



UNIVERSIDADE PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

BACHAREL EM MEDICINA VETERINÁRIA

DANIELE BRANCO MARQUES

**FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIÊNCIA DO PROGRAMA DE ICSI EM
EQUINOS**

Botucatu

2022

DANIELE BRANCO MARQUES

**FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIÊNCIA DO PROGRAMA DE ICSI EM
EQUINOS**

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. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Coordenador de estágio: Profa. Dra. Juliany Gomes Quitzan

Botucatu

2022

Marques, Daniele Branco.

Fatores que interferem na eficiência do programa de ICSI em equinos / Daniele Branco Marques. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antônio Alvarenga

Capes: 50504002

1.Éguas. 2. Técnicas de cultura embrionária. 3. Injeções de esperma intracitoplásmicas. 4. Reprodução animal.
5. Fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Embriões; Equinos; ICSI; PIVE; Reprodução equina.

RESUMO

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) é uma biotecnologia aplicada à reprodução equina que evoluiu nas últimas duas décadas. Atualmente, esta é a única técnica viável para produção *in vitro* de embriões (PIVE) na espécie equina, executada a partir da injeção de um espermatozóide dentro do *ooplasmade* um oócito maduro. O processo envolve a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (*ovumpickup* - OPU), a maturação *in vitro* de oócitos imaturos, o desenvolvimento embrionário *in vitro*, a criopreservação e a transferência de embriões. Em razão de sua complexidade, diversos são os fatores que interferem na eficiência do programa de ICSI. Tais fatores estão associados tanto a características reprodutivas das éguas doadoras, quanto as dos garanhões, assim como particularidades anatômicas da espécie equina e propriedades técnicas do programa de ICSI. A idade avançada da doadora, a presença de contaminantes no ambiente, a oscilação de temperatura no transporte e a falha na seleção da receptora são alguns elementos que resultam em insucesso da técnica. Enquanto fatores como a suplementação das doadoras, a ciclicidade da égua e o uso de espermatozoides com integridade de membrana $\geq 40\%$ favorecem bons resultados. Neste âmbito, a expansão do uso comercial da técnica, em conjunto com resultados ótimos de PIVE, é dependente da compreensão dos fatores que interferem na eficiência do programa de ICSI.

Palavras-chave: equinos, reprodução equina, embriões, PIVE, ICSI.

ABSTRACT

Incytoplasmic sperm injection (ICSI) is an equine reproduction biotechnology that has evolved in the last two decades. Currently, this is the only viable technique for in vitro embryo production (IVEP) over the equine species, performed from the injection of a spermatozoon into the ooplasm of a mature oocyte. The process involves ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (ovum pick up - OPU), in vitro maturation of immature oocytes, in vitro embryonic development, cryopreservation, and embryo transfer. Due to its complexity, there are several factors that interfere with the efficiency of the ICSI program. These factors are associated with both reproductive characteristics of donor mares and stallions, as well as anatomical particularities of the equine species and technical properties of the ICSI program. The advanced age of the donor, the presence of contaminants in the environment, the temperature oscillation in the transport and the failure of the receiver selection are some elements that result in underachievement of the technique. While factors such as donor supplementation, mare cyclicity and sperm use with membrane integrity $\geq 40\%$ favor good results. In this context, the expansion of the commercial use of the technique, together with optimal IVP results, is dependent on the understanding of the factors that interfere with the efficiency of the ICSI program.

Keywords: horses, equine reproduction, embryos, IVEP, ICSI.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI)	7
2.1.1 Obtenção dos oócitos	8
2.1.2 Classificação dos CCO	8
2.1.3 Maturação oocitária	8
2.1.4 Preparo do sêmen	9
2.1.5 Injeção do espermatozóide	9
2.1.6 Cultivo in vitro, transferência e vitrificação embrionária	9
2.2 O PROGRAMA DE ICSI	10
2.2.1 Vantagens da injeção intracitoplasmática de espermatozóide	10
2.2.2 Desafios e desvantagens	10
2.3 FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIÊNCIA DE PROGRAMA DE ICSI EM EQUINOS	11
2.3.1 Anatomia folicular	11
2.3.2 Calibre da agulha de OPU	11
2.3.3 Diâmetro folicular	12
2.3.4 Número total de folículos aspirados	12
2.3.5 Equipe de aspiração folicular	13
2.3.6 Sensibilidade dos oócitos	13
2.3.7 Condições de transporte	13
2.3.8 Idade da doadora	14
2.3.9 Suplementação de éguas	14
2.3.10 A escolha da doadora e do garanhão	15
2.3.11 Técnica de conservação de sêmen	15
2.3.12 Parâmetros espermáticos	16
2.3.13 Dano celular	16
2.3.14 Condições de cultivo embrionário	17
2.3.15 Desenvolvimento até o estágio de blastocisto	17
2.3.16 Criopreservação de embrião	17
2.3.17 Transferência de embriões	17
2.3.18 Taxa de prenhez e mortalidade embrionária	18
2.3.19 Gestações gemelares	18
2.3.20 Nascimento dos produtos	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio do cavalo é caracterizado como uma atividade em expansão, em 2019, o Brasil atingiu um plantel de mais de 5,9 milhões de equídeos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE). A criação de equinos é representativa economicamente no país, uma vez que movimenta anualmente R\$16,15 bilhões e configura cerca de 3 milhões de empregos (MAPA, 2016). Nesta circunstância, o aumento do valor agregado de animais com altos padrões genéticos e a busca por maior rentabilidade da atividade impulsionaram o avanço das biotecnologias reprodutivas em equinos (BERTOZZO et al., 2014; RUA et al., 2016).

