



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NA CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA EMBRYOHORSE, NO  
MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR, BRASIL, E NA CENTRAL EQUINA  
DE REPRODUÇÃO (CER), NO MUNICÍPIO DE BOITUVA, SP, BRASIL**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM ÉGUAS - RELATO DE CASO**

**YASMIN SANTANA MENDES GOMES**

**Recife, 2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM ÉGUAS - RELATO DE CASO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária, sob a orientação do Prof. Dr. André Mariano Batista

**YASMIN SANTANA MENDES GOMES**

**Recife, 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G633r Gomes, Yasmin Santana Mendes Gomes  
RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO), REALIZADO NA CENTRAL DE REPRODUÇÃO EQUINA EMBRYOHORSE, NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR, BRASIL, E NA CENTRAL EQUINA DE REPRODUÇÃO (CER), NO MUNICÍPIO DE BOITUVA, SP, BRA  
ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM ÉGUAS - RELATO DE CASO / Yasmin Santana Mendes Gomes Gomes. - 2024.  
46 f. : il.  
  
Orientador: Andre Mariano Batista.  
Inclui referências.  
  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2024.  
  
1. Cavalos . 2. Biotecnologia. 3. Reprodução Equina. I. Batista, Andre Mariano, orient. II. Título

---

CDD

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Cleber e Frankyleide, por seu apoio inabalável, amor incondicional e incentivo constante ao longo de toda a minha jornada acadêmica. Suas palavras de encorajamento foram fundamentais para que eu persistisse e alcançasse meus objetivos.

Às minhas queridas irmãs, Giovanna e Giuliana, agradeço por estarem sempre ao meu lado, compartilhando momentos de alegria e apoio mútuo. Sua presença foi um grande suporte emocional durante os desafios enfrentados ao longo deste percurso.

Aos meus estimados professores, que compartilharam seus conhecimentos e experiências, moldando meu pensamento crítico e me guiando rumo ao crescimento acadêmico e profissional, expresso minha profunda gratidão. Em especial, gostaria de agradecer ao meu orientador, André Mariano Batista, pela sua dedicação, orientação cuidadosa e valiosos insights que contribuíram imensamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, Thamyres, André, Mieko, Thera, Cadu, Gabriela, Heloisa, Hugo, Taciana e Rafa, que estiveram ao meu lado durante toda a jornada universitária, compartilhando risos, desafios e conquistas, meu mais sincero agradecimento. Vocês foram minha fonte de apoio e inspiração, tornando essa jornada mais leve e memorável.

E não poderia esquecer de expressar minha gratidão aos meus amados pets, Lana, Dexter, Sasha, Kate e Zeus, por seu amor incondicional, companhia constante e por encherem meus dias de alegria e afeto.

A todos vocês, meu profundo obrigado por fazerem parte dessa trajetória. Que nossos laços permaneçam fortes e que possamos continuar compartilhando momentos de sucesso e felicidade.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Laboratório: área suja .....	11
<b>Figura 2</b> Laboratório: área limpa .....	11
<b>Figura 3</b> Setor de avaliação ginecológica (EmbryoHorse).....	12
<b>Figura 4</b> Manequim de coleta de sêmen.....	12
<b>Figura 5</b> Pavilhão 1 .....	13
<b>Figura 6</b> Pavilhão 2.....	13
<b>Figura 7</b> Laboratório .....	15
<b>Figura 8</b> Sala de limpeza e esterilização .....	15
<b>Figura 9</b> Setor de avaliação ginecológica (CER) .....	16
<b>Figura 10</b> Manequim para coleta de sêmen (CER) .....	16
<b>Figura 11</b> Brete .....	17
<b>Figura 12</b> Folículo dominante.....	19
<b>Figura 13</b> Contenção da égua.....	20
<b>Figura 14</b> Inseminação Artificial com sêmen fresco.....	21
<b>Figura 15</b> Vagina artificial (VA) .....	22
<b>Figura 16</b> Materiais utilizados .....	36
<b>Figura 17</b> Procedimento de aspiração .....	37
<b>Figura 18</b> Filtração do conteúdo aspirado .....	37
<b>Figura 19</b> Transferência para placa de petri.....	38
<b>Figura 20</b> Análise no estereomicroscópio .....	39

