

CENTRO UNIVERSITÁRIO CAMPO REAL
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANDRÉ LUIS SEQUINEL

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E ICSI NA
REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE EQUINOS**

GUARAPUAVA-PR

2025

ANDRÉ LUIS SEQUINEL

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E ICSI NA
REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE EQUINOS**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Medicina
Veterinária do Centro Universitário Campo
Real, como parte das exigências para a
conclusão do Curso de Graduação em
Medicina Veterinária.**

**Professora Orientadora: Robertha
Magnago Tosi**

GUARAPUAVA-PR

2025

TERMO DE APROVAÇÃO

Centro Universitário Campo Real
Curso de Medicina Veterinária
Relatório Final de Estágio Supervisionado
Área de estágio: Reprodução e Clínica Equina

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E ICSI NA
REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE EQUINOS**

Acadêmico: André Luis Sequinel
Orientadora: Robertha Magnago Tosi
Supervisor: Henrique Cusatis Novaes

O presente Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado e aprovado com nota _____(__,__) para obtenção de grau no Curso de Medicina Veterinária, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^(a) Orientador(a): Robertha Magnago Tosi

Prof.(a):

Prof.(a):

Dezembro de 2025
Guarapuava- PR

*Dedico este trabalho à memória do meu querido amigo **Enio Mansani de Freitas**,
que teve um papel especial em minha vida.
Sua amizade, alegria e apoio marcaram profundamente minha caminhada, e mesmo
com sua partida, sua lembrança permanece viva em meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pela força e pela sabedoria concedida para superar os desafios desta caminhada.

Aos meus pais, Renilson Sequinel e Lúcia Sequinel, pelo amor, paciência e apoio incondicional em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Felipe Sequinel e Eduardo Sequinel pelo apoio constante, incentivo e por estarem sempre presentes, oferecendo força e companheirismo nos momentos mais desafiadores.

Agradeço, de forma muito especial, à minha namorada, Nicolý Tossin, por ser minha maior inspiração e companheira em todos os momentos desta caminhada. Sua dedicação, força e coragem sempre me mostraram que nenhum desafio é grande demais quando se tem ao lado alguém que acredita em você. Nos dias difíceis, foi o seu apoio, o seu amor e as suas palavras que me deram forças para continuar. Admiro profundamente a mulher incrível que você é determinada, inteligente e de coração imenso. Este trabalho é também fruto do seu incentivo constante, da sua paciência e da sua presença em cada etapa. Obrigado por estar ao meu lado e por me fazer acreditar que juntos somos capazes de tudo.

À minha orientadora, Robertha Magnago Tosi, pela dedicação, paciência e por compartilhar seus conhecimentos de forma tão generosa, contribuindo imensamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu supervisor de estágio extracurricular, Lucas Alves Pinheiro, e toda a equipe do Haras Relincho pela orientação, disponibilidade e por compartilhar seus conhecimentos com dedicação e profissionalismo, contribuindo de forma essencial para o meu aprendizado prático.

Aos meus supervisores de estágio final, Henrique Cusatis e Pâmella Marques, e toda a equipe da In Vitro Equinos, por todo o apoio e orientação ao longo do estágio. Seus conselhos e ensinamentos foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores e colegas de curso, pelo aprendizado, companheirismo e pelas experiências compartilhadas ao longo desta jornada.

A todos que, contribuíram para a realização deste trabalho, deixo o meu sincero agradecimento.

*“A compaixão e a curiosidade são as
duas rédeas que guiam a medicina
veterinária”*

Jonh Madigan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. In Vitro Equinos.....	13
Figura 2. Coleta de medula óssea para clonagem.	15
Figura 3. Parto normal de potro clone.....	15
Figura 4. Aspiração folicular (OPU).	16
Figura 5. Seleção de oócitos.	16
Figura 6. Ilustrações da anatomia do sistema reprodutor da fêmea equina. A. Vista dorsal do sistema reprodutor da fêmea equina e compartimentos. B. Estruturas do ovário equino, respectivamente..	23
Figura 7. Ilustração esquemática de como funciona o processo de fotoperíodo e captação de luz para o período de ciclicidade equina.	24
Figura 8. Ilustração esquemática do desenvolvimento folicular e da fase luteínica e concentração circulante dos principais hormônios reprodutivos durante o ciclo estral na fêmea equina.	25
Figura 9. As imagens ultrassonográficas representam o estado morfológico do útero da égua em diferentes fases do ciclo estral. A. Estro, corpo do útero com edema. B. Recrutamento folicular, ovário com presença de MFP. C. Folículo em Dominância, ovário com presença de ODF 35mm. D. Diestro, presença de corpo lúteo. E. Anestro, corpo do útero sem presença de edema ou tônus.....	27
Figura 10. A. Demonstração das técnicas de OPU (via ultrassom). B. ICSI (via microscópio), respectivamente.	28
Figura 11. Sugestão de preparo de doadora para realizar a técnica de OPU segundo (In Vitro Equinos, 2025).	32
Figura 12. Banho-maria seco.	33
Figura 13. Sistema bomba de vácuo.	34
Figura 14. A. Ilustração da guia. B. Haste. C. Agulha e equipo de duas vias, respectivamente.	35
Figura 15. Mesa para OPU completa.	35
Figura 16. Posicionamento correto da agulha no momento da OPU.	37
Figura 17. Pré e pós OPU, respectivamente.	37
Figura 18. Posicionamento correto aspirador e auxiliar.	37
Figura 19. A. Placa petri com meio. B. Oócitos. C. Transportadora de oócitos.....	39
Figura 20. A. Oócitos de boa qualidade. B. Oócitos de má qualidade.....	39
Figura 21. A. Injeção do espermatozoide. B. Embriões ICSI em D7 produzidos pela In Vitro Equinos, respectivamente.	41
Figura 22. A. Mesa completa do aspirador. B. Posicionamento da equipe e materiais.	43
Figura 23. A. Material utilizado no processo de seleção. B. Oócitos rastreados.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimentos reprodução e clínica equina, incluindo neonatologia no período de 01 de julho a 10 de novembro de 2025.	17
Tabela 2. Durante o procedimento, foram administrados os seguintes fármacos:	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CL - Corpo lúteo

D2 - Dia 2

D7 - Dia 7

D8 - Dia 8

DMPBS - Tampão fosfato salino modificado por Dulbecco

E2 - Estrógeno

eCG - Gonadotrofina coriônica equina

FSH - Hormônio folículo-estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IM – Intramuscular

IV - Intravenoso

LH - Hormônio luteinizante

mL - Mililitros

OPU - Ovum pick-up

P4 - Progesterona

PGF2 α - Prostaglandina

RFRP-3 - RFamide-related peptide-3

RESUMO

Este Trabalho de Conclusão de Curso tem como objetivo relatar as experiências e atividades técnicas realizadas entre 01 de julho a 10 de novembro de 2025 na empresa In Vitro Equinos, como parte do Estágio Curricular Supervisionado do Centro Universitário Campo Real. As práticas foram voltadas para as áreas de reprodução e clínica equina, com foco especial em neonatologia, sempre sob a orientação dos médicos-veterinários Henrique e Pâmella. O trabalho descreve as atividades executadas durante o estágio, uma apresentação institucional da In Vitro Equinos, a casuística acompanhada e uma revisão de literatura relacionada aos temas desenvolvidos. A reprodução equina está em constante crescimento, buscando novas técnicas para aprimorar a genética, o bem-estar animal e a conservação das linhagens. A empresa IN VITRO EQUINOS foi pioneira na introdução da técnica de ICSI no Brasil, que consiste na injeção de um espermatozoide dentro do oócito maduro. Essa técnica depende da aspiração folicular (OPU), realizada por via transvaginal e guiada por ultrassom, para obtenção dos oócitos utilizados na fertilização. Sendo assim, este trabalho tem o objetivo de realizar uma revisão bibliográfica sobre todos os aspectos da técnica de aspiração folicular, seus princípios de execução, aprimoramentos e importância dentro das biotecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: OPU. Reprodução equina. Biotecnologia.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO DA EMPRESA E PERÍODO DE ESTÁGIO	13
1.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	13
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO	14
2.1 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	14
2.2 CASUÍSTICA.....	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 INTRODUÇÃO	19
3.2 ANATOMIA E FIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA ÉGUA	21
3.2.1 Anatomia.....	21
3.2.2 Fisiologia.....	23
3.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR	27
3.3.1 História e progressão de métodos	28
3.3.2 Principais indicações para a realização da OPU para a ICSI	29
3.3.3 Controle e preparo das doadoras para a OPU	30
3.3.4 Técnica OPU	33
3.3.5 Seleção de oócitos.....	37
Qualidade dos oócitos.....	39
3.3.6 ICSI.....	40
4 RELATO DE CASO	42
5 DISCUSSÃO	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
7 REFERÊNCIA.....	49

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO

1 APRESENTAÇÃO DA EMPRESA E PERÍODO DE ESTÁGIO

1.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio Curricular foi realizado na In Vitro Equinos, durante o período de 01 de julho a 10 de novembro de 2025, com carga horária semanal de 63 horas, totalizando 400 horas obrigatórias.

A In Vitro Equinos foi fundada por Perla Fleury no ano de 2005 como In Vitro Brasil Clonagem Animal SA. Situado em Mogi Mirim-SP juntamente com a fazenda Canto Porto (Figura 1). Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira das 7h00min às 17h00min. O atendimento é feito na parte laboratorial e a campo, os serviços na parte laboratorial incluem ICSI, clonagem e biopsia, a campo é realizado serviços como aspiração folicular, transferência de embrião coleta de biopsia para clonagem e clínica neonatal de potros clones.

A neonatologia conta com dois médicos veterinários responsáveis, o médico veterinário Henrique Cusatis Novaes, formado pela FESB, especialista em neonatologia equina e supervisor de estágio, e a médica veterinária Pâmella Costa Marques mestranda da USP.

Figura 1. In Vitro Equinos.



Fonte: Autor (2025).

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

2.1 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

Durante o período de estágio realizado na In Vitro Equinos, foram acompanhadas as atividades na área de reprodução e clínica equina, incluindo neonatologia, sempre com a supervisão dos médicos veterinários, Henrique e Pâmella.