Dentre estas, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (*intracytoplasmic sperm injection* – ICSI) é uma biotecnologia que progrediu rapidamente nos últimos 20 anos. Hoje, é comercialmente utilizada na reprodução equina em razão de sua atual eficiência e aplicação clínica, suprimindo a demanda de produção *in vitro* de embriões (PIVE) entre os criadores de cavalos. O programa de ICSI superou a ineficácia da fertilização *in vitro* convencional (FIV), decorrente à falha na capacitação *in vitro* dos espermatozoides, resultando em melhores taxas de prenhez para a espécie. A técnica laboratorial consiste na injeção de um único espermatozoide adentro do oócito a partir de um micromanipulador acoplado a um microscópio invertido (HINRICHS, 2005; RUA et al., 2016; MORRIS, 2018; PALHARES et al., 2019).

Além de promover o uso satisfatório de éguas e garanhões com subfertilidade e baixa disponibilidade no mercado, a ICSI representa a habilidade de produção e armazenamento de genética superior das raças equinas fora do período de estação de monta. Para tal, é imprescindível o conhecimento das etapas envolvidas na técnica, desde a obtenção e preparo dos gametas, até o subsequente cultivo e destino dos embriões resultantes. A melhor compreensão sobre a competência do oócito e do embrião equino, coligado ao desenvolvimento de protocolos ideias de maturação *in vitro* têm sido fatores-chave para superação de problemas iniciais e caracterização de fatores que interferem no programa de ICSI em equinos (MORRIS, 2018).

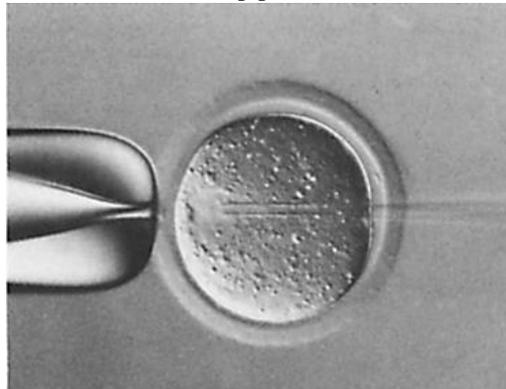
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI)

Em síntese, a ICSI consiste na injeção de um espermatozóide adentro do *ooplasma* de um oócito maturo, a partir de um micromanipulador acoplado a um microscópio invertido. O método envolve a recuperação de oócitos a partir da técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (*ovumpickup* - OPU), a maturação *in vitro* de oócitos imaturos, a inserção mecânica de espermatozóides em oócitosmaturados, o desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto e a transferência do embrião para o útero da égua receptora (HINRICHS, 2005; RUA et al., 2016; PALHARES et al., 2019).

Outrora, a ICSI convencional, realizada pela primeira vez em 1962 por Hiramoto na espécie ouriço do mar, esteve associada à danos mecânicos ao oócito causados pela deformação da zona pelúcida e exposição do *oolemma* à pressão negativa durante a injeção. A fim de evitá-los, Kimura e Yanagimachia (1995) modificaram a técnica a partir do uso de um sistema de injeção Piezo. Este garante a deposição precisa, e de forma menos traumática, do espermatozóide no oócito, e uma efetiva ativação deste por uma boa imobilização do gameta masculino. A modificação favoreceu as taxas de clivagem e viabilizou resultados mais consistentes ao programa de ICSI (SMITS et al., 2010; PALHARES et al., 2019).

Figura 1 – ICSI utilizando uma pipeta associada ao sistema de Piezo



Fonte: Kimura&Yanagimachia, 1995

2.1.1 Obtenção dos oócitos

A aspiração folicular (*ovum pick-up* – OPU) é uma técnica não-invasiva utilizada para obtenção dos oócitos. Ela permite a coleta de oócito a partir da aspiração de folículos préovulatórios e/ou imaturos provenientes de doadoras vivas, tratadas ou não com gonadotrofina coriônica humana com objetivo de induzir a maturação *in vivo*. Existem, ainda, outras técnicas como a coleta em éguas sacrificadas em matadouros, e a superovulação de doadoras vivas a partir do uso de hormônios, como extrato de pituitária equina e hormônio folículo estimulante (FSH). Entretanto, estas sofrem, respectivamente, com a influência da variabilidade do tempo de obtenção até chegada ao laboratório sobre a maturação dos oócitos, e com o insucesso comercial da superovulação na espécie equina (PURCELL et al., 2007).

2.1.2 Classificação dos CCO

Os oócitos coletados são avaliados quanto a morfologia do ooplasma: homogêneo, condensado ou heterogêneo/fragmentado; e a quantidade das células de cumulus: desnudo, apenas *corona radiata* presente, *Cumulusoophorus* compacto ou cumulus expandido. Tais características exteriorizam efeitos sob particularidades pós-cultura e capacidade de fertilização, e logo, no sucesso das técnicas de reprodução assistida (DEL CAMPO et. al, 1995).

2.1.3 Maturação oocitária

A maturação nuclear e citoplasmática é um processo essencial para que os oócitos se tornem fertilizados, sendo o progresso da meiose até o estágio de metáfase II um meio de ponderá-la (SQUIRES, 1996). Os meios de maturação TCM-199, B2 e Ham's F10 são considerados aptos para a espécie equina, pois apesar de apresentarem variáveis quanto as taxas e tempo de maturação em estudos, não houve diferença significativa nos resultados (WILLIS et. al., 1990; OKOLSKI et. al, 1991; SHABPAREH et al., 1993).

Os protocolos de maturação desenvolvidos para oócitos equinos incluem adição de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e estradiol, uma vez que são os hormônios presentes no processo *in vivo*. Tem-se ainda a adição de células somáticas como fator acrescente na taxa de meiose até o estágio de metáfase II, que normalmente é

atingido com 30 horas de incubação à 39°C e 5% CO₂ (OKOLSKI et. al, 1993; SQUIRES, 1996).

Após este período, os oócitos são novamente classificados em: imaturos, quando em metáfase I ou vesícula germinal, maduros (metáfase II) ou degenerados (DEL CAMPO et. al, 1995). Oócitos que apresentem o primeiro corpúsculo polar aparente são utilizados para a técnica (SQUIRES et al., 1999).

