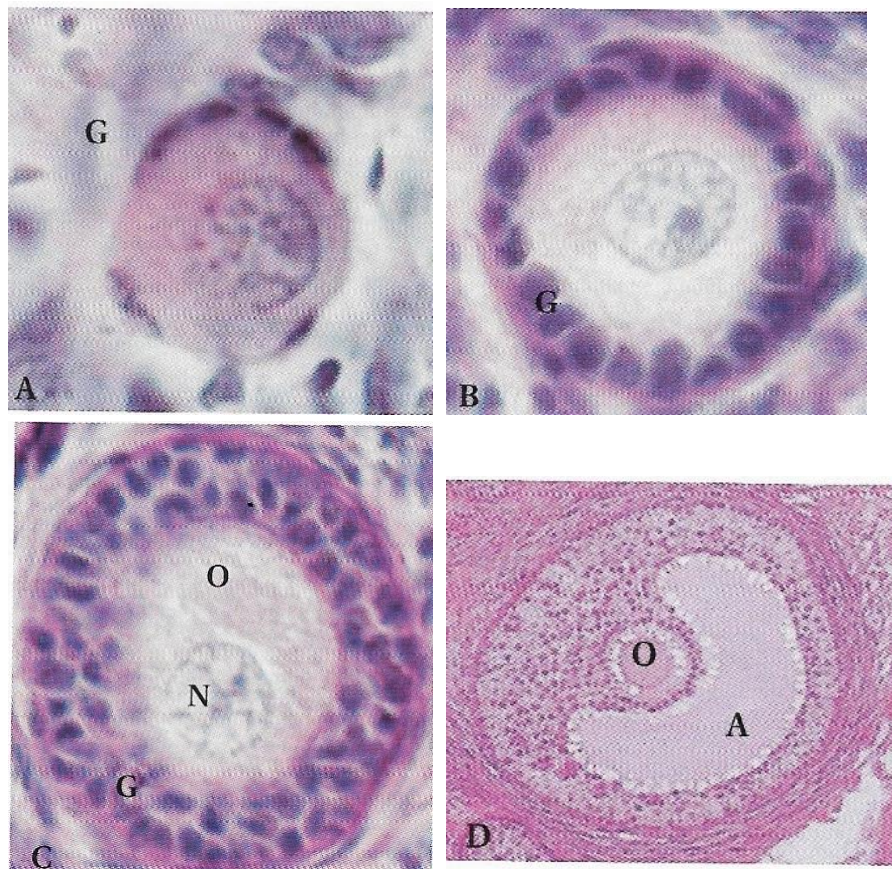


Figura 2. Fases do desenvolvimento folicular da espécie bovina: folículo primordial (A), folículo primário (B), folículo secundário (C) e folículo terciário (C). A=antro; G=células da granulosa; N=núcleo; O=oócito. (FIGUEIREDO et al, 2008).

3.3 Maturação Ovocitária e Ovulação

A maturação do oócito está diretamente relacionada à capacidade do mesmo em retornar a meiose e clivagem, ser fertilizado, com sobrevivência embrionária, manutenção da prenhez gerando um embrião viável e um filhote saudável. Assim como o sucesso da biotécnicas está relacionado à capacitação do oócito. Tais habilidades envolvem a configuração da cromatina na vesícula germinativa, à morfologia do *cumulus oophorus*, à viabilidade e ao tamanho do folículo, assim como maturação do núcleo e do citoplasma de forma simultânea. Infelizmente, ainda não foram determinados métodos de avaliação da maturação (citoplasmática, molecular e epigenética), restando a fecundação e o desenvolvimento do embrião (*in vivo* ou *in vitro*) (MACIEL, 2020).

Em equinos, a maturação do oócito está relacionada a presença de *cumulus* expandido, em comparação aos de *cumulus* compacto, com taxas de sucesso de 60% e de 51%, respectivamente. Acredita-se que se deve à velocidade de desenvolvimento (24 horas e 36 horas, respectivamente), assim como às características do local de desenvolvimento (folículos de até 20 mm apresentam *cumulus* compacto e reduzida retomada à meiose). Agora, do ponto de vista da fertilização *in vitro* (FIV), tanto os oócitos com *cumulus* expandido quanto compacto, ambos apresentaram a mesma habilidade de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto (MACIEL, 2020).

Do ponto de vista prático, a avaliação do corpo lúteo auxilia na identificação aproximada do dia da ovulação e o grau de funcionalidade do mesmo, para determinar a fase de estro da égua.

Sabe-se que o CL apresenta variações morfofuncionais dentro de um ciclo estral, o que leva à necessidade de acompanhamento da fêmea para diferenciação de um CL normal ou um folículo hemorrágico. A principal diferença entre as duas situações está na avaliação do sangue presente na cavidade do CL (figura 3), onde, em caso de normalidade, o sangue coagula rápido (12-20) com presença de fibrina, enquanto no folículo hemorrágico, o sangue não coagula antes de 48h, por apresentar substâncias anticoagulantes semelhantes à heparina. Outro aspecto é o tamanho, onde os folículos hemorrágicos são maiores que o folículo pré-ovulatório. O terceiro caso é o CL sólido, sem a cavidade central (CUERVO-ARANGO, 2018).