O estagiário participava do acompanhamento e auxílio em procedimentos como, coleta de medula óssea para clonagem equina (Figura 2), colaborando com a tricotomia, assepsia e bloqueio anestésico para realização da prática. O manejo do equino tanto nas coletas de medula quanto em quaisquer ocasiões as quais faziam necessárias a contenção física do paciente, era efetuada nos troncos de contenção para evitar possíveis lesões indesejadas ao animal e aos profissionais presentes. Outros manejos como auxiliar no casqueamento, limpeza de feridas, acesso venoso, coleta de sangue para análise laboratorial, rotina diária da alimentação, limpeza de baias, administração de medicamentos (via oral, intramuscular e endovenosa), realização de plantões e acompanhamento de parto (Figura 3), também eram instituídos no dia a dia do estagiário.

A ultrassonografia abdominal e transretal eram rotineiros, não só para o acompanhamento gestacional das éguas, mas também no controle de ciclicidade para a transferência de embrião de ICSI e identificação do momento ideal para a aspiração folicular. No procedimento OPU o ultrassom é utilizado como referência para observação dos folículos ovarianos permitindo assim a realização da aspiração folicular (Figura 4). Em seguida os oócitos coletados através da OPU vão para a filtragem e rastreio, e posteriormente são envasados em um meio a 22,5°C para bloquear a maturação e enviados ao laboratório (Figura 5).

Figura 2. Coleta de medula óssea para clonagem.



Fonte: Autor (2025).

Figura 3. Parto normal de potro clone.



Fonte: Autor (2025).

Figura 4. Aspiração folicular (OPU).



Fonte: Autor (2025).

Figura 5. Seleção de oócitos.



Fonte: Autor (2025).

2.2 CASUÍSTICA

Durante o período de 01 de julho a 10 de novembro de 2025 na In Vitro Equinos, foram acompanhados 2 partos, 4 cólicas, 25 casqueamentos, 15 manejos sanitários, 200 controles de receptoras, 110 controle de doadoras, 2 biópsias para clonagem, 50 ultrassonografias abdominais em éguas gestantes, e 150 aspiração folicular. Estes dados podem ser observados na (Tabela 1) abaixo:

Tabela 1. Procedimentos reprodução e clínica equina, incluindo neonatologia no período de 01 de julho a 10 de novembro de 2025.

Procedimentos realizados	N
Aspiração folicular	150
Biopsia para clonagem	2
Casqueamento	25
Cólica	4
Controle de doadora	110
Controle de receptora	200
Manejo sanitário	15
Partos	2
Ultrassonografia abdominal em éguas gestantes	50
TOTAL	558

Fonte: Autor (2025).

CAPÍTULO II – DESCRIÇÃO TEÓRICA
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E ICSI NA
REPRODUÇÃO ASSISTIDA DE EQUINOS

3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a reprodução equina está em ascensão, buscando novos métodos e técnicas para otimização da genética, bem-estar animal e conservação da linhagem do plantel. Os grandes investimentos na reprodução equina são justificáveis a partir de dados que evidenciam o gasto de bilhões de reais no setor da equinocultura nacional, assim como um plantel de 6 milhões de equinos e demonstrando participação superior a 40% na produção mundial de embriões (Mapa, 2016).

Esses números refletem o fortalecimento da equinocultura brasileira, que se consolidou como referência mundial na aplicação de biotecnologias reprodutivas. O avanço das técnicas de reprodução assistida tem possibilitado a seleção genética mais precisa, a multiplicação de indivíduos de alto valor zootécnico e a redução do intervalo entre gerações, fatores que impulsionam o melhoramento genético e aumentam a produtividade do setor.

Sendo a IN VITRO EQUINOS, responsável pela implementação da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) no Brasil, evidenciando o crescimento e avanço da reprodução equina no país (Cintra, 2021).

A ICSI é uma técnica de fertilização in vitro em que um único espermatozoide é injetado diretamente dentro do oócito maduro, permitindo a formação do embrião (Gomes, 2021). Para a obtenção dos oócitos da doadora desejada é necessário a realização da aspiração folicular (OPU) via transvaginal guiada por ultrassom e sob sedação, utilizando agulha e sistema de vácuo para coletar os oócitos do fluido folicular. Apresentando vantagens como a possibilidade de recuperação de oócitos provenientes de folículos pequenos e médios, não apenas daqueles dominantes, e podendo ser executada em diferentes fases do ciclo estral. Essas características aumentam a eficiência do procedimento e o aproveitamento das éguas doadoras, otimizando o número de oócitos coletados e o potencial de produção embrionária.

Em seguida, é realizada a filtragem do fluido folicular e efetuada a seleção desses oócitos, assim isolando e classificando os oócitos conforme a morfologia, antes da ICSI. Sendo assim, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide só é possível a partir da técnica de aspiração folicular (Gomes, 2021). Isso porque a OPU

é o ponto inicial e indispensável do processo de produção in vitro de embriões, sendo responsável pela recuperação dos oócitos que serão utilizados na fertilização. Sem a coleta folicular adequada, não há substrato biológico viável para a execução da ICSI. Essa técnica garante a obtenção de oócitos de qualidade, em estágios adequados de desenvolvimento e maturação, permitindo que sejam posteriormente selecionados e manipulados em laboratório. Além disso, a eficiência da OPU influencia diretamente as taxas de sucesso da ICSI, uma vez que a quantidade e a qualidade dos oócitos coletados determinam o potencial de formação embrionária. Dessa forma, pode-se afirmar que a OPU representa a base fundamental para que a ICSI ocorra de forma eficaz, integrando-se como etapa inicial e determinante no processo de reprodução assistida em equinos (Gomes, 2021).

Nos princípios da OPU, vacas e éguas eram aspiradas e coletadas a partir de procedimentos invasivos como colpotomia, laparotomia ou através do flanco guiada por ultrassom, procedimentos inviáveis por serem invasivos com alto risco de complicações, além do tempo e custo elevados. Em éguas o método de aspiração transcutânea foi o que permitiu a aspiração folicular com a égua em estação, realizada através da palpação retal, posicionando o ovário em direção ao flanco, sendo inicialmente relatada em 1987 (Cintra, 2021). Após isso, desenvolveu-se a técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom, inicialmente aplicada em procedimentos de fertilização in vitro de mulheres, após um ano Pieterse e Kappen adaptaram a técnica para o uso em bovinos, em que no início dos anos 90 começou a ser empregada em éguas e desde então os métodos vem se aprimorando.

A partir disso, o objetivo deste Trabalho de Conclusão de Curso é compreender os avanços na reprodução equina, com foco na técnica de aspiração folicular (OPU), seus princípios de execução, aprimoramentos e importância dentro das biotecnologias reprodutivas. Descrevendo qual método era utilizado para a realização dela, e quais foram suas evoluções pensando na praticidade econômica, temporal e no bem-estar animal, como é executada nos dias de hoje, quais os instrumentos e materiais necessários, momento ideal para a aspiração da égua, entre outras características para executar o procedimento corretamente, e assim alcançar o máximo potencial reprodutivo possível com a OPU.

3.2 ANATOMIA E FISIOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA ÉGUA

É de grande importância saber a anatomia e fisiologia reprodutiva da égua para executar adequadamente qualquer procedimento no âmbito da reprodução equina (Luz *et al.*, 2024). Faz parte do sistema reprodutor das fêmeas: Vestíbulo da vagina, vagina, cérvix, útero e tubas uterinas, e ovários (Dyce *et al.*, 2017).

3.2.1 Anatomia

A vulva está posicionada na porção caudal da vagina, contendo os lábios vulvares em contato direto com o meio externo da égua. Os dois lábios vulvares se encontram em uma comissura dorsal e ventral, onde circundam a abertura vulvar verticalmente. O clitóris está ventral a vulva, em que no momento do estro, o clitóris é exposto pela movimentação dos lábios vulvares (Luz *et al.*, 2024).

A vagina se encontra cranial à vulva, situada em posição mediana no interior da cavidade pélvica entre a porção ventral do reto e a dorsal da vesícula urinária. Tem comprimento de aproximadamente 20 a 25 cm e paredes finas. Sua extremidade caudal é marcada por uma prega transversal e proeminente, a qual, em sua grande maioria, se posiciona sobre o orifício uretral. Em éguas jovens essa estrutura dá origem ao hímen, que tem como função proteger a entrada da vagina (Sisson; Grossman, 2018).

Já a cérvix, tem sua porção caudal que se encontra projetada no lúmen vaginal, iniciando no óstio uterino externo até o óstio uterino interno, que se liga ao corpo do útero, porção cranial. Essa estrutura é responsável por grande produção de muco e pela abertura ou fechamento do óstio (Luz *et al.*, 2024).

O muco cervical apresenta variações em sua composição conforme a fase do ciclo estral, durante a fase luteína, torna-se mais espesso, desempenhando o papel de selar o lúmen cervical e impedir a penetração de microrganismos, funcionando como uma barreira protetora contra infecções (Thompson *et al.*, 2020). No estro, sob influência do estrogênio, a cérvix encontra-se completamente relaxada, suas dobras se projetam além do orifício uterino externo e as secreções cervicais tornam-se abundantes e fluidas, favorecendo a ascensão dos espermatozoides. Durante a

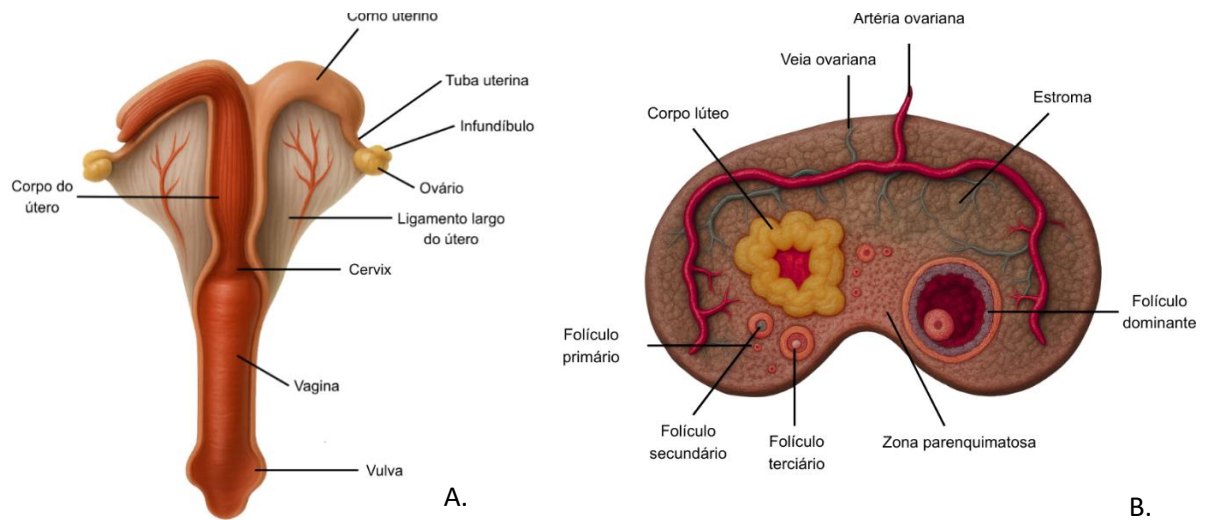
gestação, a cérvix adquire maior rigidez e o canal cervical é ocluído pela formação de um tampão mucoso, que garante isolamento e proteção do ambiente uterino, em que o momento do parto, as fibras musculares, colágenas, elásticas e lisas da cérvix promovem ampla dilatação, permitindo a passagem do potro pelo canal do parto (Luz *et al.*, 2024).