2.1.4 Preparo do sêmen

O espermatozóide utilizado pode ser oriundo tanto de sêmen fresco ou criopreservado, a amostra de sêmen é lavada, colocada em meio PVP específico para redução de motilidade – com a finalidade de facilitar a aspiração pela pipeta e condução ao citoplasma do oócito – e posteriormente transferida para uma placa de Petri, considerando-a como câmara de micro injeção (KUROKAWA et al., 2003; PALHARES et al., 2019).

2.1.5 Injeção do espermatozóide

Os gametas são manipulados com micromanipuladores acoplados em um microscópio invertido e injetados com uma pipeta associada ao Piezo. A injeção espermática avança em alta velocidade através da zona pelúcida e membrana plasmática do oócito, todavia, sem causar danos em virtude ao sistema Piezo (PALHARES et al., 2019). Pulsos piezo elétricos são liberados com intuito de permeabilizar a membrana plasmática e seccionar a cauda do espermatozóide. Este processo garante a imobilização do gameta e liberação de fatores ativadores de oócitos, aumentando também as taxas de clivagem em equinos (CHOI et al., 2004; HINRICHS, 2005). Em seguida, ocorre o deslocamento da pipeta contendo o espermatozóide ao interior do oócito, imobilizado por uma pipeta *holding*. Ao encontro da zona pelúcida, ocorre a liberação de pulsos piezo de diferentes intensidades responsáveis pelo avanço da pipeta injetora de espermatozóide, seguida pela penetração do *oolemmae* injeção da cabeça do espermatozóide (KIMURA et al., 1995; KUROKAWA et al., 2003).

2.1.6 Cultivo in vitro, transferência e vitrificação embrionária

Os embriões são cultivados *in vitro*, por um período determinado por cada laboratório, até o estágio de blastocistos, podendo ser transferidos via transcervical em uma égua receptora

(HINRICHS, 2005) ou, ainda, vitrificados visando comercialização e/ou posterior aproveitamento (BOHN et al., 2020).

2.2 O PROGRAMA DE ICSI

No momento atual, a ICSI é a única técnica viável para fecundação *in vitro* de oócitos equinos e produção *in vitro* de embriões (PIVE). O programa, como um todo, demonstra-se promissor e benéfico ao enfrentamento de diversas situações vivenciadas na reprodução equina (PALHARES et al., 2019).

2.2.1 Vantagens da injeção intracitoplasmática de espermatozóide

O uso de garanhões com baixa qualidade e/ou produção seminal, tal como de garanhões que apresentam volume insuficiente para monta natural e/ou inseminação artificial (IA), são alguns exemplos de circunstâncias quais a utilização da técnica é vantajosa. A partir da recuperação de oócitos e da punção de espermatozoides da cauda do epidídimo *post mortem*, podemos reproduzir descendentes de animais de elite que venham a óbito. Ademais, a ICSI garante a otimização da dose de sêmen congelado, e logo, um melhor aproveitamento do material genético da espécie. Bem como otimiza o manejo reprodutivo de éguas competidoras e possibilita a reprodução de éguas incapazes de gestar ou produzir embriões, seja por um problema reprodutivo associado ao oviduto, útero ou cérvix. E, ainda, elimina o risco de endometrite nas éguas doadoras por dispensar a inseminação das mesmas (TROUNSON et al., 1998; CARNEVALE, 2004; HINRICHS, 2005; MORRIS, 2018).

2.2.2 Desafios e desvantagens

Em contrapartida, a técnica requer mão de obra especializada e equipamentos veterinários específicos de alto valor. E, ainda que realizado por um Médico Veterinário competente, o procedimento de OPU é invasivo e exhibe risco considerável de laceração de reto e contaminação da cavidade abdominal (peritonite) (HINRICHS, 2005; STOUT, 2019). O avanço da técnica é restringido em profundidade em razão a baixa disponibilidade de oócitos para pesquisa. Apesar das altas taxas de clivagem em oócitos maturados *in vitro*, a taxa de desenvolvimento para estágio de blastocisto é baixa e considerada o fator mais limitante da técnica (MORRIS, 2018).

2.3 FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIÊNCIA DE PROGRAMA DE ICSI EM EQUINOS

A ICSI em equinos apresenta uma complexidade de detalhes em sua realização. Assim, numerosos são os fatores que podem interferir na eficiência do programa e resultar em insucesso (EMBRAPA, 2002). Para compreensão de tais mecanismos, estudos vêm sendo conduzidos por diversos pesquisadores da área de reprodução equina (BERTOZZO et al., 2014).

2.3.1 Anatomia folicular

Um fator importante que interfere na eficiência dos métodos de recuperação de oócitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é a anatomia de fixação do oócito à parede do folículo das éguas. Nesta espécie, o folículo apresenta uma camada tecal sob as células do cumulus, que atuam como uma âncora para a fixação ao cumulus, dificultando o recolhimento do oócito no processo de aspiração folicular (HAWLEY et. al., 1995). Previamente ao entendimento desta característica anatômica, a taxa de recuperação de oócitos imaturos era baixa (<25%) (HINRICHS, 2012). Uma vez que somente a aspiração do fluido folicular não é suficiente para recuperar o oócito, fez-se necessário descargas repetidas (5 a 10 vezes) adentro do folículo, acompanhada da raspagem vigorosa da parede com uma agulha de grande calibre (12) e duplo lúmen (lúmen interno para aspiração, lúmen externo para descarga) para alcançar uma taxa de recuperação oocitária clinicamente aceitável (>50%) (GALLI et al., 2007).

2.3.2 Calibre da agulha de OPU

Quanto ao tamanho da agulha utilizada para aspiração folicular, Velez et al. (2012) relataram em estudo a ocorrência de declínio na taxa de recuperação oocitária ao diminuir o diâmetro das agulhas utilizadas. Foi obtido uma taxa de recuperação de 38% para uma agulha de lúmen duplo de 15 polegadas, em contrapartida com 48% para agulha de lúmen duplo calibre 12. Presume-se que o fato se relaciona com a rapidez do fluxo e maior turbulência durante a descarga, proporcionando uma raspagem mais eficaz da parede folicular (GALLI et al., 2007).