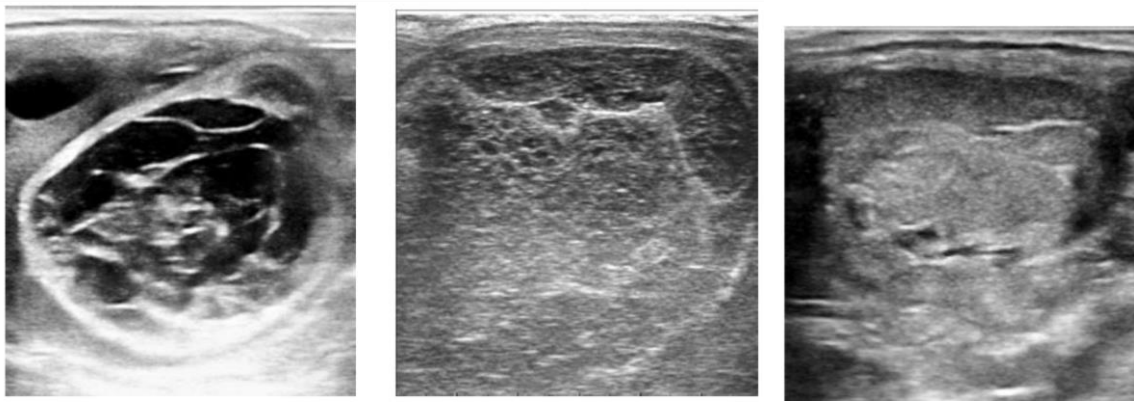


Figura 3. CL normal de 72h de idade, com hemorragia pós ovulatória (esquerda); folículo hemorrágico patológico 72h após início da hemorragia folicular (centro); CL sólido (direita) (CUERVO-ARANGO, 2018).

O uso de ultrassonografia, de modo Doppler, auxilia na avaliação, tanto morfológico quanto funcional, pois, a partir desses determinantes, o profissional poderá avaliar a necessidade de uso de PGF2alfa ou progesterona. No caso de égua prenha, a manutenção de progestágenos, com avaliação do sinal Doppler, permite visualizar o grau de funcionalidade e se precisa manter ou suspender o tratamento, comum em éguas receptoras em transição (mesmo prenhas, podem produzir ovulações e CL primários e secundários) (CUERVO-ARANGO, 2018).

3.4 Fertilização e Clivagem

O desenvolvimento do embrião inicia a partir da fertilização do oócito pelo espermatozoide, com formação do zigoto (figura 4), onde este último passa por divisões celulares (clivagens), diferenciando-se de acordo com o estágio embrionário e aumentando seu número celular (blastômeros) (REGHIM, 2018).

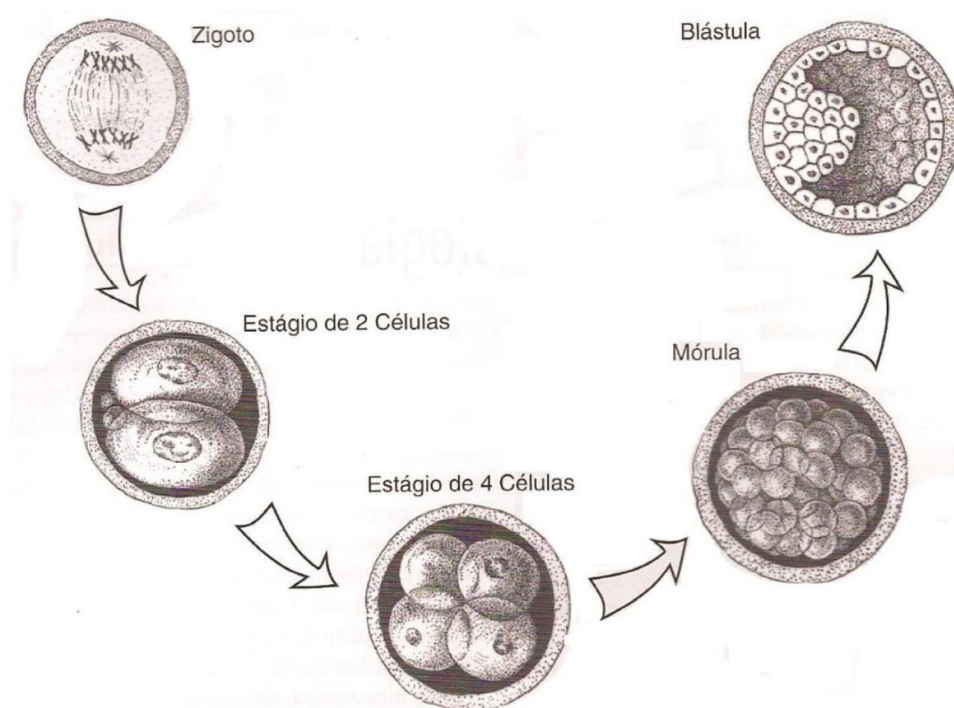


Figura 4. Clivagens (FRANDSON, WILKE, FAILS, 2014, APUD REGHIM, 2018).