A estrutura uterina (Figura 6A), se encontra na cavidade abdominal, acima da massa intestinal, dividida na parte caudal, que consiste na porção denominada corpo do útero, e parte cranial, representada pelos dois cornos uterinos. Suas características são influenciadas pela fase do ciclo estral (Dyce *et al.*, 2017).

Durante o estro, a vascularidade e a proliferação de glândulas aumentam e estão associadas à visualização de edema pela ultrassonografia, já no diestro a um aumento do tônus e diminuição de edema, evidenciando os sinais da ovulação. E em éguas gestantes há o aumento de volume do corpo e cornos uterinos (Mckinnon; Voss, 2011). Ao final dos dois cornos uterinos se encontram as tubas uterinas, sendo o óstio uterino o local de contato entre essas duas estruturas, tendo como principal função auxiliar na capacitação e fertilização do oócito, assim como no transporte do embrião em direção ao útero (Thompson *et al.*, 2020). Após a ovulação, a região da tuba uterina mais proximal ao ovário tem o nome de infundíbulo e é a porção fundamental para captação do oócito. Uma vez captado no infundíbulo, o oócito é transportado até a região intermediária da tuba uterina, denominada ampola. Nessa região, ocorre a fertilização após o encontro com os espermatozoides, e o zigoto/embrião permanece durante alguns dias até ser transportado para o istmo, que é a região mais estreita e contorcida da tuba. O óstio uterino permite a passagem do embrião para dentro do corno uterino (Luz *et al.*, 2024).

Os ovários são as estruturas mais craniais do sistema reprodutor da égua (Figura 6B), suas posições variam de acordo com a fêmea, o órgão é dividido entre zona vascular (mais externa) e zona parenquimatosa (mais interna), onde ficam os folículos e corpo lúteo (CL) (Dyce *et al.*, 2017).

Figura 6. Ilustrações da anatomia do sistema reprodutor da fêmea equina. **A.** Vista dorsal do sistema reprodutor da fêmea equina e compartimentos. **B.** Estruturas do ovário equino, respectivamente.



Fonte: Luz (2024).

3.2.2 Fisiologia

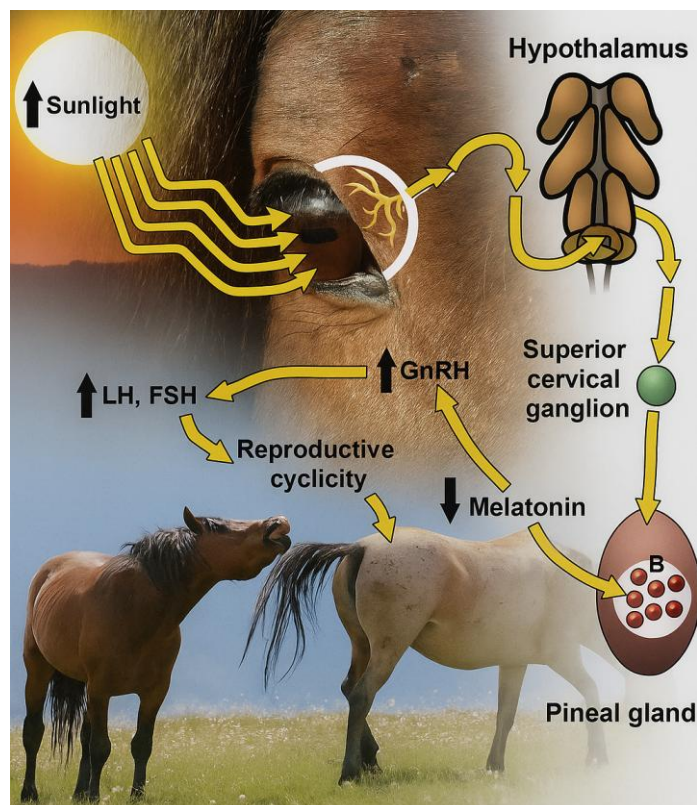
As éguas são classificadas como poliéstrica estacional/sazonal de dias longos, ou seja, elas ciclam no período de maior luminosidade do ano. Essa regra é variável de acordo com a nutrição, genética e localização (próximo da linha do equador, onde os dias são padronizados durante todo o ano) (Luz *et al.*, 2024).

O primeiro passo para dar início à sinalização do fotoperíodo é a captação de luz pela retina. Em um menor fotoperíodo (outono-inverno), ocorre maior síntese de melatonina, enquanto com o aumento do fotoperíodo (primavera-verão) ocorre menor síntese de melatonina, promovendo estímulo para o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e desencadeando o início do ciclo reprodutivo da fêmea equina (Coelho *et al.*, 2023; Pannu, 2018). A melatonina age por meio dos interneurônios (a kisspeptina, que tem ação estimulatória, e o peptídeo RFRP-3 que tem ação inibitória) para regular o padrão de liberação de GnRH pelo hipotálamo (Simonneaux *et al.*, 2013; Mcgrath *et al.*, 2024).

Assim quando há um aumento do fotoperíodo (Figura 7), há menor concentração de melatonina circulante, resultando em maior liberação de kisspeptina e menor liberação de RFRP-3 para agir nos neurônios de GnRH. Dessa forma, ocorre maior liberação de GnRH pelo hipotálamo e conseqüentemente após isso o estímulo na hipófise anterior para secretar hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio

luteinizante (LH), e por fim estimular o desenvolvimento folicular e a ciclicidade reprodutiva da fêmea equina nas estações de maior fotoperíodo. Por outro lado, com maior concentração circulante de melatonina devido à redução do fotoperíodo nas estações de outono e inverno há estímulo nos neurônios de RFRP-3 e consequente inibição na secreção dos neurônios de GnRH, que resulta em menor estímulo para o desenvolvimento folicular (Luz *et al.*, 2024).

Figura 7. Ilustração esquemática de como funciona o processo de fotoperíodo e captação de luz para o período de ciclicidade equina.



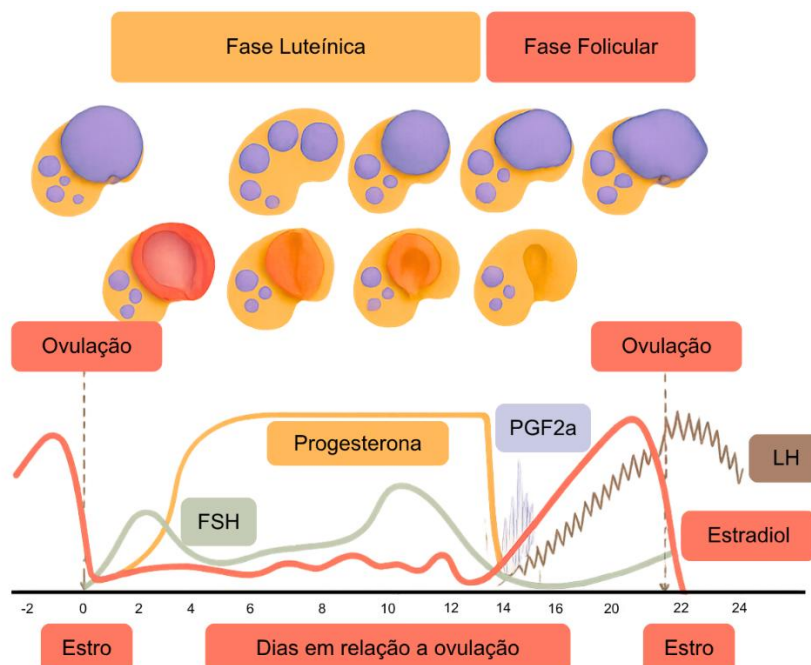
Fonte: Equinovet (2021).

Sabemos que a ciclicidade reprodutiva das éguas está diretamente relacionada ao fotoperíodo estacional, ou seja, a variação da luminosidade ao longo do ano. A partir desse entendimento, é fundamental compreender como ocorre a fisiologia da égua cíclica em relação as fases do seu ciclo estral, uma vez que cada etapa é caracterizada por alterações hormonais e comportamentais específicas que determinam os procedimentos realizados na reprodução equina (Luz *et al.*, 2024).

O ciclo estral equino é uma cadeia de eventos comportamentais, anatômicos e endócrinos que preparam a fêmea para a ovulação, dura em média 21 dias (variação normal entre 19-23 dias) e é dividido em duas fases: fase folicular (ou estrogênica) e fase luteínica (ou progesterônica) (Pimentel *et al.*, 2014).

A fase folicular dura em média de 4 a 7 dias e é caracterizada pela presença do folículo dominante em desenvolvimento e em atividade secretória, após a regressão do corpo lúteo. Com a luteólise ocorre o aumento de excreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante, iniciando assim os primeiros sinais de receptividade sexual da fêmea, ou seja, os níveis de estradiol estão aumentando enquanto os níveis de progesterona estão diminuindo (Figura 8) (Luz *et al.*, 2024). Já na fase luteínica ocorre ao contrário, os níveis de progesterona estão aumentando, enquanto os níveis de estradiol diminuem. É a etapa que ocorre o desenvolvimento do corpo lúteo (CL), e mudança do comportamento da fêmea equina, não estando está receptiva ao macho e à cópula, acontece em um período de aproximadamente 13 ou 14 dias (Pimentel *et al.*, 2014).

Figura 8. Ilustração esquemática do desenvolvimento folicular e da fase luteínica e concentração circulante dos principais hormônios reprodutivos durante o ciclo estral na fêmea equina.



Fonte: Luz (2024).

O anestro é o período de inatividade ovariana (Figura 9E), com baixos níveis séricos de P4 e outros hormônios, perda do tônus uterino e atrofia gonadal. O

chamado anestro verdadeiro ocorre, na maioria das éguas, durante os meses de outono e inverno por conta do fotoperíodo diminuído, quando há redução na secreção de GnRH pelo hipotálamo e consequente queda na liberação de FSH e LH pela hipófise anterior. Essa redução hormonal resulta na interrupção da atividade cíclica. Também existem outros fatores que podem levar uma égua ao anestro, sendo eles: após um prolongamento espontâneo do corpo lúteo, após a luteólise de um corpo lúteo regular e após atresia folicular (Pimentel *et al.*, 2014).

