

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

VICTOR MAIA MOELLMANN

INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE (ICSI) EM
EQUINOS: PROCEDIMENTOS E ATUALIZAÇÕES

Botucatu
2025

VICTOR MAIA MOELLMANN

**INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE (ICSI) EM
EQUINOS: PROCEDIMENTOS E ATUALIZAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade "Júlio de Mesquita Filho",
Câmpus de Botucatu, SP, para obtenção
do grau de Médico Veterinário

Área de Concentração: Reprodução

Preceptor: Profa. Assistente Dra. Fernanda
Saules Ignácio

Coordenador de Estágios: Profa. Dra.
Camila Michele Appolinário

**Botucatu
2025**

M693i Moellmann, Victor Maia
Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) em equinos : procedimentos e atualizações / Victor Maia Moellmann. -- Botucatu, 2025
19 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientadora: Fernanda Saules Ignácio

1. Reprodução. 2. ICSI. 3. Embrião. 4. Oócito. 5. Equino. I. Título.

VICTOR MAIA MOELLMANN

**INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE (ICSI) EM
EQUINOS: PROCEDIMENTOS E ATUALIZAÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de Médico Veterinário

Área de Concentração: Reprodução

Data da defesa: 11/11/2025

Banca Examinadora:

Dra. Fernanda Saules Ignácio
UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus da cidade de Botucatu

Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus da cidade de Botucatu

Renata Oliveira Barreto
UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus da cidade de Botucatu

RESUMO

O uso de biotecnologias reprodutivas tem aumentado consideravelmente, especialmente em equinos. Técnicas como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) são amplamente utilizadas, mas a fertilização *in vitro* (FIV) apresenta resultados limitados nesta espécie. Nesse cenário, a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI) consolidou-se como a principal alternativa para a produção *in vitro* de embriões equinos, destacando-se por sua eficácia em superar barreiras reprodutivas e ampliar o aproveitamento genético de animais de alto valor zootécnico. A ICSI consiste na injeção de um espermatozoide diretamente no citoplasma de um oócito maduro, sendo indicada principalmente para éguas subférteis e para uso de sêmen de garanhões com baixa qualidade espermática ou baixa disponibilidade de sêmen. Além disso, tem sido também aplicada em animais férteis, permitindo maior eficiência reprodutiva e aproveitamento genético. O procedimento envolve diversas etapas: recuperação e filtração, rastreamento e transporte de oócitos, maturação oocitária, processamento seminal, injeção intracitoplasmática de espermatozoide e cultivo embrionário. A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom é a principal técnica para recuperação de oócitos de animais vivos. O sêmen pode ser fresco, refrigerado ou criopreservado, sendo este último o mais utilizado. A injeção pode ser realizada pela técnica convencional ou *Piezo ICSI*, que tende a formar blastocistos de maior qualidade. Após a manipulação, os embriões são cultivados por 7-10 dias até atingirem o estágio adequado para transferência ou vitrificação. Conclui-se que a ICSI representa um avanço fundamental para a reprodução equina, viabilizando a produção de embriões *in vitro* e permitindo maior aproveitamento do potencial genético de animais de interesse.

Palavras-chave: Reprodução. ICSI. Embrião. Oócito. Equino.

ABSTRACT

The use of reproductive biotechnologies has increased considerably, especially in horses. Techniques such as artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) are widely used, but in vitro fertilization (IVF) has limited results in this species. In this scenario, Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) has established itself as the main alternative for in vitro production of equine embryos, standing out for its effectiveness in overcoming reproductive barriers and expanding the genetic use of animals of high zootechnical value. ICSI consists of injecting a sperm directly into the cytoplasm of a mature oocyte and is mainly indicated for subfertile mares and for the use of semen from stallions with low sperm quality or low semen availability. In addition, it has also been applied to fertile animals, allowing for greater reproductive efficiency and genetic utilization. The procedure involves several steps: recovery and filtration, screening and transport of oocytes, oocyte maturation, semen processing, intracytoplasmic sperm injection, and embryo culture. Ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration is the main technique for oocyte retrieval from live animals. The semen can be fresh, refrigerated, or cryopreserved, the latter being the most commonly used. The injection can be performed using the conventional technique or *Piezo* ICSI, which tends to form higher quality blastocysts. After manipulation, the embryos are cultured for 7-10 days until they reach the appropriate stage for transfer or vitrification. It is concluded that ICSI represents a fundamental advance for equine reproduction, enabling the production of in vitro embryos and allowing greater use of the genetic potential of animals of interest.