O primeiro aglomerado celular é chamado de mórula, que continua seu desenvolvimento enquanto segue em direção do útero. Quando se forma uma cavidade central (blastocelo), com nova organização celular, o embrião recebe o nome de blástula (figura 4). A blástula é uma camada de células (trofoblasto) que envolve a blastocelo, onde um local interno vai se desenvolver em uma massa celular, chegando a se tornar o corpo do embrião. O trofoblasto dará origem a tecidos extraembrionários, como a placenta, enquanto o epiblasto será o embrião. Já a cavidade dorsal do epiblasto resultará na cavidade amniótica. O epiblasto se dividirá em ectoderma e endoderma, desenvolvendo os tecidos básicos do animal, seguindo para a gastrulação (REGHIM, 2018).

Para fins reprodutivos, o lavado uterino deverá ser feito entre os dias 6 e 8 após a ovulação, visto que o embrião se direciona até o útero entre os dias 5 e 6 após a ovulação. Sugere-se que esse lavado seja no 8º dia, pois o tamanho do embrião permite seu manuseio sem maiores riscos de perda (REGHIM, 2018).

3.5 Coleta e obtenção de oócitos

A coleta dos oócitos é por uma técnica chamada de aspiração folicular (*ocum pick-up*), sendo considerada não invasiva, pois aspira os folículos pre-ovulatórios ou imaturos das doadoras, para serem induzidas à maturação *in vivo*. Existem casos de coletar os oócitos em éguas sacrificadas em matadouros e na superovulação de doadoras (por estímulos hormonais), porém ocorrem fatores sobre a variabilidade do tempo da coleta até o laboratório e o insucesso da superovulação, do ponto de vista comercial (MARQUES, 2022).

3.6 Maturação in vitro de oócitos

A maturação nuclear e citoplasmática é fundamental para o processo de fertilização, indo da meiose até o estágio de metáfase II. Os protocolos para a maturação de oócitos equinos envolvem o uso de LH, FSH e estradiol, por serem os mesmos hormônios envolvidos no processo *in vivo*. Alguns casos, pode-se adicionar células somáticas, como fator de melhoria das taxas de meiose até a metáfase II. Após o período de 30 horas de incubação (39°C e 5% de CO₂), os oócitos são reclassificados em imaturos (na metáfase I ou vesícula germinal), maduros (metáfase II) ou degenerados. Deve-se atentar para os oócitos que apresentarem o primeiro corpúsculo polar aparente, para ser utilizada na técnica de ICSI (MARQUES, p. 2022).

Quando os oócitos são coletados dos ovários, as células do cumulus estão intactas (compactas ou expandidas). Entretanto, na espécie equina, os oócitos com *cumulus* expandido apresentam uma taxa de maturação bastante elevada quando comparado com *cumulus* compacto. Existe uma teoria de que oócitos compactos advêm de folículos pequenos, pois percebeu-se que a competência em realizar a

meiose está presente em folículos com tamanho acima de 20 mm de diâmetro (CARNEIRO, 2016).

Durante a maturação nuclear e citoplasmática, onde o gameta estará pronto para realizar a fertilização e clivagens celulares, os oócitos iniciam modificações estruturais e biológicas para permitir a fertilização, como a redistribuição das organelas celulares (grânulos corticais, mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático). Tais modificações permitem a penetração e a descondensação do material genético do espermatozoide, a formação de pró-núcleos e o desenvolvimento embrionário, cuja avaliação da maturação se dá pela coloração da cromatina. Em equinos, existe a ausência de maiores estudos, especialmente com FIV, porém, iniciou-se um estudo sobre a clivagem partenogenética para verificar o padrão de distribuição dos grânulos corticais durante o processo de maturação, demonstrando que esse processo a nível celular ocorre normalmente (CARNEIRO, 2016).

3.7 Fertilização in vitro de oócitos

A fertilização in vitro, para a espécie equina, não apresenta sucesso satisfatório, onde até o momento dois embriões foram bem sucedidos, cujos oócitos foram coletados de folículos pré-ovulatórios. Outro fator é a presença de poucas unidades de abatedouro de equinos, levando à variação de tempo de coleta dos ovários e dos oócitos viáveis (CARNEIRO, 2016).

3.8 Transferência de óocitos

A transferência de oócitos é definida como o depósito de oócitos maduros, no oviduto da receptora, onde está foi previamente inseminada, para capacitar os espermatozoides *in vivo*. Desta forma, a fertilização, o desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, do feto ocorrerão no interior da receptora. O foco dessa técnica de reprodução assistida é elevar a taxa de prenhez em éguas consideradas inférteis. A receptora pode ser cíclica ou não, pois estudos de Carnevale et al (2005) apontam mesma taxa para ambos os casos (CARNEIRO, 2016).