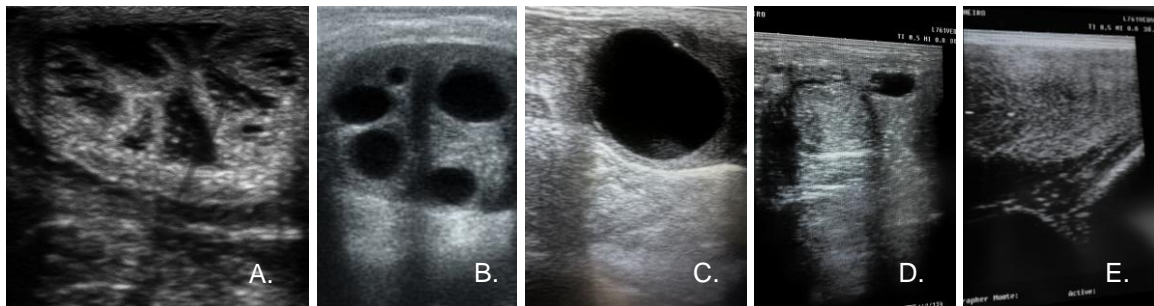
O estro corresponde à fase em que a égua manifesta o cio, ou seja, torna-se receptiva ao garanhão. Durante essa fase, os folículos dominantes (Figura 9C) secretam elevadas quantidades de estrógeno (E2), hormônio responsável pelo comportamento de cio e pela estimulação do edema uterino (Figura 9A) (Pimentel *et al.*, 2014). A elevada concentração de estrógenos promove modificações no trato reprodutivo, como o desenvolvimento do edema endometrial, preparando o útero para a chegada do embrião. Nessa fase, a cérvix encontra-se relaxada e aberta, permitindo a eliminação de secreções e resíduos intrauterinos (Sertich, 2021). O edema uterino, visível por ultrassonografia, é considerado um marcador confiável de estro e está diretamente associado à receptividade sexual da égua (Dunkel *et al.*, 2016).

O diestro corresponde à fase que se inicia após a ovulação (Figura 9D), quando o folículo dominante sofre luteinização, transformando-se em corpo lúteo (CL). A partir desse momento, cessa a produção de estrógeno e inicia-se a secreção de progesterona, o principal hormônio responsável pela manutenção da gestação e pela supressão de novos ciclos ovulatórios (Luz *et al.*, 2024). Durante essa fase, a progesterona exerce efeitos significativos sobre o útero, promovendo a tonicidade e o fechamento da cérvix, além de reduzir a atividade contrátil uterina, criando um ambiente adequado para a fixação e o desenvolvimento do embrião (Sertich, 2021). O endométrio apresenta menor edema e secreta substâncias nutritivas essenciais ao embrião inicial, como proteínas e glicoproteínas uterinas, que favorecem a sobrevivência embrionária precoce. Caso não ocorra a fecundação, o útero libera prostaglandina F₂α (PGF₂α), que promove a luteólise (regressão do corpo lúteo), resultando na queda dos níveis de progesterona e permitindo o início de um novo ciclo estral (Pimentel *et al.*, 2014).

Como citado anteriormente, cada etapa do ciclo estral da égua é caracterizada por alterações fisiológicas e anatômicas que só são possíveis através da ação de

hormônios. O principal hormônio regulatório é o GnRH, produzido pelo hipotálamo, que estimula a hipófise a liberar o hormônio folículo-estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). O FSH promove o crescimento dos folículos ovarianos (Figura 9B), enquanto o LH atua na maturação final e na luteinização, formando o corpo lúteo (Hafez, 2016). O estradiol, secretado pelo folículo dominante, é responsável pelas alterações fisiológicas do útero, como o edema uterino e o relaxamento do colo uterino, sinais que caracterizam o cio (Mc Cue, 2021). Após a ovulação, o corpo lúteo passa a liberar progesterona, hormônio essencial para a manutenção da gestação (Evans; Madill, 2019).

Figura 9. As imagens ultrassonográficas representam o estado morfológico do útero da égua em diferentes fases do ciclo estral. **A.** Estro, corpo do útero com edema. **B.** Recrutamento folicular, ovário com presença de MFP. **C.** Folículo em Dominância, ovário com presença de ODF 35mm. **D.** Diestro, presença de corpo lúteo. **E.** Anestro, corpo do útero sem presença de edema ou tônus.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

3.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

A técnica de aspiração folicular (OPU), é um procedimento amplamente utilizado na reprodução equina, permitindo a coleta de oócitos diretamente dos folículos ovarianos para posterior manipulação in vitro (Figura 10A). O sucesso da OPU está intimamente relacionado à escolha adequada da doadora, momento mais favorável dentro do ciclo estral, condição corporal equilibrada e características genéticas desejáveis. O controle e preparo da doadora incluem avaliações clínicas e reprodutivas, além de protocolos hormonais que favorecem o desenvolvimento folicular e otimizam a recuperação dos oócitos (In Vitro Equinos, 2025).

Durante a realização da técnica, utiliza-se o ultrassom via transvaginal acoplado a um sistema de aspiração, que possibilita a coleta segura e eficiente dos

folículos ovarianos. A partir disso os oócitos aspirados são submetidos à injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), técnica que consiste na introdução direta do espermatozoide no citoplasma do oócito (Figura 10B), aumentando as taxas de fertilização e o potencial de desenvolvimento embrionário (Gomes, 2021).

Figura 10. A. Demonstração das técnicas de OPU (via ultrassom). B. ICSI (via microscópio), respectivamente.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

3.3.1 História e progressão de métodos

A princípio, a técnica de aspiração folicular só era possível por meio de procedimentos cirúrgicos, como a laparotomia e a colpotomia, que permitiam o acesso direto aos ovários para a recuperação dos oócitos (Gomes, 2021). O método descrito por Vogelsang *et al.* (1988), foi pioneiro ao demonstrar que a coleta de oócitos poderia ser realizada sem intervenção cirúrgica, representando um avanço importante para o campo da reprodução equina.

A proposta consistia na coleta de oócitos não cirúrgica com agulha e seringa (*Nonsurgical Oocyte Collection With a Needle and Syringe*), considerada a primeira abordagem realmente minimamente invasiva para essa finalidade. Na prática, o procedimento era realizado da seguinte forma: o operador introduzia o braço no reto da égua para posicionar manualmente o ovário contra a parede vaginal, de modo que este ficasse o mais próximo possível dela (Vogelsang *et al.*, 1988).

Com o ovário estabilizado nessa posição, uma agulha longa e estéril era introduzida pela vagina, perfurando sua parede e atingindo o folículo localizado no ovário. Em seguida, o fluido folicular era aspirado manualmente com uma seringa acoplada à agulha, com o objetivo de recuperar o oócito (Vogelsang *et al.*, 1988).

Ou seja, o acesso era transvaginal, porém guiado apenas por palpação retal, sem auxílio de ultrassonografia, o que limitava o controle visual e comprometia a eficiência do método (Vogelsang *et al.*, 1988). Apesar de relativamente arriscado e pouco eficiente, o estudo teve grande importância histórica, pois representou a transição entre as técnicas cirúrgicas tradicionais (laparotomia e colpotomia) e as abordagens não cirúrgicas guiadas por imagem, como a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU), amplamente utilizada na atualidade.

3.3.2 Principais indicações para a realização da OPU para a ICSI

A técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) é indicada em diversas situações tanto para garanhões quanto para éguas que apresentam limitações reprodutivas. Seu uso é recomendado em garanhões com baixa motilidade ou viabilidade espermática, nos quais a fertilização por métodos convencionais, como a inseminação artificial, torna-se ineficiente (Galli, 2016). Também é amplamente empregada em garanhões cujo sêmen é considerado raro, de alta qualidade genética ou de elevado valor comercial, sendo uma alternativa viável para otimizar o aproveitamento de doses limitadas disponíveis no mercado (In Vitro Equinos, 2025).

No caso das éguas, a ICSI é indicada para aquelas que desenvolvem ondas foliculares, mas não chegam a ovular, impossibilitando a coleta de embriões em programas convencionais. Além disso, é aplicada em éguas doadoras que não respondem satisfatoriamente aos protocolos de coleta de embriões devido a alterações uterinas, ovidutais ou cervicais, comprometendo a passagem e o desenvolvimento embrionário (Stout *et al.*, 2020).

Outro uso relevante é o aproveitamento de embriões vitrificados (congelados), que podem ser armazenados para comercialização, utilização em leilões ou como ferramenta para melhor aproveitamento de receptoras disponíveis, assim contribuindo

para o avanço genético e a eficiência reprodutiva dos plantéis equinos (In Vitro Equinos, 2025).

A partir disso, Galli (2016); In Vitro Equinos (2025) e Stout *et al.*, (2020), descrevem que as principais indicações para a realização da técnica são:

- Femêas: Problemas crônicos de fertilidade, útero, cérvix, oviduto, falhas de ovulação, idade e Óbito.
- Machos: Garanhões subférteis, baixa produção espermática, sêmen raro ou de alto valor, sêmen com quantidade limitada de doses.

3.3.3 Controle e preparo das doadoras para a OPU

O controle folicular efetivo e antecipado das doadoras que serão aspiradas, influencia diretamente nos resultados da OPU. O manejo prévio deve contemplar o controle hormonal, nutricional e sanitário, além de estratégias que assegurem a estabilidade fisiológica e o bem-estar do animal durante o procedimento. Segundo McKinnon e Squires (2011), a eficiência na recuperação de oócitos está diretamente relacionada à condição reprodutiva da doadora, sendo essencial um protocolo de preparação individualizado conforme o status folicular e a estação do ano (Figura 11).

O monitoramento folicular é realizado através da avaliação clínica do ciclo estral e principalmente pelo exame ultrassonográfico transretal, que possibilita identificar o número, tamanho e grau de desenvolvimento dos folículos, proporcionando os parâmetros fundamentais para dar início aos protocolos hormonais (Ginther, 1992).

Em éguas com atividade ovariana irregular ou em transição sazonal, a administração de tratamentos hormonais é frequentemente utilizada para sincronizar e induzir o crescimento folicular. O uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG), hormônio folículo-estimulante (FSH) ou gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem sido relatado como eficaz na estimulação do crescimento e maturação folicular (Ginther, 1992).