Keywords: Reproduction. ICSI. Embryo. Oocyte. Equine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	DESENVOLVIMENTO	9
2.1	Definição e indicação	9
2.2	Etapas da ICSI	9
2.2.1	Recuperação oocitária	9
2.2.2	Filtração, rastreamento e transporte de oócitos	10
2.2.3	Maturação oocitária	11
2.2.4	Processamento seminal	12
2.2.5	ICSI	13
2.2.6	Cultivo embrionário	14
3	CONCLUSÃO	16
	REFERÊNCIAS	17

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos cinquenta anos, o uso de biotecnologias reprodutivas, especialmente das técnicas de reprodução assistida (TRAs), tem crescido consideravelmente em animais de produção, incluindo a indústria equina (Squires, 2020). Dentre as biotecnologias mais difundidas, destacam-se a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), amplamente aplicadas na rotina reprodutiva da espécie. No entanto, outras técnicas, como a fertilização *in vitro* (FIV) e a transferência nuclear de células somáticas, apesar de promissoras, apresentam resultados muito limitados em equinos, sobretudo quando comparada aos obtidos em outras espécies domésticas (Fedorka et al., 2025; Squires, 2020).

Diante das limitações observadas nas abordagens tradicionais de FIV em equinos, que resultaram em baixas taxas de desenvolvimento embrionário e pouquíssimos nascimentos viáveis, torna-se necessário o desenvolvimento e a adoção de métodos alternativos capazes de superar esses entraves e ampliar as possibilidades reprodutivas na espécie. Nesse contexto, a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) destaca-se como uma técnica avançada e altamente promissora, especialmente pela sua eficácia na superação de barreiras reprodutivas e no aproveitamento do potencial genético de animais de alto valor zootécnico (De Oliveira et al., 2024); (Squires, 2020).

A ICSI tem se consolidado como a principal estratégia de fertilização assistida na reprodução equina, especialmente em razão das restrições técnicas associadas à FIV convencional. A técnica permite a produção de embriões viáveis mesmo em situações de subfertilidade, como éguas com histórico de falhas reprodutivas ou em garanhões com sêmen de baixa qualidade, contagem espermática reduzida, idade avançada ou mesmo já falecidos, desde que haja disponibilidade de sêmen congelado, ainda que em quantidade limitada (Squires, 2020).

Além de representar uma alternativa viável para casos de subfertilidade, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) por meio da ICSI tem ganhado espaço também na reprodução de animais férteis, sobretudo aqueles de elevado valor genético. Nesses casos, a técnica permite maior eficiência reprodutiva e melhor aproveitamento genético, possibilitando a obtenção de múltiplos embriões por ciclo com menor intervenção reprodutiva, em comparação à TE convencional (Luis-Calero et al., 2025).

Diante da crescente aplicação da ICSI na reprodução animal, especialmente na equinocultura, este estudo tem como objetivo revisar o processo técnico da injeção intracitoplasmática de espermatozoide em equinos, bem como elucidar alguns desafios enfrentados durante sua execução.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Definição e indicação

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide é uma técnica de produção *in vitro* de embriões que consiste na introdução de um espermatozoide no citoplasma de um oócito maduro. Atualmente, por ser o único meio amplamente utilizado para produzir embriões equinos *in vitro*, a ICSI vem se popularizando cada vez mais (Hinrichs et al., 2025), sendo indicada principalmente para éguas subférteis que não produzem embriões através da inseminação artificial e para a utilização de sêmen de garanhões com baixa qualidade espermática ou com baixa disponibilidade de sêmen. Entretanto, com a popularização da técnica, animais de alto valor zootécnico e sem alteração de fertilidade também passaram a ser submetidos à ICSI para maior aproveitamento genético (Rader; Choi; Hinrichs, 2016).