2.3.3 Diâmetro folicular

O diâmetro do folículo que engloba o oócito no tecido ovariano é um fator determinante na fase de maturação. Um estudo correlacionou a distribuição de folículos $\leq 10\text{mm}$, entre 11 e 15mm e 21 a 30mm quanto as classificações oocitárias, verificando diferença estatística ($P < 0,05$) entre elas. O primeiro grupo exibiu alta frequência de folículos atresícos, com oócitos em processo de degeneração; e o último, maior prevalência de oócitosmaturados. Por consequência, determinaram que oócitos oriundos de folículos $\leq 10\text{mm}$ são fracos candidatos à maturação *in vitro*, e logo, a ICSI (DEL CAMPO et al., 1995).

Por outro lado, a taxa de recuperação de oócitos parece ser positivamente influenciada por um menor tamanho folicular. Uma taxa mais alta é atingida quando uma porcentagem maior de folículos aspirados tem menos de 10mm de diâmetro. Isto em razão da menor área permitir uma raspagem mecânica mais eficaz da parede do folículo (CUERVO-ARANGO et al., 2019a). Embora a aspiração de folículos pré-ovulatórios apresente boas taxas de recuperação ($>70\%$), a produtividade do programa de ICSI é limitada ao fato de apenas 1 ou 2 folículos se desenvolverem naturalmente até este estágio em cada ciclo estral da égua (CARNEVALE et al., 2005).

2.3.4 Número total de folículos aspirados

A probabilidade de produção de embrião é diretamente proporcional ao número total de folículos aspirados de uma doadora (CLAES et al., 2016). Este, por sua vez, é correspondente a quantidade de folículos presentes no ovário em uma determinada época do ano e fase do ciclo estral, sendo ínfimo no inverno/anestro. Em contrapartida, as diferenças raciais implicam em presença numérica de folículos dispares. Éguas quarto de milha, sangue quente e árabes apresentam, respectivamente, 14, 15 e 17 folículos aspirados por sessão de OPU, sendo que a média de oócitos recuperados varia de <5 a >12 (JACOBSON et al., 2010; GALLI et al., 2014). Por sua vez, o número final de oócitos recuperados é diretamente proporcional ao número de folículos perfurados e inversamente ao intervalo de tempo entre as sessões, em razão da presença diminuída de folículos em aspirações realizadas com intervalos inferiores a 11 dias, recomendando-se ao mínimo 21 dias (HINRICHS, 2012; CUERVO-ARANGO et al., 2019a).

2.3.5 Equipe de aspiração folicular

Outro fator relevante é a individualidade de cada profissional no procedimento de aspiração folicular, interferindo justamente sobre a taxa de recuperação oocitária. Estudos recentes expõem taxas de recuperação de folículos imaturos de 50 a 70%, quando aspirados por uma equipe especializada (JACOBSON et al., 2010; GALLI et. al, 2014). Simultaneamente, variações de 0 a 100% de recuperação foram expostas em sessões de OPUs executadas por diferentes profissionais (CUERVO-ARANGO et al., 2019a).

2.3.6 Sensibilidade dos oócitos

Os oócitos são extremamente sensíveis a contaminantes do ambiente, dos materiais que fazem contato e a composição inadequada do meio de cultivo. Estas são algumas causas de contaminação que comprometem o desenvolvimento dessas estruturas. Nesta conjuntura, a assepsia do procedimento de recuperação e do laboratório afeta substancialmente os resultados do programa de ICSI (CUERVO-ARANGO et al., 2019b). Devido ao mesmo fator os medicamentos aplicados à égua, a temperatura do ambiente no momento da OPU e a velocidade de seleção dos oócitos devem ser monitorados a fim de evitar posterior distorção da capacidade de desenvolvimento oocitário (CHOI et al., 2016).

2.3.7 Condições de transporte

O transporte de oócitos imaturos podem ser realizados de modo seguro, sob temperatura ambiente (~22°C) por equipamentos de manutenção de temperatura em um intervalo máximo de 24 horas (CHOI et al., 2016). Ao exceder o tempo de chegada ao laboratório e sofrer quedas de temperatura, oócitos imaturos perdem a competência de desenvolvimento e a produção de blastocistos decai aproximadamente 50%. Para temperaturas abaixo de 15°C, supõem-se perda de viabilidade. Ademais, o transporte proporciona certa seleção das estruturas, uma vez que ocorre a degeneração de oócitos com baixa capacidade de desenvolvimento até o estágio de metáfase II (MII), apresentando, assim, uma taxa de clivagem superior quando comparados a oócitos coletados e imediatamente preparados para maturação *in vitro* (GALLI et al., 2016; STOUT, 2020).

2.3.8 Idade da doadora

A influência da idade da doadora sobre a eficiência do programa de ICSI em equinos se apresenta em diversas formas. Em relação à recuperação média de oócitos na OPU, a idade da égua interfere negativamente, uma vez que, para éguas com mais de 20 anos, o número de folículos médios visíveis com a idade diminui (<18 vs. >22 para éguas jovens) e a presença de cistos foliculares pode resultar em uma identificação errônea destas estruturas como folículos.

Como resultado temos, em média, 10 oócitos recuperados por éguas senil, enquanto índice superior a 13 para éguas jovens (CUERVO-ARANGO et al., 2019a). Da mesma maneira, avaliou-se a idade média de doadoras, após 50 dias da inseminação, para dois grupos de receptoras, prenhas e não prenhas. Foi relatado idade média das doadoras de 15,35 anos para o grupo das receptoras prenhas, enquanto 18,03 anos para as doadoras referentes ao grupo de receptoras não prenhas. O fato sugere influência da idade da doadora sobre as taxas de prenhez após a ICSI (CARNEVALE et al., 2010), porém não sobre a taxa de mortalidade embrionária (CUERVO-ARANGO et al., 2019c).