Em protocolos mais controlados, combina-se FSH com doses de hCG para induzir a ovulação ou o desenvolvimento de folículos dominantes aptos à

aspiração. Em casos que não se tem um controle folicular, indica-se a aplicação de 1ml de Prostaglandina 5 dias antes da aspiração (In Vitro Equinos, 2025).

Durante o preparo, também é comum empregar tratamentos hormonais moduladores, como a progesterona ou o acetato de altrenogest, que atuam no controle do ciclo estral e na supressão da ovulação espontânea. Segundo (Samper, 2009), a utilização do altrenogest por períodos de 8 a 10 dias, seguida da administração de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), permite sincronizar o crescimento folicular e programar a aspiração com maior previsibilidade. Tal manejo otimiza a recuperação de oócitos imaturos de boa qualidade, ideais para a maturação in vitro.

A suplementação nutricional exerce papel complementar essencial na resposta ovariana e na qualidade oocitária. A oferta equilibrada de energia, proteína e minerais, especialmente selênio, zinco e vitamina E, está relacionada à melhoria na competência citoplasmática e na integridade da membrana oocitária. Além disso, ácidos graxos essenciais ômega-3 e antioxidantes naturais contribuem para a redução do estresse oxidativo, fator que compromete a maturação e o desenvolvimento embrionário (Melem, 2024).

A manutenção do escore corporal entre 5 e 6 (na escala de Henneke) é indicada para doadoras submetidas a protocolos intensivos de aspiração folicular, uma vez que a condição corporal abaixo ou acima do ideal reduz a resposta hormonal e compromete a recuperação folicular (Leenders, 2023).

Outro aspecto relevante é o jejum prévio à aspiração folicular, como o procedimento requer contenção física e sedação profunda, é recomendável manter a égua em jejum alimentar de 12 horas antes do início, visando reduzir o risco de refluxo e cólica durante a manipulação (In Vitro Equinos, 2025). Durante o jejum, deve-se garantir um ambiente tranquilo, livre de estresse e com temperatura adequada, para minimizar a liberação de cortisol, hormônio que pode interferir na dinâmica folicular e na qualidade oocitária (Aurich *et al.*, 2003).

O monitoramento reprodutivo contínuo é fundamental tanto antes quanto após a aspiração, permitindo avaliar a recuperação dos ovários e planejar novos ciclos de coleta. Em geral, o intervalo entre aspirações varia de 20 a 25 dias, dependendo da resposta individual da égua e da condição dos folículos remanescentes. Estudos recentes demonstram que a frequência de coletas pode ser mantida sem prejuízo à

função ovariana quando o manejo é adequado e os protocolos hormonais são corretamente ajustados (Cuervo-Arango *et al.*, 2025).

A partir disso, o sucesso na aspiração folicular depende de um preparo multifatorial da égua doadora (Figura 11), englobando o equilíbrio hormonal, a nutrição adequada, o controle ultrassonográfico e o manejo cuidadoso antes do procedimento. A adoção de protocolos individualizados, baseados em evidências científicas, aumenta significativamente a eficiência na recuperação de oócitos viáveis e contribui para melhores resultados nas técnicas reprodutivas, como a ICSI e a produção *in vitro* de embriões (In Vitro Equinos, 2025).

Figura 11. Sugestão de preparo de doadora para realizar a técnica de OPU segundo (In Vitro Equinos, 2025).



Fonte: In Vitro Equinos (2025).

3.3.4 Técnica OPU

A técnica de OPU (Ovum pick-up), como já descrito antes, consiste na aspiração folicular de oócitos. Atualmente o método mais aceito e utilizado é por meio transvaginal guiado por ultrassom acoplado com probe micro-convexa de 5mhz (Cuervo-Arango *et al.*, 2025).

Inicialmente é necessário realizar o preparo dos equipamentos e do ambiente destinados ao procedimento. Deve-se efetuar a limpeza antecipada do local de aspiração utilizando água e detergente neutro, seguida da higienização da mesa e de todo o material que será utilizado, empregando álcool 70% para garantir a desinfecção adequada. É indispensável o uso de pano de campo esterilizado, assegurando condições assépticas durante o procedimento. Após a higienização, os equipamentos devem ser organizados sobre a mesa de forma prática e acessível, facilitando o manuseio e a execução eficiente da técnica (Le Breton *et al.*, 2024).

Fazem parte dos equipamentos necessários para a montagem da mesa e realização da OPU os seguintes materiais:

- Banho maria seco

É utilizado como meio para manter a temperatura ideal de 37,5°C. O equipamento tem a função de estabilizar a temperatura da garrafa onde o líquido folicular aspirado é armazenado, além de preservar o DMPBS (Tampão fosfato Salino modificado por dulbecco) + heparina, que age na lavagem do folículo e sendo responsável pelo turbilhão para a recuperação do oócito, na mesma condição térmica (Figura 12) (Cuervo-Arango *et al.*, 2025).

Figura 12. Banho-maria seco.



Fonte: Novatecnica (2025).

- Bomba de vácuo

Como o próprio nome indica, a bomba é responsável por gerar o vácuo dentro da garrafa a partir de uma mangueira de silicone que conecta ambos (Figura 13). Essa garrafa está acoplada a um equipo que se estende até a ponta da agulha, correspondendo a uma das vias do sistema. A segunda via da agulha é utilizada para a injeção do DMPBS (Tampão fosfato Salino modificado por dulbecco) no antro do folículo, sendo esse fluido responsável por produzir o turbilhão que auxilia na liberação do oócito. Já a via conectada ao vácuo realiza a aspiração do líquido folicular, conduzindo-o para dentro da garrafa de coleta, a partir de uma pressão que vai de 130 a 150mmg (Cuervo-Arango *et al.*, 2025).

Figura 13. Sistema bomba de vácuo.



Fonte: WTAvet (2025).

- Guia, Haste e Equipo de duas vias

A guia é responsável por acoplar a probe micro-convexa, que realiza a transmissão das imagens dos folículos ovarianos por via transvaginal. Além disso, a guia permite o encaixe da haste, na qual é rosqueada a agulha, que é conectada ao equipo de duas vias (Figura 14). A haste é responsável pela escarificação, que é realizada para facilitar o descolamento do oócito da parede do folículo. Esse conjunto possibilita a aspiração e o direcionamento do fluido folicular até a garrafa de coleta, que permanece imersa no banho-maria seco. (Le Breton *et al.*, 2024).

Figura 14. A. Ilustração da guia. B. Haste. C. Agulha e equipo de duas vias, respectivamente.



Fonte: WTAvet (2025).

Segundo In Vitro Equinos, nessa etapa de preparação dos equipamentos, com a mesa já montada, devem ser checados alguns passos importantes (figura 15):

- US com boa imagem + probe micro-convexa 5mhz
- Checar sempre o ponto de saída da agulha
- Teste de todo o equipamento antes de se iniciar o procedimento
- Checar a temperatura do banho-maria seco
- Calibragem das Bombas

Figura 15. Mesa para OPU completa.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2020).

- Sedação

A sedação deve ser realizada com o objetivo de reduzir a dor e manter o animal imóvel durante o procedimento. Recomenda-se que a égua permaneça em jejum por 12 horas antes da sedação (Doherty, 2008).

O protocolo pode incluir a administração dos seguintes fármacos: Detomidina (0,015–0,02 mg/kg), Buscopan® (Butilbrometo de escopolamina e Dipirona sódica) (0,2 mg/kg), Butorfanol (0,015–0,02 mg/kg), Maxicam 2%® (meloxicam) (0,6 mg/kg) e Excede® (ceftiofur cristalino livre) (6,6 mg/kg) (Viana, 2019). É importante avaliar individualmente a necessidade do uso de acepromazina em cada égua. Nos casos em que houver histórico de reação à detomidina, recomenda-se substituir por Xilazina 10% (Viana, 2019).

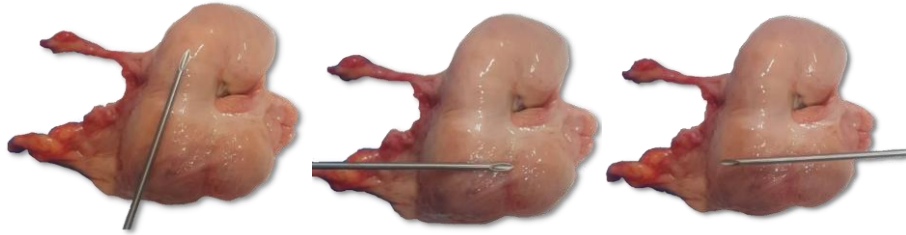
- Descrição do procedimento

Com a égua devidamente sedada, e com a mesa de procedimento e os equipamentos checados, organizados e prontos, inicia-se o processo de aspiração folicular. O médico-veterinário realiza a palpação retal, posicionando o ovário de forma adequada e, com o auxílio da guia, acessa-o por via transvaginal (Vogelsang *et al.*, 1988; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2022).

O sistema de vácuo é então acionado quando a agulha se encontra posicionada no local exato onde o folículo será aspirado (Figura 16), procedimento que é monitorado em tempo real por meio da imagem ultrassonográfica. Simultaneamente, ocorre a escarificação do folículo e a injeção de DMPBS, favorecendo a liberação do conteúdo folicular (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2022).

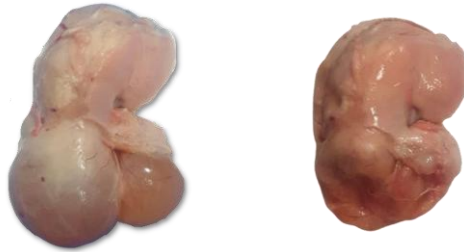
Esse processo é repetido em todos os folículos com diâmetro superior a 10 mm, podendo uma nova aspiração ser realizada aproximadamente 21 dias após o procedimento anterior (Figura 17) (Leenders, 2023; Cuervo-Arango *et al.*, 2025). É importante lembrar do posicionamento correto do técnico aspirador e seu auxiliar na realização de todo o período do procedimento para que não ocorra possíveis lesões indesejada (Figura 18) (Ortega-Ferrusola *et al.*, 2022).