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CL- Corpo Lúteo**

**DG- Diagnóstico Gestacional**

**ESO- Estágio Supervisionado Obrigatório**

**FSH- Hormônio Folículo Estimulante**

**IA- Inseminação Artificial**

**IM- Intramuscular**

**IV- Intravenosa**

**LH- Hormônio Luteinizante**

**LIU- Líquido Intrauterino**

**PGF-2 alfa- Prostaglandina F-2alfa**

**TCC- Trabalho de Conclusão de Curso**

**TE- Transferência de Embriões**

**VA- Vagina Artificial**

## RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) relata o Estágio Supervisionado Obrigatório realizado na EmbryoHorse, de 02 de outubro de 2023 a 30 de novembro de 2023, totalizando 328 horas, e na Central Equina de Reprodução (CER), de 01 de dezembro de 2023 a 22 de dezembro de 2023, totalizando 128 horas, sob orientação do Prof. Dr. André Mariano Batista. Durante esse período, foram realizadas atividades práticas relacionadas à reprodução equina, com enfoque em biotecnologias reprodutivas, manejo sanitário, nutricional e acompanhamento de gestação por ultrassonografia. Este trabalho abrange a descrição das instituições de estágio, suas estruturas físicas e administrativas, bem como a condução da rotina e atividades realizadas. Além disso, apresenta um relato de caso com aspiração folicular em éguas.

**Palavras-chaves:** Cavalos; Biotecnologia; Reprodução equina.

## **ABSTRACT**

The present Final Course Work (TCC) reports on the Mandatory Supervised Internship carried out at EmbryoHorse from October 2nd, 2023, to November 30th, 2023, making a total of 328 hours, and at the Equine Reproduction Center (CER) from December 1st, 2023, to December 22nd, 2023, making a total of 128 hours, oriented by Prof. Dr. André Mariano Batista. During this period, practical activities related to equine reproduction were conducted, focusing on reproductive biotechnologies, sanitary and nutritional management, and ultrasound monitoring of pregnancy. This work encompasses the description of the internship institutions, their physical and administrative structures, as well as the conduct of routines and activities carried out. Additionally, it presents a case report on follicular aspiration in mares.

**Keywords:** Horses; Biotechnology; Equine Reproduction.

## Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO .....	10
2.1	EmbryoHorse – Central de Reprodução Equina.....	10
2.1.1	Laboratório.....	10
2.1.2	Setor de Avaliação Ginecológica .....	11
2.1.3	Manequim de Coleta de Sêmen .....	12
2.1.4	Piquetes e Alojamento.....	13
2.2	CER - Central Equina de Reprodução .....	14
2.2.1	Laboratório.....	14
2.2.2	Setor de Avaliação Ginecológica .....	15
2.2.3	Manequim para Coleta de Sêmen e Coleta de Embrião .....	16
2.2.4	Piquetes e Alojamento.....	17
3	ATIVIDADES REALIZADAS .....	17
3.1	Controle Folicular.....	18
3.2	Inseminação Artificial .....	20
3.3	Coleta e Manipulação do sêmen .....	23
3.4	Transferência de Embriões .....	26
3.4.1	Seleção de Receptoras .....	26
3.4.2	Colheita do Embrião .....	27
3.4.3	Manipulação do Embrião .....	28
3.4.4	Inovulação do Embrião .....	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	29
CAPÍTULO II.....		30
1	INTRODUÇÃO.....	30
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1	Anatomofisiologia .....	31
2.2	Aspiração Folicular .....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	39
5	CONCLUSÃO.....	40
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

A indústria equina desempenha um papel importante na economia brasileira e também ganhou reconhecimento significativo em escala global, especialmente nos últimos 15 anos. Este setor injetou um montante de cerca de 16 bilhões de reais na economia do Brasil em 2015, o que permitiu que quase 3 milhões de pessoas encontrassem emprego direta ou indiretamente (Lima & Cintra, 2016). Descobriu-se que cerca de cinco milhões de cavalos faziam parte do plantel de cavalos do Brasil em 2014 (IBGE, 2014).