3.9 Seleção e manejo da égua doadora e receptora

Com objetivo de obter um maior número de descendentes, de reprodutores com alto valor zootécnica, a transferência de embriões possibilita a obtenção de filhotes sem alterar a vida esportiva da égua doadora, possibilita melhor qualidade de vida para éguas em idade avançada e/ou com alterações anatômicas uterinas.

As doadoras de embriões são selecionadas a partir de características desejáveis, como morfologia, desempenho funcional, aptidão reprodutiva e raça de interesse. Isso é bastante útil quando se obtém filhotes com comprovado valor de

mercado, pelo seu desempenho funcional, a partir de doadoras cada vez mais velhas. Já nas doadoras jovens, se faz crucial unir manejo reprodutivo e o treinamento (MALSCHITZKY, 2018).

Associado a isso, é importante observar a idade, o estado de saúde, o histórico reprodutivo e suas condições. A seleção leva em conta os sinais de estro e o exame físico na genitália, como vulva, vestibulo vaginal e cervical. Éguas de alto valor genético, que leve a filhotes com potencial zootécnico desejado, são também selecionadas, justificando exames prévios sobre sua resposta fisiológica aos procedimentos necessários para realizar a TE (CARREÑO OROZCO, 2021).

Doadoras de alto valor zootécnico recebem melhores condições ambientais, como alojamento e alimentação, pois influenciam no ciclo estral e no desenvolvimento de folículos não ovulatórios. Isso vale para éguas para esporte, onde os treinamentos reduzem os níveis de LH, aumentam os níveis de cortisol e ampliam os intervalos entre as ovulações, o que leva a um menor número de embriões recuperados (MALSCHITZKY, 2018).

Em estudos de Ball e colaboradores, de 1993, descritos por Malschitzky (2018), as taxas de fecundação independem da idade da doadora, porém embriões coletados com quatro dias dessas fêmeas revelou uma perda gestacional elevada, comparada às éguas mais jovens ou que nunca gestaram, mesmo com uso da TE. Isso sugere que é importante ter condições uterinas prévias que influenciam na condução da gestação.

Quando se realiza o procedimento reprodutivo em campo, deve-se observar tanto a doadora quanto a receptora, com ultrassom transretal de forma frequente para determinar os dias de interesse dentro do ciclo estral, como ovulação e o uso de medicamentos e hormônios exógenos para manipulação do ciclo estral. É necessário o conhecimento sobre os elementos hormonais e suas aplicações, desde estrógenos (para sincronização do cio), progestágenos (manutenção da gestação), até oxitocina (contrações e limpeza uterina) e prostaglandinas (regresso natural do CL) (CARREÑO OROZCO, 2021).

A seleção e o manejo das receptoras são fatores de impacto no sucesso da TE, visando a eficiência com menor custo. Para tanto, a seleção envolve características desejáveis presentes no aparato reprodutivo, associado à ausência de parasitas, boas condições nutricionais, ótimo estado de saúde e idade jovem, entre 3 e 12 anos, que já tenha parido (pelo menos um filhote). Para a TE, as características uterinas e os níveis hormonais devem estar próximos aos da doadora, isso influencia a taxa de sucesso gestacional, visto que, a ovulação da receptora pode ocorrer um dia antes e até três dias depois, quando comparada à doadora (CARNEIRO, 2018a; CARREÑO OROZCO, 2021).

Carneiro (2018a) lista e detalha os critérios considerados básicos para seleção de receptoras, baseado nas características locais e no Brasil, como “temperamento, idade, habilidade materna, ciclo estral normal e ausência de problemas reprodutivos.

O temperamento interfere na capacidade de manejo, daí sugere-se evitar introdução de novas receptoras ao plantel, bem como éguas mansas bem adaptadas ao manejo e ao local. Os equinos criam hierarquias, o que dificulta a reorganização, quebrando a rotina e elevando os níveis de estresse. Deve-se identificar e descartar éguas de temperamento agressivo (com outras fêmeas e filhotes), incorrendo em riscos de segurança, bem como liberação de prostaglandinas, diminuindo nas taxas de prenhez (LOPES, 2015).

A idade da receptora, como citado anteriormente, é outro fator para o sucesso da gestação, pois o avanço da idade leva à degeneração endometrial, comprometendo a manutenção gestacional. Sugere-se animais entre 3 e 10 anos, pois, acima de 10, notam-se alterações degenerativas endometriais (endometrites, endometrioses, alterações vasculares), impossibilitando o aporte hormonal e a drenagem linfática de forma eficiente. A posição do útero se projeta para a cavidade abdominal, dificultando a drenagem dos líquidos uterinos, assim como altera-se a conformação da genitália interna e externa. Apesar de éguas jovens (3-4 anos) apresentarem boas taxas de prenhez, muitas vezes não possuem a habilidade materna, acarretando em problemas durante o parto e nos cuidados ao neonato (LOPES, 2015; CARNEIRO, 2018a).