Figura 16. Posicionamento correto da agulha no momento da OPU.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

Figura 17. Pré e pós OPU, respectivamente.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

Figura 18. Posicionamento correto aspirador e auxiliar.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

3.3.5 Seleção de oócitos

Segundo In Vitro Equinos (2025), dentre os materiais utilizados para realizar a seleção dos oócitos coletados através da aspiração folicular estão:

- Filtro coletor de embrião
- Placa petri
- Lupa

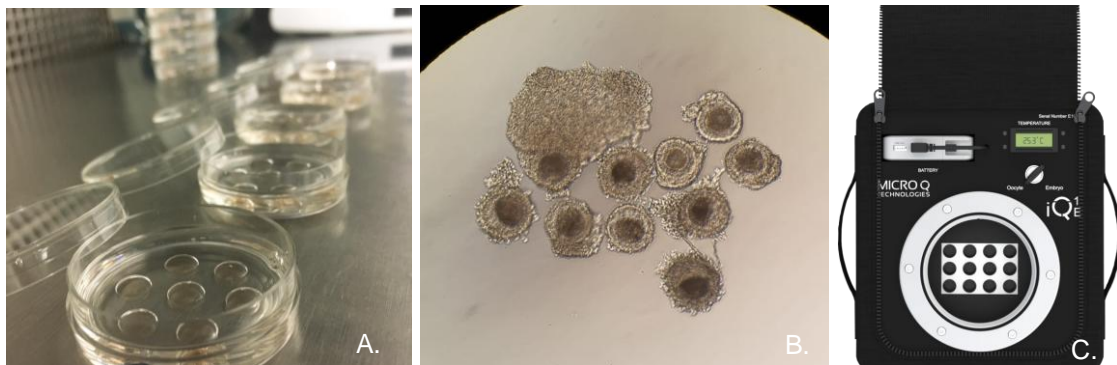
- Micropipeta 10 ul
- Micropipeta 100 ul
- Transportadora de oócitos
- Termômetro digital
- Banho maria molhado
- Garrafa 500ml
- Luvas de procedimento (sem pó)
- Álcool 70
- Pano de campo
- Agulha 40/12
- Seringa de 24ml (sem êmbolo)
- Parafilm
- Meios de lavagem e transporte
- DMPBS
- Heparina

Para iniciar a filtração, utiliza-se um filtro coletor de embrião. Vira a garrafa com o líquido resultante da aspiração dentro do filtro, e o conteúdo é cuidadosamente filtrado. Em seguida, a garrafa é lavada três vezes com DMPBS sem heparina, e cada lavagem é novamente filtrada. O material retido no filtro é transferido para uma placa petri, que é levada até a lupa para o rastreamento dos oócitos. Em outra placa Petri, são preparadas duas gotas do meio enviado pelo laboratório uma utilizada para lubrificação da ponteira da micropipeta e a outra para o depósito dos oócitos rastreados (In Vitro Equinos, 2025).

Após garantir que todos os oócitos foram identificados e coletados, são preparadas quatro novas gotas do meio de lavagem. Os oócitos são passados sucessivamente por essas gotas para garantir a limpeza, sendo que a última gota corresponde à gota de envase (Figura 19A). Nessa etapa, os oócitos (Figura 19B) são transferidos para um tubo contendo novo meio, que é lacrado com Parafilm e mantido dentro da transportadora de oócitos (T.O.) a 22,5°C (Figura 19C), temperatura ideal para bloquear a maturação até a chegada ao laboratório (Leenders, 2023; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2022).

Todo o procedimento deve ocorrer em um ambiente controlado, devidamente limpo, sem incidência de luz direta e com temperatura estável, assegurando a integridade e viabilidade dos oócitos (Cuervo-Arango *et al.*, 2025).

Figura 19. A. Placa petri com meio. **B.** Oócitos. **C.** Transportadora de oócitos.

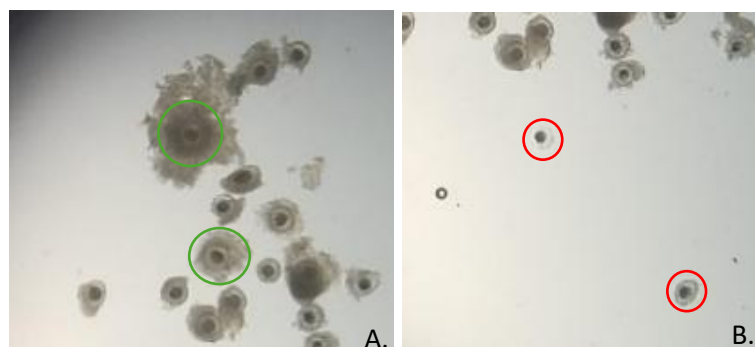


Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

- Qualidade dos oócitos

Nas éguas, a quantidade de oócitos é significativamente menor em comparação às vacas. Enquanto uma vaca produz, em média, 50 oócitos por aspiração, a égua apresenta uma média de apenas 8 oócitos. Devido a essa quantidade reduzida, no campo não é realizada a seleção dos oócitos por qualidade, sendo feito apenas o rastreamento da placa e o envio de todos os oócitos coletados para o laboratório. No laboratório, entretanto, ocorre a classificação dos oócitos. Um oócito de boa qualidade (Figura 20A) apresenta morfologia íntegra, citoplasma homogêneo, cúmulus bem formado e ausência de sinais de degeneração, possuindo alto potencial para fecundação e desenvolvimento embrionário. Já um oócito de má qualidade (Figura 20B) em éguas apresenta citoplasma irregular, células do cúmulus desorganizadas ou ausentes e sinais de degeneração, como escurecimento, o que compromete sua viabilidade e potencial de fecundação (Manica, 2021).

Figura 20. A. Oócitos de boa qualidade. **B.** Oócitos de má qualidade.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

3.3.6 ICSI

Segundo In Vitro equinos (2025) a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI) é uma técnica desenvolvida e aplicada comercialmente em equinos para produção de embriões *in vitro* de éguas e/ou garanhões geneticamente superiores, onde um único espermatozoide é injetado no interior de cada oócito. Sendo que a taxa de conversão para embriões de ICSI é de 22% (In Vitro Equinos, 2025).

Logo após a aspiração folicular, o oócito é levado ao laboratório, onde fica em um ambiente com temperatura controlada e sem luz, até o dia seguinte. No dia seguinte a OPU, os oócitos são lavados e colocados em uma placa de Petri contendo um meio específico de maturação rico em nutrientes. Essa placa é então levada para uma incubadora com ambiente controlado, que simula o ambiente uterino da égua (Hinrichs; Choi, 2021).

No segundo dia após aspiração (D2), os oócitos passam por um processo de desnudação, sendo colocados em um meio com ácido hialuronidase (Cremonesi *et al.*, 2020). Por meio mecânico, utilizando uma agulha, esses oócitos são desnudados, ou seja, as células do cúmulus, que ficam ao redor do oócito, são retiradas, pois no momento da injeção elas atrapalham a realização da técnica. Durante o processo de desnudação, já é possível avaliar as características dos oócitos, verificando se estão degenerados, ou se apresentam ou não vesícula germinativa (Lazzari *et al.*, 2023).

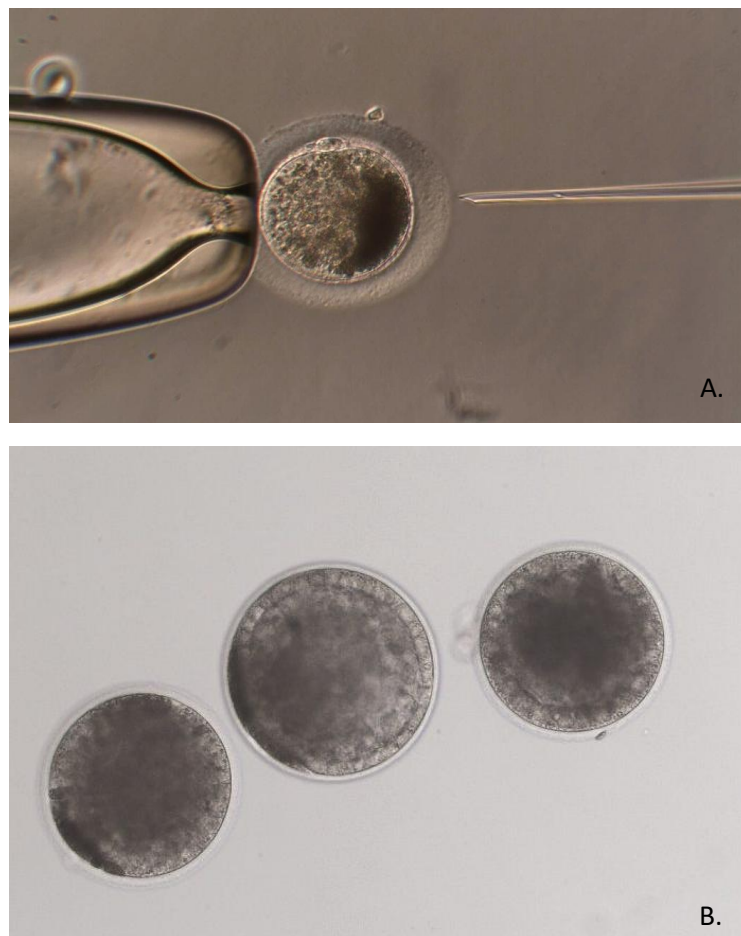
Com a desnudação e a pré-seleção dos oócitos concluídas, eles são transferidos para um meio germinativo, onde permanecem nesse meio e na incubadora até o momento da ICSI (Hinrichs; Choi, 2021). No procedimento de ICSI, os oócitos são novamente avaliados para identificar a presença da estrutura chamada corpo polar. Quando essa estrutura não é visualizada, significa que o oócito não está maturado e, portanto, é descartado (Galli *et al.*, 2020).

Ao identificar o corpo polar, o oócito é posicionado em sentido de 12 horas, pois abaixo dessa posição encontra-se o material genético do oócito. Essa orientação é essencial para evitar que a agulha, no momento da injeção do espermatozoide, perfure o material genético, o que causaria a morte do oócito (Hinrichs, 2022). Em que, nessa posição, o espermatozoide é injetado dentro do oócito (Figura 21A).

Após a injeção de todos os oócitos viáveis pós aspiração, eles são transferidos para a placa de cultivo e permanecem na incubadora até cinco dias após a injeção, período em que ocorre o processo de clivagem, ou seja, a divisão celular (que se assemelha a um “cachos de uva”). Os oócitos clivados são então retirados do meio em que estão e transferidos para um meio mais nutritivo até o sétimo dia pós-injeção, momento crucial para o desenvolvimento do embrião (Cremonesi *et al.*, 2020).

No sétimo dia, as placas são avaliadas para identificar os embriões desenvolvidos (Figura 21B), os quais são então vitrificados. Já as estruturas que não se desenvolveram até o D7 são mantidas em maturação até o D8 e avaliadas novamente para verificar se houve desenvolvimento adicional e formação de embriões, que também são vitrificados caso tenham se desenvolvido (Hinrichs & Choi, 2021; Lazzari *et al.*, 2023).