Por outro lado, a atualização de 2022 elevou esse número para 5,8 milhões, o que mostra a sua importância econômica para a nação (IBGE, 2022). O Brasil é líder mundial na produção de embriões equinos com participação de mercado de 43%, seguido pela Argentina e EUA com participações de 29% e 18%, respectivamente (Losinno; Urosevic, 2015).

No entanto, apesar do crescimento exponencial que tem caracterizado este setor, a criação de cavalos de excepcional valor genético continua a ser um desafio. Um dos principais desafios associados à seleção genética é a predominância de padrões raciais e de desempenho atlético na história, em vez de características reprodutivas. Isso significa que mais de um animal escolhido para reprodução pode ter problemas de fertilidade ou de genética, e assim pode contribuir para a redução das taxas reprodutivas dos rebanhos.

Nessa perspectiva, encontrar outras opções é fundamental para que a taxa de reprodução e as características genéticas sejam mais robustas e superiores. Neste âmbito, as biotecnologias reprodutivas, incluem a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embriões (TE), são utilizadas como um recurso para aumentar a taxa de reprodução (Papa et al., 2005).

Os estágios curriculares nos quais foram adquiridas experiências ocorreram em dois centros de reprodução equina, nomeadamente EmbryoHorse e Centro de Reprodução Equina (CER). Tais ambientes são conhecidos pelos papéis vitais que desempenham na pesquisa e na prática relativa à reprodução animal. O presente trabalho tem, portanto, o objetivo de relatar as atividades que foram realizadas ao longo do estágio curricular obrigatório sobre reprodução

equina para estabelecer uma correlação entre elas e uma apresentação de caso acompanhado durante o estágio.

## **2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO**

### **2.1 EmbryoHorse – Central de Reprodução Equina**

A fase inicial do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) decorreu de 2 de outubro de 2023 a 30 de novembro de 2023 no EmbryoHorse, centro de criação de cavalos, situado na Rua Padre Francisco Proft, 4000 - Contenda, São José dos Pinhais - PR. O estabelecimento possui instalações modernas e completas que atendem às necessidades de reprodução equina com eficácia e perfeição.

Durante o meu estágio na EmbryoHorse, tive a oportunidade de ver e estar envolvida nos procedimentos de um centro de criação de cavalos e trabalhar sob a orientação do veterinário Carlos Eduardo Camargo, que me colocou em contato com um mundo altamente especializado, com pessoas apaixonadas pelo seu trabalho e dedicadas à busca pela perfeição na reprodução equina.

#### **2.1.1 Laboratório**

O laboratório EmbryoHorse é amplo e equipado com equipamentos de última geração, o que o torna capaz de realizar diversos procedimentos reprodução equina. Está dividido em duas zonas: a primeira é a área suja (Figura 1A e B), onde são guardados os medicamentos e os instrumentos de limpeza, e a segunda é a área limpa (Figura 2A e B), que é reservada para a execução de exames e procedimentos que envolvem desde a avaliação de sêmen até a manipulação de embriões.

Figura 1 - Laboratório: área suja.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 2 - Laboratório: área limpa.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.1.2 Setor de Avaliação Ginecológica

No setor de avaliação ginecológica (Figura 3), a EmbryoHorse dispõe de 3 bretes bem equipados, projetados para garantir uma rotina de atendimento eficiente e confortável para os animais, além de proporcionar um ambiente propício para atividades de treinamento e cursos na área de reprodução equina.

Figura 3 - Setor de avaliação ginecológica.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.1.3 Manequim de Coleta de Sêmen

Um destaque importante da EmbryoHorse é a presença de um manequim próprio para a coleta de sêmen de garanhões (Figura 4), proporcionando um ambiente controlado e seguro para a realização desse procedimento, crucial para a reprodução equina.

Figura 4 - Manequim de coleta de sêmen.



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 2.1.4 Piquetes e Alojamento

A estrutura da central inclui dois pavilhões de cocheiras, cada um projetado para atender às necessidades específicas dos animais alojados. O primeiro pavilhão (Figura 5), com 10 boxes abertos e 4 fechados, está integrado ao laboratório, escritório e mezanino com sala de aula. Já o segundo pavilhão (Figura 6) conta com 5 boxes maiores, de 20 metros quadrados, adequados para animais de raças maiores ou éguas em pré-parto, proporcionando conforto e segurança durante esses períodos críticos.