As características reprodutivas desejáveis envolvem uma cérvix íntegra, com tamanho e tônus dentro da normalidade, com ausência de anormalidades reprodutivas (como fluidos uterino, cistos uterinos, tumores e presença de debris uterinos). Quando deseja-se adquirir novas receptoras, deve-se realizar exame reprodutivo completo, com exame de competência cervical, aspecto e integridade dos genitais externos, exames laboratoriais (citologia e biópsia), palpação e ultrassonografia. Sugere-se que as éguas devem ser examinadas no dia 5 pós ovulação, atentando-se para a similaridade cíclicas entre doadora e receptora, bem como ao fotoperíodo (caso precise utilizar de forma artificial) (LOPES, 2015; CARNEIRO, 2018a; CARREÑO OROZCO, 2021).

O ambiente da tuba uterina é fundamental para um bom desenvolvimento do embrião, por produzir e secretar substâncias nutritivas para o embrião durante seu trânsito para o útero. Em contrapartida, deve-se atentar ao excesso de prostaglandinas, diretamente relacionada à manipulação do colo uterino, bem como os níveis de estrógenos, que leva ao aparecimento do maior número de receptores para progesterona e controla a secreção do oviduto. A tolerância imunológica, em relação ao embrião e à placenta, envolve controle hormonal tanto da mãe quanto do embrião, como os esteroides sexuais, estrógeno e prostaglandina embrionária (MALSCHITZKY, 2018).

Para o sucesso das taxas de prenhez, se faz necessário observar todos os fatores relevantes que envolvam a doadora, a receptora e o desenvolvimento fetal. A sincronia entre embrião e útero é fundamental, pois em desacordo, o embrião poderá receber hormônios e fatores de crescimento discrepantes, afetando tanto o estabelecimento com o desenvolvimento da gestação. O uso de ultrassonografia

Doppler é um fator interessante na avaliação das condições uterinas (antes da TE) e na detecção gestacional (após TE), como no caso da avaliação morfoecogênica do útero, o aspecto tubular e a homogeneidade. Alguns sinais de impossibilidade de realizar a TE são a cérvix fechada e firme, o tônus uterino elevado, a detecção de dobras endometriais ou secreções uterinas (CARNEIRO, 2018a).

3.10 Transferência intrafalopiana de gametas (GIFT)

A transferência intrafalopiana de gametas é uma técnica onde se transferem os espermatozoides e o oócitos maduros diretamente no oviduto da égua receptora. Por depositar os espermatozoides próximo ao local de fecundação, esta técnica tem alto potencial em situações onde existe um número baixo de espermatozoides, como nos casos de garanhões subférteis, sêmen congelado e sêmen sexado (SARDUNÍ ROCA, SERRANO PEREZ, 2020).

Carneiro (2016) acrescentam que a deposição é de forma cirúrgica, onde os espermatozoides são capacitados no próprio oviduto da receptora, acrescido do oócito maturo. A primeira técnica GIFT, realizada por Carnevale et al (2000, *apud* CARNEIRO, 2016), depositava tanto o sêmen quanto o oócito no oviduto.

Couto e Valle (2013) afirmam que o processo técnico na realização da GIFT é a mesma da transferência de oócitos, cuja diferença se encontra na inserção dos espermatozoides no mesmo meio de cultura dos oócitos, cinco minutos antes da transferência, depois alocados em pipeta para introdução no infundíbulo tubário e deposição na ampola.

Nesta técnica, existem problemas relacionados à maturação do oócito *in vitro* e *in vivo*, o que leva a melhores resultados quando utilizados folículos pré-ovulatórios. A vantagem da técnica, em comparação a outras, é que a fecundação ocorre em ambiente mais adequado, porém, pela popularização da técnica de ICSI, a técnica GIFT tornou-se menos selecionada (SARDUNÍ ROCA, SERRANO PEREZ, 2020). Outro fator é na existência de poucos espermatozoides móveis (2 a 5×10^6), com taxa de desenvolvimento embrionário entre 27% e 82%. Salienta-se que a taxa de sucesso está diretamente relacionada com o sêmen utilizado, onde sêmens congelados ou resfriados apresentam menor valor quando comparado ao sêmen fresco (CARNEIRO, 2016).

3.11 Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) no oócito é uma técnica de FIV, onde o esperma é injetado no interior o oócito em metáfase II, envolvendo a penetração através da ZP e membrana citoplasmática, a aspiração da membrana para provocar sua ruptura e a injeção do espermatozoide no citoplasma, por meio de uma micropipeta biselada (PEÑA et al, 2019).