Figura 21. A. Injeção do espermatozoide. **B.** Embriões ICSI em D7 produzidos pela In Vitro Equinos, respectivamente.



Fonte: Arquivo In Vitro Equinos (2025).

4 RELATO DE CASO

No dia 09 de setembro de 2025, um dos médicos veterinários responsáveis pelo procedimento de aspiração folicular da empresa In Vitro Equinos, juntamente com sua equipe, realizou um atendimento de OPU em uma égua da raça Quarto de Milha, de idade não especificada, na fazenda do cliente em Itumbiara–GO.

A decisão de realizar a técnica nesta égua foi tomada em conjunto entre o proprietário e o médico veterinário, com base em critérios reprodutivos e no potencial genético do animal. A técnica foi indicada com o objetivo de maximizar a eficiência reprodutiva, especialmente em função da possibilidade de obtenção de múltiplos embriões a partir de uma única doadora. Sendo importante citar que a doadora passou por acompanhamento ultrassonográfico e com 5 dias antes da aspiração foi realizado o PGF2 α como no protocolo indicado pela In Vitro Equinos, anteriormente.

A preparação e separação dos materiais necessários para a realização da técnica foram realizadas previamente na sede da empresa. Ao chegar à fazenda, iniciou-se a montagem do laboratório de campo. O primeiro passo foi o aquecimento do meio DMPBS em banho-maria molhado a 37,5°C. Em seguida, organizou-se a bancada com pano de campo estéril e os seguintes materiais:

- Lupa com placa aquecedora a 29°C
- Placa aquecedora a 28°C
- Ponteiras P e M
- Micropipetas de 10 μ L e 100 μ L
- Placas petri

Os selecionadores também foram responsáveis pela montagem dos kits de aspiração, compostos por haste e agulha de 12G. Todo o processo foi realizado com uso de luvas de procedimento (sem pó) e álcool 70%, garantindo a assepsia do ambiente.

Simultaneamente, o técnico responsável pela aspiração organizou a mesa de OPU, contendo ultrassom, banho-maria seco, bomba de vácuo, guia de aspiração,

equipos e medicamentos, todos dispostos sobre campo estéril, ao lado do tronco de contenção (Figura 22).

Figura 22. A. Mesa completa do aspirador. **B.** Posicionamento da equipe e materiais.



Fonte: Autor (2025).

Para a execução da Aspiração Folicular, a égua foi posicionada no tronco de contenção, com a cauda amarrada e rabeira colocada. A avaliação ovariana foi realizada por palpação transretal com ultrassonografia, sendo observados os seguintes critérios para viabilidade da aspiração:

- Presença de mais de 10 folículos totais
- Folículos com diâmetro entre 10 e 25 mm

Após confirmação dos critérios, procedeu-se à higienização externa do períneo (vulva e reto) com água e detergente neutro (três lavagens), seguida da lavagem do fundo de vagina com solução de Ringer Lactato. A sedação foi realizada em etapas, iniciando com Detomidina e Buscopan®, seguida da administração de Butorfanol, e após a realização do procedimento é administrado o Maxicam 2%® e o Excede® (Tabela 2).

Tabela 2. Durante o procedimento, foram administrados os seguintes fármacos:

Medicamento	Função	Dose (IV/IM)
Maxicam 2%®	Anti-inflamatório não esteroide	15 mL (IV)
Buscopan®	Antiespasmódico	20 mL (IV)
Detomidina 1%	Sedativo com relaxamento muscular e analgesia	0,7 mL (IV)
Butorfanol	Potencializador da sedação e analgésico opioide	0,5 mL (IV)
Acepran®	Relaxamento do ligamento ovariano para facilitar a aspiração	3 mL (IV)
Excede®	Antibiótico de amplo espectro	20 mL (IM)

Fonte: Viana (2019).

Enquanto se aguardava o efeito da sedação, o selecionador conectou os sistemas de vácuo e da garrafa, vestiu a camisa sanitária da guia e acoplou o kit da agulha à guia de aspiração. Após verificação do funcionamento do sistema, o procedimento foi iniciado.

O ovário direito apresentou 6 folículos viáveis e o esquerdo 5 folículos viáveis. A agulha foi posicionada no ovário, e realizado apenas 2 estocagens em cada ovário, minimizando lesões vaginais. Durante a aspiração, o meio DMPBS heparinizado foi injetado nos folículos, e a garrafa coletora foi constantemente agitada para evitar a formação de coágulos.

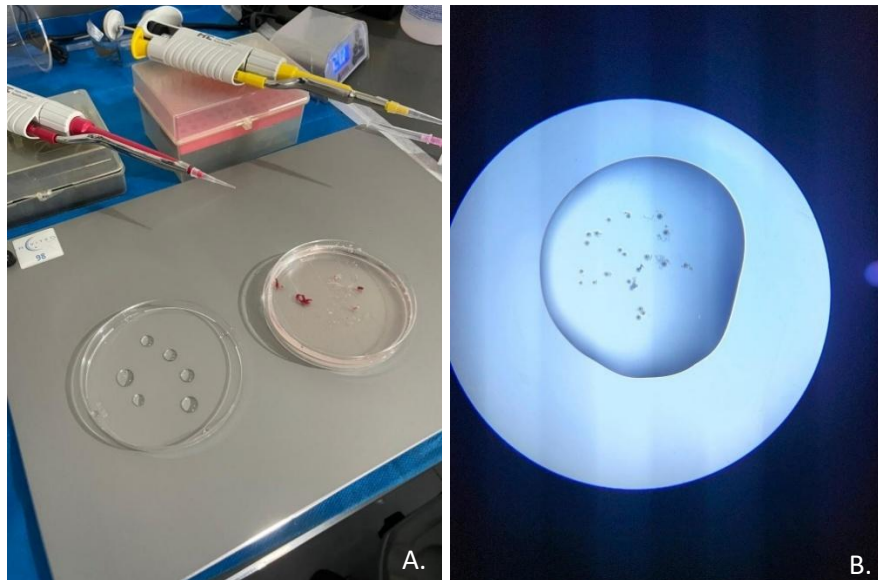
O líquido folicular foi filtrado com DMPBS sem heparina, em três lavagens. O resíduo foi transferido para a placa Petri 1. O filtro foi lavado novamente com seringa de 24 mL sem êmbolo e agulha 40/12 para garantir a recuperação total dos oócitos.

Na lupa com temperatura à 28°C, os oócitos foram rastreados e transferidos para a placa Petri 2, contendo:

- Uma gota de meio para depósito dos oócitos
- Uma gota para lubrificação da ponteira do micropipetador

Após a identificação, os oócitos passaram por três gotas adicionais para lavagem e turbilhonamento, sendo deixados em repouso na quarta gota para posterior envasamento (Figura 23A e B), e armazenados na transportadora de oócitos, e encaminhado ao laboratório da empresa In Vitro Equinos.

Figura 23. A. Material utilizado no processo de seleção. B. Oócitos rastreados.



Fonte: Autor (2025).

Dos 11 folículos aspirados, dos quais 9 oócitos foram recuperados. A recuperação foi considerada satisfatória, embora tenha sido aspirado um folículo dominante (35 mm) e um folículo imaturo (<5 mm), os quais apresentam menor taxa de recuperação oocitária. Após o retorno ao laboratório da In Vitro Equinos, os oócitos foram submetidos à maturação e ICSI. Dez dias após o procedimento, os resultados foram:

- 6 oócitos maturados
- 6 oócitos injetados
- 4 clivagens
- 2 embriões viáveis que foram posteriormente vitrificados

A taxa de conversão foi de 22%, compatível com a média da empresa.

5 DISCUSSÃO

A técnica de aspiração folicular (Ovum Pick-Up – OPU) associada à injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) representa um dos maiores avanços nas biotecnologias aplicadas à reprodução equina. A consolidação desse método no Brasil, especialmente em instituições pioneiras como a In Vitro Equinos, evidencia o progresso técnico e científico alcançado no país. Ao longo das últimas décadas, a OPU evoluiu de procedimentos invasivos e de alto risco, como a laparotomia e a colpotomia, para uma técnica transvaginal guiada por ultrassom, segura, e com maior recuperação oocitária (Vogelsang *et al.*, 1988; Cintra, 2021). Essa transformação possibilitou o aumento significativo da taxa de recuperação oocitária e a redução dos riscos cirúrgicos, consolidando a técnica como base indispensável para a produção in vitro de embriões equinos.

Os resultados obtidos durante o estágio supervisionado na In Vitro Equinos reforçam a importância do preparo adequado das doadoras e do controle rigoroso das condições fisiológicas e ambientais para o sucesso da OPU. Fatores como o manejo nutricional, o equilíbrio hormonal e o monitoramento ultrassonográfico contínuo demonstraram-se determinantes para a obtenção de oócitos de qualidade superior, refletindo diretamente na eficiência da fertilização e do desenvolvimento embrionário. Estudos recentes corroboram essa observação ao apontar que o escore corporal, o controle do estresse e a aplicação de protocolos hormonais individualizados são variáveis críticas na resposta ovariana e na viabilidade oocitária (Leenders, 2023; Catandi *et al.*, 2024).

Outro ponto relevante observado é a influência direta da frequência de aspirações sobre a função ovariana. A realização de coletas em intervalos adequados (20 a 25 dias), conforme verificado na rotina da empresa, mostrou-se eficaz para manter a atividade ovariana sem comprometer a integridade tecidual, em concordância com (Cuervo-Arango *et al.*, 2025). Além disso, a adoção de protocolos de sedação e assepsia adequados foi fundamental para garantir o bem-estar animal e prevenir complicações, refletindo o compromisso ético e técnico na prática reprodutiva. Já do ponto de vista biotecnológico, a OPU tem se mostrado uma ferramenta estratégica para o avanço genético e econômico da equinocultura, permitindo a utilização de doadoras com histórico reprodutivo limitado e ganhões de

alta importância zootécnica. A técnica favorece ainda a conservação de material genético de indivíduos de grande valor, contribuindo para a manutenção de linhagens e o aprimoramento do plantel nacional. Assim, sua aplicabilidade ultrapassa o âmbito clínico, configurando-se como instrumento essencial para o desenvolvimento sustentável da reprodução equina moderna.