Além da estrutura geral apresentada acima, a central conta com 15 piquetes bem estruturados e com excelente qualidade forrageira, projetados para proporcionar aos animais uma alimentação de qualidade e um espaço adequado para o descanso e o exercício. Esses piquetes são essenciais para o manejo adequado dos equinos alojados na central, contribuindo para o seu bem-estar e saúde geral.

Figura 5 - Pavilhão 1



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6 - Pavilhão 2



Fonte: Arquivo pessoal

## 2.2 CER - Central Equina de Reprodução

A CER é uma instalação bem conhecida, localizada no município de Boituva, no estado de São Paulo, e tem como foco a reprodução equina. Ao longo de minha permanência no CER, tive a oportunidade de observar e participar de diversos procedimentos práticos, orientados pelo Dr. Lucas Adalberto. Isso serviu de plataforma para que eu desenvolvesse ainda mais meus conhecimentos e habilidades em reprodução equina.

Com uma extensão de 8,1 Hectares, as instalações do CER foram cuidadosamente construídas para atender a todos os aspectos da criação de cavalos. A própria estrutura oferece ótimo cuidado e proteção para seus equinos residentes, ao mesmo tempo que promove um ambiente propício ao sucesso de diversas atividades gerenciais e operacionais.

### 2.2.1 Laboratório

O laboratório (Figura 7) é equipado com tecnologia de ponta para realizar procedimentos como análise seminal, processamento de sêmen, coleta e manipulação de embriões. Conta com microscópios de alta resolução, centrífugas, estereomicroscópios, banho-maria, geladeira e botijões de nitrogênio líquido para armazenamento de material biológico. Este ambiente é essencial para a realização de técnicas avançadas de reprodução assistida. Também conta com um espaço dedicado à limpeza e esterilização de materiais utilizados nos procedimentos reprodutivos (Figura 8), garantindo a biossegurança e a qualidade dos insumos. Equipada com autoclave, estufa e bancada de trabalho, a sala segue protocolos rigorosos de higienização para prevenir a contaminação cruzada e garantir a eficácia dos processos.

Figura 7- Laboratório



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8- Sala de limpeza e esterilização.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.2.2 Setor de Avaliação Ginecológica

Esta área é composta por troncos individuais para manejo de éguas (Figura 9), incluindo palpação retal e transferência de embriões, esta área é projetada para facilitar as atividades de rotina, como o controle folicular, a inseminação artificial e o diagnóstico de gestação. Também é utilizada para atendimentos clínicos gerais e para o acompanhamento do estado de saúde dos animais.

Figura 9 - Setor de avaliação ginecológica



Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.2.3 Manequim para Coleta de Sêmen e Coleta de Embrião

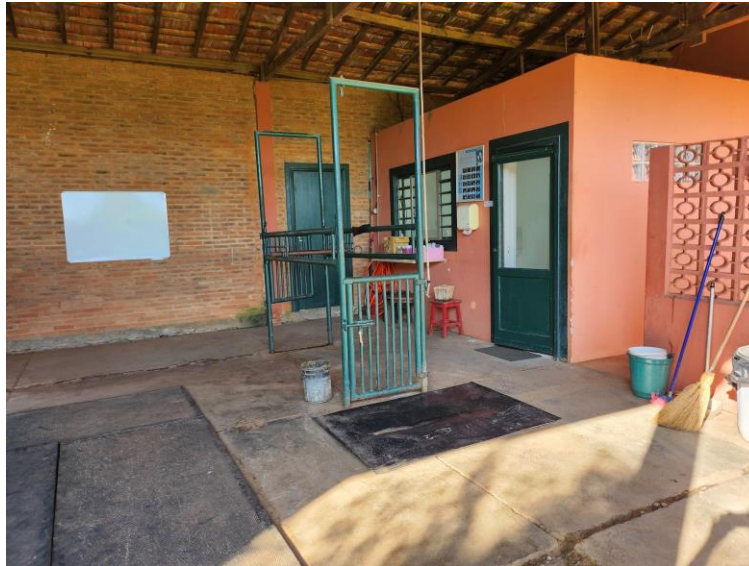
A CER conta com a presença de um manequim próprio para a coleta de sêmen de garanhões (Figura 10) e um brete adjacente (Figura 11) para a realização de lavagem uterina de éguas doadoras para coleta de embriões, proporcionando um ambiente controlado e seguro para a realização desse procedimento crucial para a reprodução equina.