Em equinos, a ICSI convencional não é aplicada, pois provavelmente o nível

de maturação inadequada do espermatozoide dificulta a sua penetração pela ZP *in vitro*, diferente de uma fertilização *in vivo*, onde o oviduto e as secreções da fêmea regulam a interação entre os gametas. Para tanto, notou-se que a FIV de oócitos maduros não tem sucesso, quando comparados a oócitos maduros *in vitro* e transferidos à égua receptora previamente inseminada, com taxas de sucesso próximos às de ovulações espontâneas. Desta forma, sugere-se que a capacitação espermática necessita de alguns fatores presentes no oviduto para que penetrem a ZP e, conseqüentemente, atinjam o oócito (SADURNI ROCA, SERRANO PEREZ, 2020).

Em laboratório, os oócitos são incubados para iniciarem e completarem sua maturação, atentando-se aos aditivos, pH, osmolaridade e condições de cultivo. Sua maturação ocorre de 24 a 28 horas após ser desnudado o *cumulus* e os oócitos que apresentarem corpo polar são os escolhidos. O sêmen congelado pode ser utilizado, de acordo com sua avaliação espermática após o descongelamento, como a motilidade, sendo preparados por lavado direto, gradiente de densidade ou centrifugação (SALGADO et al, 2018).

A ICSI ocorre em um microscópio invertido, com micromanipulação (fig. 5), podendo ser com pipeta convencional ou com pipeta piezoelétrica. Não houve diferença significativa entre as taxas de blastocisto, porém a taxa de núcleo fragmentado foi maior no uso de pipeta piezoelétrica (fig. 6). A motilidade espermática ocorre em solução polivinilpirrolidona (de 7% a 10%), com morfologia normal. A membrana plasmática rompe com a manipulação da pipeta de injeção, sendo introduzidos no oócito (SALGADO et al, 2018).



Figura 5. Injeção intracitoplasmática, na espécie equina, da Universidade do Estado do Colorado (SADURNI ROCA, SERRANO PEREZ, 2020).

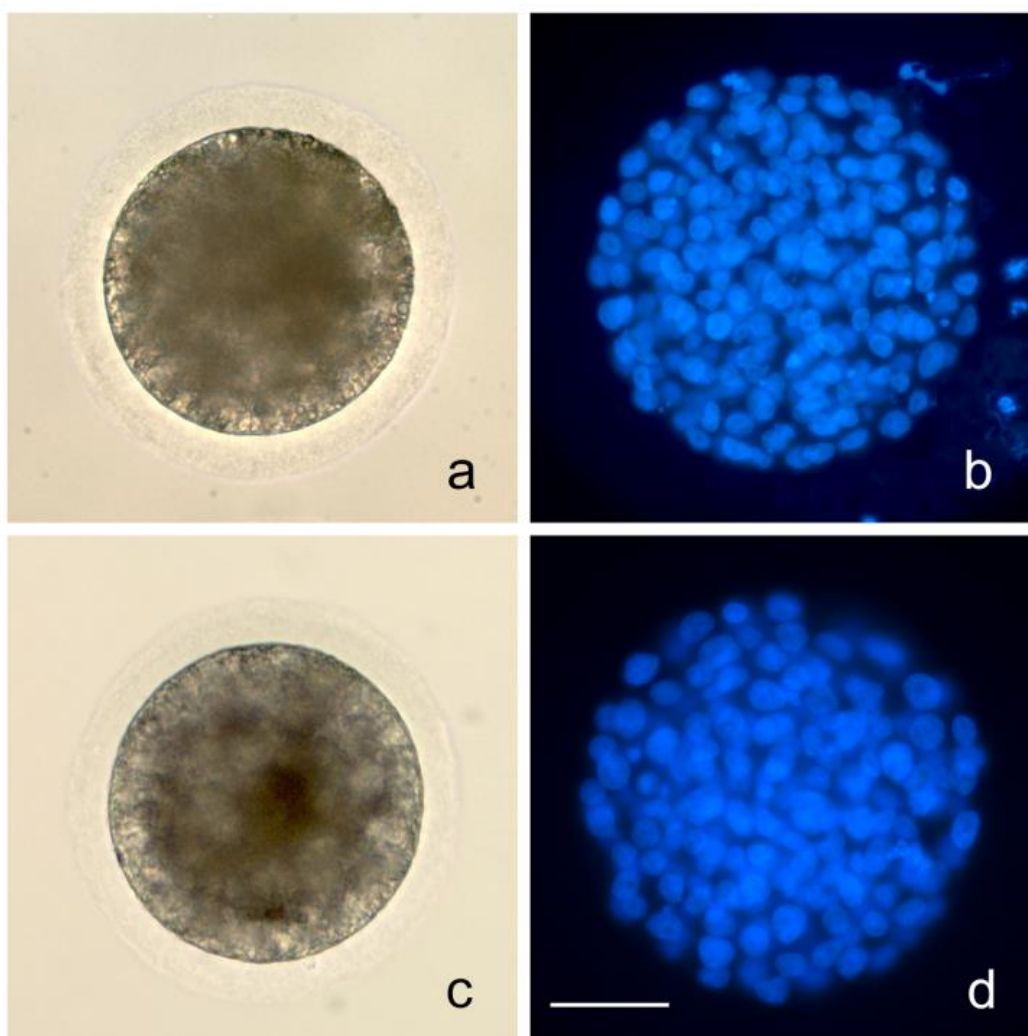


Figura 6. Blastocisto equino produzido, *in vitro*, após o uso de ICSI convencional (A, B) e Piezoelétrico (C, D) (SALGADO et al, 2018).