2.2 Etapas da ICSI

2.2.1 Recuperação oocitária

Como a ICSI consiste na injeção de um espermatozoide no interior de um oócito, primeiramente é necessário obter oócitos de uma égua. Existem duas técnicas para recuperação de oócitos, uma aplicada em animais após o óbito quando os ovários são levados para o laboratório e realiza-se a curetagem dos folículos, e outra aplicada aos animais vivos. A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom é o procedimento adotado para este fim, sendo realizado mais comumente do seguinte modo: o animal é sedado e, por meio da palpação transretal, o veterinário aspirador mantém o ovário tracionado em direção caudal e ventral a fim de mantê-lo próximo à parede da vagina. Com a outra mão, uma guia de aspiração folicular é manipulada e introduzida no interior do canal vaginal. Em seu interior, a guia possui um mandril que se conecta à agulha de aspiração folicular e é utilizado para controlá-la, além de um

transdutor convexo de ultrassom e um orifício para saída da agulha localizados em sua extremidade. Desse modo, o aspirador maneja a guia a fim de formar imagens do ovário por meio do transdutor e, quando o folículo está alinhado com orifício de saída da agulha, o mandril é movimentado e a agulha perfura o fundo de vagina, o estroma ovariano e adentra o interior do folículo (Jacobson et al., 2010).

A agulha de aspiração folicular se conecta a duas sondas: uma delas é conectada a um frasco de vidro que se liga a uma bomba à vácuo e a outra é conectada a uma seringa que se liga a uma bolsa com meio específico aquecido e com adição de heparina. Uma vez no interior do folículo, a diferença de pressão formada pela bomba à vácuo faz com que o líquido intrafolicular seja aspirado para dentro do frasco de vidro. É recomendado que a pressão exercida pela bomba seja de cerca de 145 mm Hg (Jacobson et al., 2010). Para que os complexos *cumulus oophorus* (CCO) sejam efetivamente recuperados, é recomendado que o mandril seja rotacionado diversas vezes no interior do folículo a fim de que a agulha escarifique a parede folicular. Concomitantemente a isso, por meio da seringa acoplada à bolsa com meio e também à sonda, que se liga à agulha, são realizadas infusões de meio com heparina a fim de facilitar a recuperação oocitária. Esse processo é repetido com diversos folículos dos dois ovários para que o maior número possível de CCO's sejam recuperados (Walbornn et al., 2022).

2.2.2 FILTRAÇÃO, RASTREAMENTO E TRANSPORTE DE OÓCITOS

Após a aspiração folicular, é necessário procurar pelos CCO's em todo o conteúdo presente no frasco. Para isso, primeiramente deve-se filtrar o líquido aspirado, processo realizado por meio do despejamento do conteúdo do frasco e de meio em um filtro, podendo ser utilizado um filtro de coleta de embrião. Para evitar danos aos oócitos, é importante evitar que o copo do filtro fique sem líquido durante o processo. Posteriormente, o conteúdo filtrado é despejado em uma placa de Petri e o rastreamento dos CCO's é realizado, buscando-os com o auxílio de uma lupa. Os CCO's são lavados em meio específico, podendo ser utilizados meios *holding* convencionais de embrião, e transferidos para um tubo atóxico e não pirogênico, como tubos de vidro borossilicato, onde podem ser armazenados no mesmo meio *holding*

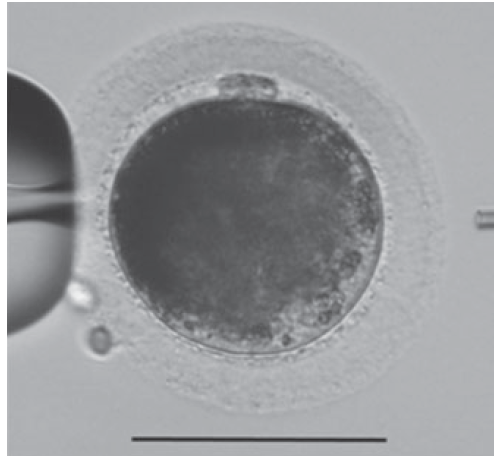
utilizado anteriormente. A transportadora de oócitos é utilizada para armazenar os tubos até a chegada no laboratório, mantendo-os a 22 °C (Diaw et al., 2018).