Por outro lado, a qualidade dos oócitos recuperados de éguas senis e a capacidade destes em se desenvolver após injeção intracitoplasmática assemelham-se aos parâmetros de éguas jovens. Surpreendentemente, observou-se maior produção de blastocistos (P=0,08) a partir de oócitos equinos amadurecidos em líquido folicular de éguas senis, quando comparados ao de éguas jovens (4-13 anos). Isto apesar da hipótese de que oócitos cultivados em líquido folicular de éguas senis (21-26 anos) sofreriam efeito deletério sobre a maturação oocitária e desenvolvimento subsequente à ICSI (SPACEK et al., 2018). Em contraste, no que se refere a taxa de produção de embriões *in vitro*, um estudo recente denota 43% de probabilidade de produção de pelo menos um embrião para éguas senis vs. >65% para éguas jovens, sugerindo influência da senilidade sobre os resultados (CARNEVALE et al., 2005).

2.3.9 Suplementação de éguas

Éguas senis evidenciaram melhoras na função metabólica do oócito e desenvolvimento dos embriões de ICSI ao receberam dieta suplementada por complexo de nutrientes com ácido graxos poli-insaturados n-3. Diferentemente dos aditivos à base de grãos, o ômega-3 parece estar associado ao incremento numérico e na função das mitocôndrias presentes no oócito. Estas, por sua vez, são essenciais para fornecer energia ao oócito e, posteriormente, ao

embrião, via fosforilação oxidativa. Dessa maneira, entende-se que a suplementação de éguas é capaz de afetar a qualidade dos oócitos e seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto (CATANDI et al., 2020).

2.3.10 A escolha da doadora e do ganhão

A escolha da doadora pode claramente afetar a produção *in vitro* de embriões. Éguas inférteis são menos propensas a produzir um embrião no programa de ICSI. Ao serem comparadas às éguas subférteis ou férteis, estas produzem de 4 a 6 vezes menos. Quando a infertilidade provém de graves anormalidade uterinas, predominantemente por infecções crônicas, a probabilidade de produção é ainda mais ínfima (CLAES et al., 2016). Na prática, o histórico de produtividade da doadora é relevante, uma vez que éguas com alta taxa de produção de embrião tendem a reproduzir bons resultados. Observou-se que éguas que produziram um embrião na primeira sessão de OPU-ICSI foram capazes de repetir a produção na sessão seguinte (66/86; 77%). Enquanto éguas que não produziram embrião na primeira sessão foram consideradas improváveis de fazê-lo na segunda tentativa (10/26; 38%) (CUERVOARANGO et al., 2019a).

A respeito dos ganhões, as taxas de fertilização dos oócitos divergem de acordo com as raças. Enquanto animais árabes apresentam baixas taxas de fertilização, os quartos de milha e sangue quente expressam altas taxas de clivagem dentro do programa de ICSI (GALLI et al., 2016). A variabilidade na fertilidade intrínseca entre as raças e a participação de animais subférteis no programa de ICSI refletem em baixas taxas de desenvolvimento dos zigotos para o estágio de blastocisto, que é, hoje, o principal fator limitante da técnica. Na tentativa de incrementar a probabilidade de sucesso em uma segunda sessão de OPU-ICSI, o uso de um ganhão diferente é interessante, aumentando em até 3 vezes a chance de produzir pelo menos um embrião (HINRICHS, 2012; CUERVO-ARANGO et al., 2019a).

2.3.11 Técnica de conservação de sêmen

Quanto à conservação do sêmen, observou-se, a partir da avaliação da formação de pronúcleos e clivagem 20h após a ICSI, que não houve diferença significativa na taxa de fertilização entre a utilização de sêmen fresco e de sêmen congelado. Assim como no número médio de células após 96h. Considerando, portanto, que ambos apresentam altas taxas de fertilização e clivagem, sem necessidade de tratamento químico para ativação. Ainda assim,

notoriamente, oócitos inseminados com espermatozóide fresco tendem a apresentar um desenvolvimento mais avançado (CHOI et al., 2002).

É importante ressaltar que as diferentes partidas de sêmen congelado de um ganhão podem resultar em oscilação na capacidade final de produzir blastocistos (GALLI et al., 2016). Por outro lado, o recongelamento do sêmen a uma concentração baixa, realizado com o intuito de aumentar a disponibilidade de palhetas para ICSI, pode comprometer os resultados do programa. A taxa de produção de blastocisto é contrastante, atingindo uma diferença de até 80 pontos percentuais abaixo do resultado de oócitos tratados com sêmen congelado original (CUERVO-ARANGO et al., 2019a).

2.3.12 Parâmetros espermáticos

Alguns parâmetros espermáticos afetam o desfecho da ICSI quanto a clivagem, desenvolvimento embrionário e estabelecimento de prenhez. É o caso da integridade de membrana e vitalidade dos espermatozoides para a variável clivagem; vitalidade para desenvolvimento embrionário; e integridade de membrana para estabelecimento de prenhez. Há relato de maior probabilidade de prenhez para populações de espermatozoides com integridade de membrana $\geq 40\%$, quando comparado a populações de $\leq 20\%$ (GONZALEZCASTRO et al., 2018). À medida que, sêmen congelados de diferentes fertilidades não produzem diferença significativa na taxa de formação de blastocisto, sob condição de que a célula selecionada seja móvel (LAZZARI et al., 2002).

2.3.13 Dano celular

Ao serem submetidos à ICSI, os oócitos detêm uma solução de continuidade de 8 μm de diâmetro, em consequência de perfuração realizada pelo instrumento de Piezo. Neste contexto, existe a hipótese de ação negativa de células de defesa materna sobre o embrião após transferência ao ambiente uterino. Entretanto, a não detecção de células polimorfonucleares em estudo, somando-se ao fato do superior desenvolvimento de embriões cultivados *in vivo* perante o *in vitro*, não sustentam esta suposição (CHOI et al., 2002). Em compensação, outras condições associadas à agulha de microinjeção, como injúrias mecânicas ao citoesqueleto e organelas do citoplasma, assim como a introdução de contaminantes biológicos, têm potencial causador de perda embrionária após transferência do embrião microfertilizado (IRITANI, 1991).