O laboratório pode ter posse de éguas receptoras ou enviar embriões para profissionais, considerando-se que o blastocisto produzido *in vitro*, independente do dia do cultivo, são semelhantes aos recuperados *in vivo* do dia 6, devendo ser transferido para éguas entre o 4º e o 6º dia de ovulação. Quanto aos filhotes, carece de maiores estudos sobre a saúde geral, porém, uma pesquisa não encontrou diferença entre filhotes por concepção natural e por ICSI (SALGADO et al, 2018).

3.12 Análise comparativa entre técnicas

A TE é um procedimento considerado fácil, onde as principais dificuldades se encontram no manejo, que deve ser organizado, e na sincronização das fêmeas. Em contrapartida, as vantagens envolvem a precocidade da vida reprodutiva da fêmea, com maximização comercial de equinos com potencial genético de interesse, assim como éguas de idade avançada ou com problemas no aparelho reprodutor (NEVES et al., 2021).

A técnica de GIFT possui como vantagem o uso de baixas quantidade de espermatozoides móveis ($2-5 \times 10^6$), com taxas embrionárias entre 27-82%, que variam também de acordo com o sêmen utilizado, onde os congelados ou resfriados diminuem quando comparados sêmen fresco (CARNEIRO, 2016).

A técnica ICSI é viável para FIV e para produção *in vitro* de embriões (PIVE), trazendo como vantagens seu uso em garanhões com baixa produção seminal ou baixa qualidade, quando submetidos a monta natural ou a IA. A recuperação de oócitos e a punção de espermatozoide de cauda de epidídimo *post mortem* permitem a geração de progênies, nos casos de reprodutores de alto valor genético que chegam a óbito. Outro fator é a otimização das doses de sêmen congelado, melhoria do manejo em éguas de competição, bem como a possibilidade de utilizar fêmeas consideradas inférteis para gerar embriões. Ou ainda no caso de animais com problemas reprodutivos, que impossibilitem tanto a monta natural quanto a gestação, se analisar a anatomia dos reprodutores e receptores (MARQUES, 2022).

Como desvantagens, faz-se necessário profissionais especializados com equipamentos de alto valor aquisitivo, pois o procedimento de OPU (*Ovum pickup*) é invasivo com riscos de lesões e infecções durante o mesmo. Outro fator limitante é a baixa taxa de desenvolvimento de blastocisto, mesmo em presença de altas taxas de clivagem em oócitos maturados *in vitro* receptores (PALHARES, GONZAGA, 2019; MARQUES, 2022).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biotécnicas utilizadas em reprodução de equinos passaram a torna-se rotina, bem como seus avanços ao longo dos anos trouxeram diversos benefícios, apesar de requerer maiores estudos sobre as etapas de desenvolvimento dos embriões e as capacitações espermáticas.

Fatores intrínsecos e extrínsecos aos reprodutores utilizados, bem como às doadoras e receptoras devem ser bem avaliados para minimizar seus impactos na geração de embriões. As técnicas vieram para auxiliar em diversos casos, seja quando a égua doadora é competidora, ou em éguas consideradas inférteis poderem gerar filhotes, bem como aquelas que possuem problemas reprodutivos.

Cada biotécnica apresenta vantagens e desvantagens, mas nota-se um destaque para seus benefícios, assim como a sobreposição da técnica ICSI, onde permite-se a otimização de sêmens de alto valor genético.

As dificuldades para a realização da pesquisa envolvem escasso material de qualidade científica, bem como o acesso aos mesmos. Mas não impossibilita a compreensão da evolução, dos procedimentos técnicos, bem como a inferência das taxas de sucesso.

Assim, com os eventos e estudos sobre as técnicas, elucidando os procedimentos e o desenvolvimento dos embriões, é possível determinar a melhoria das taxas reprodutivas de uma propriedade, bem como maximizar seus benefícios.

REFERÊNCIAS

BETTENCOURT, Elisa Maria Varela *et al.* **Reprodução em Equinos - Manual Prático.** Universidade de Évora: Évora. 2018.

CARNEIRO, Gustavo Ferrer. Avaliação de receptoras de embrião equino. In: Congresso Reprolab de Reprodução Equina, 1., 2018, Porto Alegre. **Anais eletrônicos** [...] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018a. p. 53 - 64. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/187280/001084152.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 mai. 2022.

CARNEIRO, Gustavo Ferrer. Foliculogênese na égua. In: Congresso Reprolab de Reprodução Equina, 1., 2018, Porto Alegre. **Anais eletrônicos** [...] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018b. p. 19 - 27. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/187280/001084152.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 mai. 2022.