2.2.3 MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O processo de maturação oocitária é caracterizado principalmente pela retomada da meiose. *In vivo*, esse processo ocorre somente quando a ovulação está próxima. Portanto, a maioria dos oócitos provenientes de aspiração folicular ainda não estão maduros, visto que são aspirados folículos em diversas fases e tamanhos, majoritariamente folículos não dominantes com oócitos estacionados em prófase 1. *In vitro*, a maturação oocitária ocorre com os CCO's imersos em meios específicos, como o meio M199 com sais de Earle (Invitrogen) suplementado com 25 µg/mL de gentamicina, 5 mU/mL de FSH e 10% soro fetal bovino (SFB), imersos em óleo mineral. Além disso, a fim de que as condições gasosas, de temperatura e de pressão ideais para o desenvolvimento sejam atingidas, os CCO's são mantidos em incubadoras por cerca de 24-28 horas a 38,2 °C e 5% de CO₂ no ar (Salgado et al., 2018).

Os oócitos que maturam adequadamente passam a apresentar as células do *cumulus oophorus* expandidas, sendo necessário retirá-las, processo chamado de desnudamento do oócito. Isso pode ser feito por meio de manipulação com pipetas em meio M199 com sais de Hank (Invitrogen) contendo 10% SFB e hialuronidase, sendo possível observar o primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico dos oócitos maduros (Figura 1), o que indica que o oócito está em metáfase 2 e pronto para a ICSI (Brom-de-Luna et al., 2021).

Figura 1: Oócito com morfologia normal com um corpúsculo polar em 12h



Adaptado de Carnevale & Metcalf, 2019.

2.2.4 PROCESSAMENTO SEMINAL

Em relação ao sêmen para ICSI, pode-se ser utilizado tanto sêmen fresco quanto refrigerado ou criopreservado. Entretanto, como uma das mais fortes recomendações para ICSI é a baixa disponibilidade de sêmen do garanhão desejado para cruzamento, o sêmen criopreservado é o predominantemente utilizado, também devido ao fácil armazenamento, transporte e à vantagem de poder ser descongelado e utilizado em qualquer momento (Ramírez-Agámez et al., 2023). Choi et al. (2002) demonstrou que não há diferenças significativas na produção embrionária por ICSI utilizando sêmen fresco ou criopreservado.

Cada sessão de ICSI em múltiplos oócitos exige cerca de apenas 0,5-2 milhões de espermatozoides. Assim, é comum que uma pequena parte (5-7 mm) de uma palheta com concentração padrão (200×10^6 espermatozoides/mL) seja cortada ainda submersa em nitrogênio líquido, processo chamado de ICSI *cut*, utilizando-se somente os espermatozoides dessa fração da palheta para realizar as ICSI's. A fim de aumentar o aproveitamento do uso do sêmen, é possível formar palhetas com concentração de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/mL a partir do descongelamento de uma palheta convencional e a diluição de todo o seu conteúdo em 1:100. Desse modo, cerca de 100 palhetas com concentração de $1-2 \times 10^6$ espermatozoides/mL (ICSI *dose*) são envazadas e re congeladas a partir de uma única palheta convencional de 200×10^6 espermatozoides/MI (Hernández-Avilés; Ramírez-Agámez; Love, 2025). Neste último caso, o uso de extensores que apresentam baixa concentração de

componentes de ovo, leite e glicerol proporciona taxas de clivagem e formação de blastocisto numericamente maiores em comparação com extensores que possuem altas concentrações desses componentes, sendo também recomendado o uso de extensores sem amido para o congelamento (Brito et al., 2025).

Uma técnica comum utilizada para selecionar os espermatozoides para ICSI é o chamado *swin-up*. Para realizá-la, o sêmen deve entrar em contato com um meio específico, podendo ser utilizado o meio GMOPS (Vitrolife) com 10% SFB. No caso do ICSI *cut*, o sêmen presente na pequena fração da palheta é descongelado no próprio GMOPS. Após isso, o tubo contendo sêmen e meio deve permanecer a 37,5 °C e inclinado em ângulo de 45° por cerca de 25 minutos. Assim, os espermatozoides com maior motilidade tendem a migrar para a parte superior do tubo e são retirados, tendendo a resultar em uma amostra com maior concentração de espermatozoides móveis (Medica et al., 2025). Essa amostra é centrifugada a 400 x g por 5 minutos, o sobrenadante é retirado e é adicionado 1 mL de GMOPS + 10% SFB ao *pellet* formado no fundo do tubo, ocorrendo novamente centrifugação nas mesmas configurações citadas e remoção do sobrenadante. Após isso, 25 uL de GMOPS + 10% SFB é adicionado ao *pellet*. Para facilitar a captura dos espermatozoides, a amostra pode ser misturada a meio 7% PVP (SAGE™) (Hernández-Avilés; Ramírez-Agámez; Love, 2025).