2.3.14 Condições de cultivo embrionário

Apesar de não ser o método usualmente adotado, embriões desenvolvidos *in vivo* após técnica de ICSI, isto é, que foram transferidos para o oviduto de éguas receptoras, detém um maior número de núcleos formados às 96h, quando comparados com embriões cultivados *in vitro*, para os tratamentos espermáticos de sêmen fresco e de sêmen congelado/descongelado (CHOI et al., 2002). As condições de cultura, ainda que bem definidas, divergem-se para cada laboratório a fim de atingir melhores taxas de maturação oocitária (>60%) e clivagem pós ICSI (>65%) (CHOI et al., 2016).

2.3.15 Desenvolvimento até o estágio de blastocisto

O intervalo de tempo necessário para que um zigoto atinja o estágio de blastocisto é variável. Alguns programas de ICSI determinam que os embriões devem tardar não mais que 8 dias; enquanto outros incluem blastocistos formados em até 10-12 dias. Mesmo que a cultura por um período mais prolongado proporcione uma melhora no rendimento de blastocisto, os embriões desenvolvidos tardiamente parecem não manter a competência necessária. Quando transferidos embriões desenvolvidos em 10-12 dias, estes foram significativamente menos propensos a resultar em prenhez aos 14 dias (3/11; 27%), contrapondo-se aos embriões que se desenvolveram para o estágio de blastocisto de 6 a 9 dias (38/55; 69%) (DUCHEYNE et al., 2019).

2.3.16 Criopreservação de embrião

A criopreservação do embrião de ICSI é possível devido ao pequeno tamanho da estrutura e por este ainda estar desprovido de cápsula embrionária. A transferência de um embrião vitrificado não difere em resultado de prenhez. Sem embargo, a predileção pela criopreservação tende a ser benéfica ao programa de ICSI, uma vez que permite a seleção de uma receptora em ótimas condições uterinas de transferência, superando as dificuldades de sincronização doadora-receptora resultantes da variação do intervalo de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (6 a 12 dias) (GALLI et al., 2007).

2.3.17 Transferência de embriões

Atualmente, a transferência de embriões oriundos de sêmen congelado tem apresentado melhores resultados quando efetuada no dia 4 do diestro das receptoras,

resultante de ovulação ou protocolo hormonal. Para taxa de prenhez inicial e taxa de nascimento temos, respectivamente, 72% e 60% para embriões transferidos no dia 4, em contraste com 58% e 46% para o dia 5, e 42% e 33% para o dia 6 (CLAES et al., 2020). Já transferências realizadas no dia 3 do diestro tendem a expressar semelhante taxa de prenhez ao dia 4, entretanto com maior incidência de perda embrionária, e, logo, menor porcentagem de potros nascidos (CHOI et al., 2017). De outra parte, apesar da suposição de que embriões transferidos a fresco toleram uma janela mais ampla para sincronização, esta não está absolutamente estabelecida (STOUT, 2020).

2.3.18 Taxa de prenhez e mortalidade embrionária

Estudos recentes sugerem taxa de prenhez inicial de 55% a 80% e taxa de perda gestacional precoce >12%, tanto para transferência de embriões à fresco, quanto para desvitrificados (STOUT, 2020). Salienta-se que a taxa de mortalidade embrionária é naturalmente maior no programa de ICSI quando comparada a monta natural, inseminação artificial (IA), transferência de oócitos (TOv) e transferência de embriões convencional (TE) (CUERVOARANGO et al., 2019a). Considera-se o comprometimento do desenvolvimento embrionário uma razão para tal. Este é fomentado a partir de condições de cultura inadequadas, quais, por sua vez, refletem um desenvolvimento mais lento e uma alta porcentagem de células apoptóticas; contrapondo-se a produção de embriões *in vivo* (TREMOLDA et al., 2003). Outro fator é a subfertilidade das éguas e garanhões submetidos a ICSI, junto aos defeitos intrínsecos de seus gametas, resultando em embriões de baixa qualidade. Tal como a falha na seleção de receptoras também contribui negativamente para a sobrevivência do embrião, atuando sobre as taxas de prenhez inicial e de perdas gestacionais (GALLI et al., 2007).

2.3.19 Gestações gemelares

Os embriões de ICSI tendem a originar gêmeos ou trigêmeos monozigóticos com maior frequência (4/254; 1,6%) que outras técnicas de reprodução. Provavelmente, ocorre a bipartição do blastocisto inicial e subsequente formação de dois sulcos primitivos no momento da gastrulação. A presença dos gêmeos se torna evidente quando identificação de duplo batimento cardíaco, sendo que dos 12 aos 20 dias uma única vesícula pode ser observada no exame ultrassonográfico. Frequentemente, a gestação gemelar resulta em

abortos ou nascimentos de potros prematuros com alta taxa de mortalidade neonatal. Sendo assim, ressalta-se a importância de verificar o desenvolvimento de mais de uma vesícula embrionária, no intervalo de 20 a 30 dias após a transferência de um embrião ICSI (LIMA et al., 2013; DIJKSTRA et al., 2020).