Dessa forma, os dados observados e a literatura revisada permitem concluir que a eficiência da aspiração folicular está diretamente relacionada à integração entre conhecimento técnico, manejo fisiológico e infraestrutura laboratorial adequada. O contínuo aprimoramento das metodologias, aliado à capacitação de profissionais especializados, é imprescindível para o fortalecimento das biotecnologias reprodutivas e para a consolidação do Brasil como referência mundial na reprodução assistida de equinos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Contudo, a técnica de aspiração folicular (OPU) consolidou-se como uma ferramenta essencial nas biotecnologias reprodutivas equinas, promovendo avanços expressivos na eficiência da produção *in vitro* de embriões e na preservação genética de indivíduos de elevado valor zootécnico. A transição de métodos invasivos para abordagens minimamente invasivas, como a aspiração transvaginal guiada por ultrassonografia, representa um marco no aprimoramento das práticas reprodutivas, assegurando maior segurança, reprodutibilidade e bem-estar animal. A associação entre OPU e ICSI reforça o papel dessas técnicas na superação de limitações fisiológicas e no incremento da eficiência reprodutiva de éguas e garanhões com restrições naturais à fertilização.

Dessa forma, conclui-se que o constante avanço tecnológico, aliado à padronização de protocolos de manejo, controle hormonal e seleção criteriosa das doadoras, constitui fator determinante para a otimização dos resultados e para o fortalecimento da reprodução assistida na espécie equina. Em um cenário de contínua evolução científica, a OPU reafirma-se como um pilar indispensável para o futuro da reprodução equina no Brasil, unindo inovação, eficiência e preservação genética.

7 REFERÊNCIA

AURICH, C.; AURICH, J. E. Effects of stress on reproductive functions in the horse. **Pferdeheilkunde / Equine Medicine**, v. 24, n. 1, p. 99–102, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/289771565_Effects_of_stress_on_reproductive_functions_in_the_horse. Acesso em: 8 nov. 2025.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. *Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo*. Brasília: MAPA, 2016. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/>. Acesso em: 7 nov. 2025.

CATANDI, C. *et al.* Dietary omega-3 fatty acids and antioxidant supplementation improve oocyte quality and embryo development in mares. **Scientific Reports**, v. 14, n. 58323, 2024. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-58323-0>. Acesso em: 1 nov. 2025.

COELHO, L. A. *et al.* Seasonal variation of melatonin concentration and mRNA expression of melatonin-related genes in developing ovarian follicles of mares kept under natural photoperiods in the Southern Hemisphere. **Animals**, v. 13, n. 6, art. 1063, 2023. DOI: 10.3390/ani13061063. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13061063>. Acesso em: 7 nov. 2025.

CREMONESI, F.; LAZZARI, G.; GALLI, C. In vitro maturation and manipulation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 150, p. 380-391, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/>. Acesso em: 7 nov. 2025.

CUERVO-ARANGO, J. *et al.* Influence of repeated follicular aspiration on ovarian function and reproductive performance in mares. **Animals**, v. 15, n. 6, p. 832, 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/15/6/832>. Acesso em: 1 nov. 2025.

DOHERTY, T.; VALVERDE, A. (eds.). **Manual of Equine Anesthesia and Analgesia**. 2. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2008. Disponível em: https://api.pageplace.de/preview/DT0400.9781405172752_A23986648/preview-9781405172752_A23986648.pdf. Acesso em: 8 nov. 2025.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Male factors affecting the success of equine in vitro embryo production by ovum pickup–intracytoplasmic sperm injection in a clinical setting. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103027, 2020. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103027.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: fundamentals**. 1. ed. Cross Plains: Equiservices Publishing, 1992.

GOMES, L. A. **Técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (Ovum Pick-Up – OPU) em bovinos e equinos: revisão de literatura**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), Manaus, 2021. Disponível em:

[http://repositorio.ifam.edu.br/jspui/bitstream/4321/1222/1/T%C3%A9cnica%20de%20aspira%C3%A7%C3%A3o%20folicular%20guiada%20por%20ultrassom%20\(ovum%20pick%20up%20%E2%80%93%20opu\)%20em%20bovinos%20e%20equinos%3a%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf](http://repositorio.ifam.edu.br/jspui/bitstream/4321/1222/1/T%C3%A9cnica%20de%20aspira%C3%A7%C3%A3o%20folicular%20guiada%20por%20ultrassom%20(ovum%20pick%20up%20%E2%80%93%20opu)%20em%20bovinos%20e%20equinos%3a%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf). Acesso em: 7 nov. 2025.

HAFEZ, E. S. E. Ovulation induction, embryo production and transfer. In: HAFEZ, E. S. E. (ed.). **Reproduction in Farm Animals**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016. DOI: 10.1002/9781119265306.ch29.

HINRICHS, K.; CHOI, Y. **Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in horses: applications and efficiency**. [S.l.]: [s.n.], 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/>. Acesso em: 7 nov. 2025.

HINRICHS, K. Equine oocyte ICSI and embryo production: current approaches and results. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, supl. 4, p. 52–61, 2022. DOI: 10.1111/rda.14156.

IN VITRO EQUINOS. **ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide**. [S.l.]: In Vitro Equinos, 2024. Disponível em: <https://invitroequinos.com/icsi>. Acesso em: 7 nov. 2025.

INSTITUTO FEDERAL DE AMAZONAS. **Técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (Ovum Pick-Up – OPU) em bovinos e equinos: revisão de literatura**. [S.l.]: IFAM, [s.d.]. Disponível em: [http://repositorio.ifam.edu.br/jspui/bitstream/4321/1222/1/T%C3%A9cnica%20de%20aspira%C3%A7%C3%A3o%20folicular%20guiada%20por%20ultrassom%20\(ovum%20pick%20up%20%E2%80%93%20opu\)%20em%20bovinos%20e%20equinos%3A%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf](http://repositorio.ifam.edu.br/jspui/bitstream/4321/1222/1/T%C3%A9cnica%20de%20aspira%C3%A7%C3%A3o%20folicular%20guiada%20por%20ultrassom%20(ovum%20pick%20up%20%E2%80%93%20opu)%20em%20bovinos%20e%20equinos%3A%20revis%C3%A3o%20de%20literatura.pdf). Acesso em: 1 nov. 2025.

LAZZARI, G.; GALLI, C.; COLLEONI, S. et al. Progress in equine assisted reproduction: ICSI and embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 35, n. 2, p. 107–120, 2023. DOI: 10.1071/RD23008.

LE BRETON, L. *et al.* Use of gonadotropins and reproductive hormone combinations to synchronize follicular growth and ovulation in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 59, n. 4, p. 321–332, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/rda.14625>. Acesso em: 1 nov. 2025.

LEENDERS, L. **Influence of body condition score on follicular response and oocyte recovery in equine OPU protocols**. 2023. Master's Dissertation – Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent, 2023. Disponível em: https://libstore.ugent.be/fulltxt/RUG01/003/145/040/RUG01-003145040_2023_0001_AC.pdf. Acesso em: 1 nov. 2025.

LUZ, M. R.; CELEGHINI, E. C. C.; BRANDÃO, F. Z. **Reprodução animal: equinos**. v. 3. Barueri: Manole, 2024. E-book. ISBN 9788520465332. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788520465332/>. Acesso em: 24 out. 2025.

MANICA, B. **Relatório de Estágio Curricular Obrigatório: Área de Reprodução Equina**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2021. 37 f. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/9554/TCC%20Barbara%20Manica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 8 nov. 2025.

MCCUE, P. M. (Ed.). **Equine Reproductive Procedures**. 2. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2021.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 2. ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011.

MCGRATH, B. M. *et al.* Characterizing the relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH), Kisspeptin, and RFamide related peptide 3 (RFRP-3) neurons in the equine hypothalamus across the estrous cycle and in the anovulatory seasons. **Theriogenology**, v. 219, p. 157–166, 2024. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2024.02.027. Disponível em: <https://ssrn.com/abstract=4613180>. Acesso em: 7 nov. 2025.

MELEM, A. **A influência da nutrição na reprodução de éguas**. [S.l.]: [s.n.], 2024. Disponível em: https://bdta.ufra.edu.br/jspui/bitstream/123456789/3540/1/A_INFLUENCIA_DA_NUTRICA_O_NA_REPRODUCA_O_DE_EGUAS_Ana_Melem_assinado_assinado.pdf. Acesso em: 8 nov. 2025.

NOVATÉCNICA Equipamentos Laboratoriais; WTAvet. **Catálogo técnico de materiais laboratoriais veterinários: banho-maria, bombas de vácuo, guias e hastes para aspiração folicular**. São Paulo: CBRA, 2023. Disponível em: <https://cbra.org.br/>. Acesso em: 7 nov. 2025.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. *et al.* Advances in the ultrasound diagnosis in equine reproductive medicine: new approaches. **Research in Veterinary Science**, v. 147, p. 99–110, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/361508696>. Acesso em: 1 nov. 2025.

PANNU, S. P. **Role of melatonin in seasonal reproduction in mammals**. [S.l.]: [s.n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5555/20209901827>. Acesso em: 7 nov. 2025.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 751–762, out. 1988. DOI: 10.1016/0093-691X(88)90310-X.

PIMENTEL, M. M. L. *et al.* Monitoramento do ciclo estral de fêmeas equinas por meio de citologia vaginal, ultrassonografia e dosagem hormonal. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 69–75, jan./jun. 2014. DOI: 10.25110/arqvet.v17i1.4920.

REPRODUÇÃO de éguas – anatomia e fisiologia | **Blog Equinovet**. Disponível em: <https://equinovet.com.br/reproducao-de-eguas-anatomia-e-fisiologia/>. Acesso em: 1 nov. 2025.

SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009. 336 p.

SERTICH, P. L. **The reproductive cycle of horses**. [S.l.]: Merck Veterinary Manual, fev. 2021. Disponível em: <https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/management-of-reproduction-horses/the-reproductive-cycle-of-horses/>. Acesso em: 7 nov. 2025.

SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos animais domésticos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

SIMONNEAUX, V.; ANCEL, C. *et al.* Kisspeptins and RFRP-3 act in concert to synchronize rodent reproduction with seasons. **Frontiers in Neuroscience**, 2013. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2013.00022/full>. Acesso em: 7 nov. 2025.

STOUT, T. A.; CLAES, A.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; CUERVO-ARANGO, J. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial OPU-ICSI program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103072, 2020. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103072.

THOMPSON, R. E. *et al.* A review of in vivo and in vitro studies of the mare endometrium. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 10, p. 1292–1301, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32987223/>. Acesso em: 24 out. 2025.

VIANA, Fernando A. Bretas. **Guia terapêutico veterinário**. 4. ed. Belo Horizonte: Gráfica Editora CEM, 2019.

VOGELSANG, M. M. *et al.* Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v. 29, n. 4, p. 823–834, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/>. Acesso em: 7 nov. 2025.