CARNEIRO, Gustavo Ferrer. Produção in vivo e in vitro de embriões em equinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.158-166, 2016. Disponível em: <[http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v40/n4/p158-166%20\(RB688\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v40/n4/p158-166%20(RB688).pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2022.

CARREÑO OROZCO, Andres Juan Carreño. **Antología De La Transferencia De Embriones En Equinos.** Orientador: Sebastián Bonilla Correal. Trabalho de Conclusão de Curso - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Antonio Nariño, Bogotá D.C, 2020. Disponível em: <<http://repositorio.uan.edu.co/bitstream/123456789/3220/1/2021AndresJuanCarre%c3%b1oOrozco.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2022.

COUTO, Guilherme Rezende; VALLE, Guilherme Ribeiro. Transferência de oócitos em equinos: revisão de literatura. **Sinapse Múltipla**, n. 2, v. 1, p. 5 – 14, 2013. Disponível em: <<http://periodicos.pucminas.br/index.php/sinapsemultipla/article/view/4879/5405>>. Acesso em: 30 abr. 2022.

CUERVO-ARANGO, Juan. Aspectos práticos na avaliação do corpo lúteo. In: Congresso Reprolab de Reprodução Equina, 1., 2018, Porto Alegre. **Anais eletrônicos** [...] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. p. 10 - 18. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/187280/001084152.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 mai. 2022.

FIGUEIREDO, José Ricardo de, RODRIGUES, Ana Paula Ribeiro, AMORIM, Christiani Andrade, SILVA, José Roberto Viana. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias, FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueirêdo. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2. ed. São Paulo: Rocca, 2008.

LOPES, Edilson de Paula. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de Receptoras. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.39, n.1, p.223-229, 2015. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-12856>>. Acesso em: 30 abr. 2022.

MACIEL, Juliana Torriani. **Sincronização da onda ovulatória por meio de aspiração folicular e tratamento com o GnRH.** Orientador: Marcelo Bertolini. 2020. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

MALSCHITZKY, Eduardo. Seleção da doadora na eficiência reprodutiva. In: Congresso Reprolab de Reprodução Equina, 1., 2018, Porto Alegre. **Anais eletrônicos** [...] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. p.

45 - 52. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/187280/001084152.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 mai. 2022.

MARQUES, Daniele Branco. **Fatores que influenciam na eficiência do programa de ICSI em equinos**. Orientador: Marco Antônio Alvarenga. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2022.

NEVES, J. K. B. F.; ZANIN, G. M.; NEVES, K. A. L.; REBELO, L. S.; BATISTA, H. R.; SILVA, W. C. da; CAMARGO JÚNIOR, R. N. C. Utilização da Transferência de Embrião em equinos no município de Mojuí dos Campos, no Baixo Amazonas, Pará. **Conjecturas**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 825–833, 2021. DOI: 10.53660/CONJ-324-519. Disponível em: <<http://conjecturas.org/index.php/edicoes/article/view/324>>. Acesso em: 23 mar. 2022.

PALHARES, Rita de Cássia Ferreira Tameirão; GONZAGA, Douglas Rodrigues do Nascimento. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides aplicada à reprodução equina. **Revista V&Z Em Minas**, Belo Horizonte, n. 142, jul./ago./set. 2019. Disponível em: <<http://crmvmg.gov.br/RevistaVZ/Revista142.pdf#page=40>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

PEÑA, Fernando; GAZZO, Eduardo; CHUNG, Arturo; ESCUDERO, Ernesto. Primer embarazo en América Latina utilizando la técnica Piezo-ICSI: reporte de caso. **Rev Peru Ginecol Obstet**. v. 65, n. 2, p.179-182, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.31403/rpgo.v65i2171>>. Acesso em: 10 mai. 2022.

PIMENTEL, Cláudio Alves, CARNEIRO, Gustavo Ferrer. Biotécnicas aplicadas à reprodução de equinos. In: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias, FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueirêdo. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Rocca.

REGHIM, Lucas Silva. **Transferência De Embrião (TE) Em Equinos Revisão De Literatura E Relato De Caso**. Orientador: Bárbara Azevedo Pereira Torres. 2021. 38 f. TCC (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário do Sul de Minas, Varginha, 2021. Disponível em:<<http://repositorio.unis.edu.br/handle/prefix/1852>>. Acesso em: 21 mar. 2022.

RODRIGUES, José Luiz; BERTOLINI, Marcelo. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 43, n. 2, p. 204-208, 2019. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p204-208%20\(RB791\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p204-208%20(RB791).pdf)>. Acesso em: 30 abr. 2022.

SADURNÍ ROCA, Carolina, SERRANO PEREZ, Beatriz. **Nuevos avances en tecnologías reproductivas en equinos**: Revisión bibliográfica. Universitat de Lleida. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10459.1/70507>>. Acesso em: 20 mar. 2022.

SALGADO, R. M. BROM-DE-LUNA, J. G., RESENDE, H. L., CANESIN, H. S., HINRICHS, K. Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 5, p. 825-840, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-018-1174-9>> Acesso em 30 abr. 2022.