2.3.20 Nascimento dos produtos

Para situações quais o sexo do produto manifeste importância, vale evidenciar que um estudo recente sugere que, possivelmente, o meio de cultivo utilizado atualmente pelos laboratórios de ICSI favorecem o desenvolvimento de embriões do sexo masculino (118/193; 61% dos produtos nascidos são potros). Outro fator exposto foi o alcance do estágio de blastocisto mais precocemente quando comparado ao sexo feminino, visto que 71% de potros para blastocistos formados em 7 dias vs. 54% de potros para blastocistos formados em 8 dias (CLAES et al. 2020). Em relação a sanidade, a maioria dos potros de ICSI são clinicamente saudáveis (190/193; 98%) e suas características morfológicas e placentárias não diferem de potros concebidos naturalmente. Desta forma, o programa de ICSI não compromete a saúde pós-natal e sobrevivência destes animais (VELENZUELA et al., 2018; STOUT, 2019; CLAES et al. 2020).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) se revela como uma biotecnologia em ampla ascensão na reprodução equina. A eficiência da técnica proporcionou inúmeras vantagens culminando a um excelente aproveitamento da alta genética das raças equinas. Enquanto isso, ainda superou as dificuldades originadas por disfunções de subfertilidade de animais de elite. A probabilidade de sucesso do programa de ICSI é influenciada por fatores como a raça, a época do ano, a qualidade do sêmen, a fertilidade da doadora e do garanhão e em particular, a idade da égua. Por outro lado, a suplementação de éguas senis, a alternância na escolha do garanhão e a execução rigorosa do transporte, da maturação e do cultivo *in vitro* são alternativas para contornar impactos negativos sobre a ICSI. Por fim, torna-se de suma importância a compreensão, por parte do Médico Veterinário,

destes e demais fatores que influenciam na eficácia do programa de ICSI, a fim de garantir o progresso da reprodução equina.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOZZO, R. B.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; PAGNONCELLI, R. R.; COSTA E SILVA, E. V.; ZUCCARI, C. E. S. N. Vantagens e desafios das biotécnicas avançadas utilizadas na reprodução equina assistida. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 71, n. 1, p. 84-93, 2014.

BOHN, A. P.; VIEIRA, A. D.; MONDADORI, R. G. Vitrificação de embriões equinos: alternativas para melhorar as taxas de sobrevivência embrionária. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v. 44, n.3, p. 89-94, jul/set. 2020.

CARNEVALE, E. M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, Fort Collins, v. 82-83, p. 617-624, jul. 2004.

CARNEVALE, E. M.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; PANZANI, D.; STOKES, J. E.; SQUIRES, E. L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. **Theriogenology**, [S.l.], v. 64, n. 3, p. 519-527, ago. 2005.

CARNEVALE, E.M.; FRANK-GUEST, B.L.; STOKES, J.E. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2 p. 258-259, 2010.

CATANDI, G; OBEIDAT, Y.; STOKES, J.; CHICCO, J.; CHEN, T.; CARNEVALE, E. Maternal diet can alter oocyte mitochondrial number and function. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S.l.], v. 89, p. 103030, jun. 2020.

CHOI, Y. H., LOVE, C. C., LOVE, L. B., VARNER, D. D., BRINSKO, S., & HINRICHS, K. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 123 n. 3, p. 455–465, mar. 2002.

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. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 70, n. 5, p. 1231–1238, mai. 2004.

CHOI, Y.; HINRICHS, K. Vitrification of in vitro-produced and in vivo-recovered equine blastocysts in a clinical program. **Theriogenology**, [S.l.], v. 87, p. 48-54, jan. 2017.

CHOI, Y.; VELEZ, I. C.; MACIAS-GARCIA, B.; RIERA, F. L.; BALLARD, C. S. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. **Theriogenology**, [S.l.], v. 85, n. 7, p. 1289-1296, abr. 2016.

CLAES, A.; CUERVO-ARANGO, J.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; STOUT, T. A. Speed of in vitro embryo development affects the likelihood of foaling and the foal sex ratio. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.l.], v. 32, n. 5, p. 468-473, fev. 2020.

CLAES, A.; GALLI, C.; COLLEONI, S.; NECCHI, D.; LAZZARI, G.; DEELEN, C.; BEITSMA, M.; STOUT, T. Factors influencing oocyte recovery and in-vitro production of equine embryos in a commercial OPU/ ICSI program. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S.l.], v. 41, n. 39, p-68-69, jun. 2016.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; BEITSMA, M.; STOUT, T. A. E. The effect of different flushing media used to aspirate follicles on the outcome of a commercial ovum pickup–icsi program in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S.l.], v. 75, p. 74-77, abr. 2019b.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. **Theriogenology**, [S.l.], v. 132, p. 36-44, jul. 2019c.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.l.], v. 31, n. 12, p. 1894-1903, oct. 2019a.

DEL CAMPO, M. R.; DONOSO, X.; PARRISH, J. J.; GINTHER, O. J. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 1141-1153, jan. 1995.

DIJKSTRA, A.; CUERVO-ARANGO, J.; STOUT, T. A. E.; CLAES, A. Monozygotic multiple pregnancies after transfer of single in vitro produced equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 258-261, jun. 2019.

DUCHEYNE, K. D.; RIZZO, M.; CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.; DAELS, P. F.; STOUT, T. A.; RUIJTER-VILLANI, M. In vitro production of horse embryos predisposes to micronucleus formation, whereas time to blastocyst formation affects likelihood of pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.l.], v. 31, n. 12, p. 1830-1839, nov. 2019.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução de bovinos**. Brasília: EmbrapaRecursosGenéticos e Biotecnologia, n 84, 2002.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; CLAES, A.; BEITSMA, M.; DEELEN, C.; NECCHI, D.; DUCHI, R.; LAZZARI, G.; STOUT, T. Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of Ovum Pick Up-ICSI and embryo cryopreservation technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S.l.], v. 41, p. 82, jun. 2016.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 98, n. 1-2, p. 39-55, mar. 2007.

GALLI, C.; DUCHI, R.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. **Theriogenology**, [S.l.], v. 81, n. 1, p. 138-151, jan. 2014.

GONZALEZ-CASTRO, R. A.; CARNEVALE, E. M. Association of equine sperm population parameters with outcome of intracytoplasmic sperm injections, **Theriogenology**, Colorado, v. 119, p. 114-120, out. 2018.