2.2.5 ICSI

Após a maturação dos oócitos e o processamento seminal, as ICSI's podem ser realizadas. Para isso, um microscópio invertido com contraste de fases equipado com micromanipuladores deve ser utilizado. Os micromanipuladores atuam reduzindo a amplitude dos comandos do embriologista, fazendo com que os movimentos sejam mais precisos para manipular os espermatozoides e oócitos. Micropipetas de vidro de cerca de 4 micrometros de diâmetro interno são utilizadas capturar os espermatozoides e perfurar os oócitos (Salgado et al., 2018).

Os oócitos e espermatozoides são colocados em uma mesma placa de micromanipulação. Os oócitos ficam imersos em gotas com meio contendo M199 com sais de Hank e 10% SFB, enquanto que os espermatozoides ficam imersos em mistura de meios já citada (Salgado et al., 2018). É recomendado a seleção de

espermatozoides móveis, visto que espermatozoides imóveis tendem a não gerar blastocistos (Claes; Stout, 2022). Entretanto, o uso de espermatozoides com gota citoplasmática proximal ou cauda dobrada não afeta a produção de blastocistos (Ramírez-Agámez et al., 2023).

O espermatozoide selecionado para a ICSI é pressionado pela cauda contra o fundo da placa de micromanipulação, sendo imobilizado e aspirado pela cauda até o interior da micropipeta de injeção. Utilizando a técnica convencional de ICSI, após a captura do espermatozoide, este deve ser deslocado até próximo à extremidade da micropipeta de injeção, com esta sendo utilizada para perfurar a zona pelúcida e membrana plasmática do oócito e injetar o espermatozoide no interior do citoplasma. A técnica *Piezo* ICSI é semelhante a convencional, porém, a micropipeta injetora possui ponta romba e é ligada ao aparelho *Piezo drill*, responsável por exercer vibrações elétricas para imobilizar o espermatozoide, romper a zona pelúcida e penetrar a membrana plasmática do oócito. Apesar das taxas de formação de blastocisto serem semelhantes em ambas as técnicas, em comparação com a técnica convencional de ICSI, a técnica *Piezo* tende a formar blastocistos de maior qualidade devido a maior velocidade com que alguns eventos ocorrem, como a perda do acrossoma, o início da descondensação da cromatina espermática e a retomada da meiose pelo oócito, o que sugere uma ruptura mais eficiente da membrana plasmática do espermatozoide e maior velocidade na liberação de fatores espermáticos (Salgado et al., 2018).

2.2.6 CULTIVO EMBRIONÁRIO

Após a ICSI, o oócito deve permanecer em meios e condições específicas para que as clivagens ocorram e o embrião possa se desenvolver adequadamente. Para isso, logo após a injeção, os oócitos podem passar por um período chamado de *holding* pós-injeção, permanecendo em meio contendo M199, sais de Earle e 10% SFB. A esse meio podem ser adicionados outros componentes, como gentamicina (25 µg/mL), além de também poder ficar imerso em óleo mineral. Nesta etapa, os oócitos são mantidos em incubadoras a 38,2 °C e 5% CO₂ por cerca de 30-60 minutos. É importante ressaltar que alguns laboratórios não utilizam esta etapa inicial, visto que

a exclusão dessa etapa não exerce influência significativa na taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial (Brom-de-Luna et al., 2021).

A fecundação e desenvolvimento embrionário inicial ocorrem na tuba uterina (Prestes; Landim-Alvarenga, 2017), portanto, os meios utilizados para a próxima etapa de cultivo embrionário são compostos principalmente por substâncias presentes no fluido do oviduto, como glicose, lactato e piruvato (González-Fernández et al., 2020), além de íons como cálcio e magnésio (Morbeck et al., 2014). O meio *Global* (LifeGlobal) é um meio comercial utilizado em biotécnicas da reprodução humana que também é comumente utilizado nesta etapa, com a suplementação de 10% SFB. Nesta fase, as maiores taxas de formação de blastocisto estão presentes quando a temperatura é mantida a 38,2 °C e a concentração de CO₂, O₂ e N₂ é de, respectivamente, 6,5%, 5% e 88,5% (Brom-de-Luna et al., 2019).

O primeiro indício concreto de desenvolvimento do embrião após a ICSI é a clivagem, caracterizada pela divisão mitótica da única célula presente no zigoto, formando duas células chamadas de blastômeros. Em oócitos maturados *in vivo* e submetidos à ICSI, a clivagem normalmente ocorre até 24 horas após a ICSI. Porém, o tempo em que a primeira clivagem ocorre a partir de oócitos maturados *in vitro* pode ser variável. Após 5 dias de cultivo embrionário, espera-se que o embrião tenha uma massa celular de 16 ou mais blastômeros, sendo este um bom indicativo de desenvolvimento embrionário. Conforme as divisões mitóticas ocorrem, cada blastômero passa a ter seu tamanho reduzido. No dia 5-6, já pode ser possível observar a formação de mórula compactada, caracterizada por 32 ou mais células formando uma massa negra, sendo mais difícil discernir os bordos de cada célula (Carnevale; Metcalf, 2019).

A partir do dia 6-7 já pode ser possível observar um blastocisto inicial, havendo o início da formação da blastocela e do trofoblasto e uma menor densidade de células da camada interna. A partir dessa fase, as células tendem a pressionar a camada interna da zona pelúcida, sendo possível observar uma diminuição da sua espessura e um aumento no diâmetro do embrião. A extrusão de células por meio do orifício formado pela perfuração da zona pelúcida no momento da ICSI é comum. É importante ressaltar que os parâmetros utilizados para avaliar o desenvolvimento embrionário pode variar de acordo com os diferentes métodos utilizados por cada laboratório (Carnevale; Metcalf, 2019).

A retirada do embrião da incubadora e sua manipulação podem gerar um stress ao embrião. Portanto, é recomendado que a avaliação do desenvolvimento embrionário seja controlada a fim de prejudicar o mínimo possível o embrião (Carnevale; Metcalf, 2019). Como padrão, no quinto dia após a ICSI, os embriões são avaliados e os oócitos que não clivaram são descartados. Além disso, em condições normais, a passagem do embrião equino da tuba uterina para o útero ocorre 5 dias após a ovulação (Prestes; Landim-Alvarenga, 2017). Portanto, a fim de mimetizar as condições que o embrião teria *in vivo* e atender às diferentes exigências desta fase (Gardner, 1998), é recomendado que os embriões passem para um meio mais específico no quinto dia após a ICSI, como o meio DMEM/F-12 (Sigma #D6421), com a adição de 10% SFB, 2.5 mM glicil-L-glutamina, 5.5 mEq/L NaOH e 25 µg/mL gentamicina. (Brom-de-Luna et al., 2021).

Do sétimo ao décimo dia após ICSI, os embriões são avaliados quanto à formação de blastocisto (Brom-de-Luna et al., 2021). Os embriões que atingiram o estágio de desenvolvimento e qualidade desejados podem ser transferidos para uma receptora ou vitrificados para posterior transferência de embrião. Em estudos realizados com amostras significativas, as taxas de prenhez nas primeiras semanas após a transferência de embrião desvitrificado variaram em torno de 62-77% e as taxas de nascimento variam em torno de 50%, sendo que as maiores taxas de prenhez e nascimento foram obtidas a partir de receptoras que receberam embrião 4 dias após a ovulação (Claes et al., 2020; Claes; Stout, 2022; Lazzari et al., 2020). Ademais, a transferência de embriões que atingem o estágio de blastocisto em D7-D8 tende a resultar em maiores taxas de prenhez em comparação com embriões que se desenvolvem em blastocisto somente em D9 (Brom-de-Luna et al., 2019; Lazzari et al., 2020).

3 CONCLUSÃO

Em conclusão, a ICSI consolidou-se como a principal técnica de produção *in vitro* de embriões em equinos. Seu uso tem se mostrado eficaz não apenas em situações de subfertilidade, mas também em animais férteis e de alto valor zootécnico. Os procedimentos envolvendo a técnica são complexos e avanços metodológicos, como o uso da técnica *Piezo* ICSI e descobertas acerca de condições ideais para

cultura, têm contribuído para aumentar as taxas sucesso. Considerando sua relevância crescente na reprodução equina, a ICSI não apenas viabiliza a produção de embriões em casos antes inviáveis, como também se configura como ferramenta estratégica para o avanço genético da espécie. Dessa forma, a técnica se mostra uma importante biotecnologia reprodutiva, contribuindo para maior eficiência reprodutiva dos animais de interesse.