- HAWLEY, L. R.; ENDERS, A. C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v.52, n.1, p. 243-252, 1995.
- HINRICHS, K. Assisted reproduction techniques in the horse. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 80-93, dez. 2012.
- HINRICHS, K. Update on equine ICSI and cloning. **Theriogenology**, [S.l.], v. 64, p. 535-541, 2005.
- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal 2019**. Rio de Janeiro: IBGE, v. 47, p. 1-8, 2019.
- IRITANI, A. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. **Molecular reproduction and development**, Kyoto, v. 28, p. 199-207, 1991.
- JACOBSON, C. C.; CHOI, Y.; HAYDEN, S. S.; HINRICHS, K. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, [S.l.], v. 73, n. 8, p. 1116-1126, mar. 2010.
- KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. Intracytoplasmic Sperm Injection in the Mouse. **Biology of Reproduction**, Hawaii, n. 52, p. 709-720, 1995.
- KUROKAWA, M.; FISSORE, R. A. ICSI-generated zygotes exhibit altered calcium oscillations, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 downregulation, and embryo development. **Molecular Human Reproduction**, Amherst, v. 9, n. 9, p.523-533, out. 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 frozenthawed spermatozoa from semen of different fertilities. **Theriogenology**, [S.l.], v. 58, p. 709-712, ago. 2002.
- LIMA, D. B. C.; BOAKARI, Y. L.; RIZZO, M. S.; CAVALCANTE, T. V.; SOUSA, R. P. B.; NEVES, C. A.; ARRIVABENE, M. Inviabilidade do desenvolvimento de potros após prenhez múltipla. **Pubvet**, Londrina, v. 7, n. 11, p. 885-1001, jun. 2013.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavallo**. Brasília, 2016. Disponível em:

<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriaishttps://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalotematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudohttps://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalodo-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

MORRIS, L. H. A. The development of in vitro embryo production in the horse. **Equine Veterinary Journal**, New Zeland, v. 50, n. 6, p.712-720, abr. 2018.

OKOLSKI, A.; BÉZARD, J.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Maturation of oocytes from normal and atretic equine ovarian follicles as affected by steroid concentrations. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.l.], v. 44, p. 385-392, jan. 1991.

OKOLSKI, A.; SLONINA, D.; BANASINSKA, K. In vitro maturation of equine oocytes in co-culture with granulosa and theca interna cells. **Equine Veterinary Journal**, [S.l.], v. 25, n. 15, p. 84-86, out. 1993.

PALHARES, R. C. F. T.; GONZAGA, D. R. N. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides aplicada à reprodução equina. **Revista V&Z Em Minas**, Belo Horizonte, n. 142, jul./ago./set. 2019.

PURCELL, S. H.; SEIDEL, G. E.; McCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Aspiration of oocytes from transitional, cycling, and pregnant mares. **Animal Reproduction Science**, [Fort Collins], v. 100, p. 291-300, 2007.

RUA, M. A. S.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; JÚNIOR, A. B.; VEGA, H. O.; RIBEIRO, M. S. Aspiração folicular, maturação in vitro e injeção intracitoplasmática em éguas. **Pubvet**, Londrina, v.10, n.3, p.248-256, mar. 2016.

SHABPAREH, V.; SQUIRES, E. L.; SEIDOL, G. E.; JASKO, D. J. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. **Theriogenology**, Fort Collins, v. 40, p. 1161-1175, set. 1993.

SMITS, K.; GOVAERE, J.; HOOGEWIJS, M.; SCHAUWER, C. De; VAN HAESBROUCK, E.; VAN POUCKE, M.; PEELMAN, L. J., VAN DEN BERG, M.; VULLERS, T.; VAN SOOM, A. Birth of the first ICSI foal in the Benelux. **VlaamsDiergeneeskundigTijdschrift**, [S.l.], v. 79, p. 134-138, 2010.

SPACEK, S. G.; CARNEVALE, E. M. Impact of Equine and Bovine Oocyte Maturation in Follicular Fluid From Young and Old Mares on Embryo Production in Vitro. **Journal of Equine Veterinary Science**, Colorado, v. 68, 2018, p. 94-100, abr. 2018.

SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, Fort Collins, v. 12, n. 1, p. 31-45, abr. 1996.

SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Fort Collins, v. 51, p. 91-104, 1999.

STOUT, T. A. E. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S.l.], v. 89, p. 103011, jun. 2020.

STOUT, T. A. E. Clinical insights: Assisted reproductive Technologies. **Equine Veterinary Journal**, [S.l.], v. 51, n. 4, p. 427-428, jun. 2019.

TREMOLEDA, J. L.; STOUT, T. A. E.; 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. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 69, p. 1895-1906, jul. 2003.

TROUNSON, A, GUNNL, L., LACHAM-KAPLAN, O. LEWIS, I., MACKINNON, A, PEURA, T., SHAW, J. Manipulation of development: opportunites for animal breeding. Gametes: development and function. **Serono Symposia**, Sydney, p. 485-98, 1998.

VALENZUELA, O. A.; COUTURIER-TARRADE, A.; CHOI, Y.; AUBRIERE, M.; RITTHALER, J.; CHAVATTE-PALMER, P.; HINRINCHS, K. Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection

(ICSI) with in vitro culture and embryo transfer) on placenta and foal morphometry and placental gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 371-379, jan. 2020.

VELEZ, I. C.; ARNOLD, C.; JACOBSON, C. C.; NORRIS, J. D.; CHOI, Y. H.; EDWARDS, J. F.; HAYDEN, S. S. Effects of repeated transvaginal aspiration of immature follicles on mare health and ovarian status. **Equine Veterinary Journal**, [S.l.], v. 44, n.S43, p. 78-83, nov. 2012.

WILLIS, P.; FAYRER-HOSKEN, R. A.; CAUDLE, A. B. Effect of sérum on in vitro maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, [S.l.], v. 33, n. 1, p. 345, jan. 1990.