REFERÊNCIAS

- BRITO, Leonardo F. C. *et al.* Effect of refreezing extender on stallion sperm quality and embryo production after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 231, p. 29–35, 2025.
- BROM-DE-LUNA, J. G. *et al.* Equine blastocyst production under different incubation temperatures and different CO₂ concentrations during early cleavage. **Reproduction, fertility, and development**, v. 31, n. 12, p. 1823–1829, 2019.
- BROM-DE-LUNA, Joao G. *et al.* Culture protocols for horse embryos after ICSI: Effect of myo-inositol and time of media change. **Animal reproduction science**, v. 233, n. 106819, 2021.
- CARNEVALE, Elaine M.; METCALF, Elizabeth S. Morphology, developmental stages and quality parameters of in vitro-produced equine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 31, n. 12, p. 1758–1770, 2019.
- CHOI, Y. H. *et al.* Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 455–465, 2002.
- CLAES, A. *et al.* Speed of in vitro embryo development affects the likelihood of foaling and the foal sex ratio. **Reproduction, fertility, and development**, v. 32, n. 5, p. 468–473, 2020.
- CLAES, A.; STOUT, T. A. E. Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. **Theriogenology**, v. 187, p. 215–218, 2022.
- DE OLIVEIRA, Rodrigo Arruda *et al.* Equine ICSI: an update on semen perspective. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 4, p. e20240015, 2024.
- DIAW, Mouhamadou *et al.* Effect of different shipping temperatures (~22 °C vs. ~7 °C) and holding media on blastocyst development after overnight holding of immature equine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 111, p. 62–68, 2018.
- FEDORKA, C. E. *et al.* Unveiling the equine placental transcriptome: A novel study on ICSI-derived pregnancies. **Theriogenology**, v. 237, p. 120–128, 2025.
- GARDNER, D. K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 83–102, 1998.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Lauro *et al.* Stage-specific metabolomic changes in equine oviductal fluid: New insights into the equine fertilization environment. **Theriogenology**, v. 143, p. 35–43, 2020.

HERNÁNDEZ-AVILÉS, Camilo; RAMÍREZ-AGÁMEZ, Luisa; LOVE, Charles C. The relationship between post-thaw sperm quality parameters and blastocyst production following Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) of in vitro-matured equine oocytes. **Theriogenology**, v. 244, n. 117500, 2025.

HINRICHS, Katrin *et al.* Complications associated with equine transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration: Practitioner survey and field results. **Journal of equine veterinary science**, v. 146, n. 105363, 2025.

JACOBSON, Candace C. *et al.* Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1116–1126, 2010.

LAZZARI, Giovanna *et al.* Laboratory production of equine embryos. **Journal of equine veterinary science**, v. 89, n. 103097, 2020.

LUIS-CALERO, M. *et al.* Follicular fluid secretome enhances the meiotic competence of in vitro matured equine oocytes, but not the developmental competence of zygotes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Animal reproduction science**, v. 279, n. 107946, 2025.

MEDICA, Ashlee *et al.* Advancements in microfluidic and electrophoretic techniques for stallion sperm isolation. **Reproduction, fertility, and development**, v. 37, n. 10, 2025.

MORBECK, Dean E. *et al.* Composition of commercial media used for human embryo culture. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 3, p. 759- 766, 2014.

PRESTES, Nereu Carlos; LANDIM-ALVARENGA, Fernanda da Cruz. **Obstetrícia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 236 p. ISBN 9788527730983.

RADER, Kindra; CHOI, Young-Ho; HINRICHS, Katrin. Intracytoplasmic sperm injection, embryo culture, and transfer of in vitro-produced blastocysts. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 32, n. 3, p. 401–413, 2016.

RAMÍREZ-AGÁMEZ, Luisa *et al.* Sperm factors associated with the production of equine blastocysts by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 195, p. 85–92, 2023.

SALGADO, R. M. *et al.* 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.

SQUIRES, Edward. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal of equine veterinary science**, v. 89, n. 102981, 2020.

WALBORN, Stephanie R. *et al.* Effect of day of estrus cycle at time of transvaginal follicle aspiration for oocyte recovery on rates of in vitro maturation and blastocyst

production after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 260, n. 13, p. 1683–1689, 2022.