Figura 10 - Manequim para coleta de sêmen



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11 - Brete



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 2.2.4 Piquetes e Alojamento

A CER dispõe de 38 cocheiras destinadas ao alojamento de éguas doadoras de embriões e um garanhão reprodutor. Além disso, são providos 20 piquetes destinados principalmente às éguas receptoras de embriões, éguas com potro ao pé e algumas doadoras de embriões. Estes espaços são projetados para proporcionar bem-estar aos animais, com áreas adequadas para descanso e exercício.

### 3 ATIVIDADES REALIZADAS

Durante o estágio na EmbryoHorse e na CER, tive a oportunidade de participar ativamente de uma variedade de atividades relacionadas à reprodução equina. Isso incluiu o acompanhamento de procedimentos reprodutivos, como inseminação artificial e transferência de embriões, coleta e manipulação de sêmen, a assistência em exames clínicos e ultrassonográficos, a participação em procedimentos, como a coleta de oócitos por aspiração folicular, o manejo reprodutivo e sanitário dos equinos alojados na central, e atividades clínicas gerais, como administração de medicamentos e acompanhamento de éguas gestantes.

### 3.1 Controle Folicular

No contexto da reprodução equina, o controle folicular é um aspecto crítico para o sucesso da fertilidade, e para realizá-lo da forma mais adequada é preciso entender o ciclo estral das éguas. As éguas são poliéstricas estacionais e monovulatórias, o que significa que apresentam múltiplos ciclos estrais durante as estações com dias mais longos, e apenas um folículo é selecionado e ovulado em cada ciclo estral, respectivamente (Crowell-Davis, 2007).

O processo de desenvolvimento dos folículos ovarianos, também conhecido como dinâmica folicular, possui várias fases, começando pelo recrutamento, onde um grupo de folículos antrais começa a crescer em resposta ao hormônio folículo-estimulante (FSH). Em seguida, ocorre a fase de seleção, na qual alguns folículos continuam a crescer enquanto outros começam a regredir ou degenerar (O. J. Ginther et al., 2017).

Durante a fase de seleção, um dos folículos se destaca como dominante (fase de dominância), continuando a crescer e se desenvolver. Esses folículos dominantes são sensíveis ao hormônio luteinizante (LH), que é responsável por desencadear a ovulação (O. J. Ginther et al., 2017).

Durante a fase de dominância, o folículo dominante secreta níveis elevados de estrógeno, essenciais para a regulação do ciclo estral e manifestação do comportamento de cio nas éguas. Conforme descrito por Pierson (1993), um folículo é considerado dominante quando atinge um diâmetro superior a 25 mm, marcando o início da fase folicular do ciclo estral, que se alinha com o período de cio, durando em média 7,7 dias. Na fase inicial do estro começa a apresentar um edema uterino, o qual avança à medida que o estro continua, reduzindo entre 48 e 24 horas antes da ovulação, e se extinguindo até 36 horas após a ovulação (Ginther, 1995; Samper, 1997).

A avaliação clínica da dinâmica folicular é realizada através de palpação retal e ultrassonografia. A palpação retal permite a análise das características do útero, ovário e cérvix, enquanto a ultrassonografia fornece uma avaliação detalhada do tamanho e quantidade de folículos, a presença de corpo lúteo (CL) e o grau de edema uterino. No útero foi observado o tônus (T) graduado de 0 a 3, sendo 0 ausência de tônus e 3 o mais tônus (Aristizabal et al., 2017). As

características observadas nos ovários foram: o tamanho; e se apresentava flutuação. Era avaliado também se a cérvix se encontrava aberta ou fechada. Durante a ultrassonografia era avaliado o tamanho e quantidade de folículos, presença ou não de corpo lúteo (CL) e o edema uterino, classificado de 0 a 4 (Setoguchi et al, 2023).

Quando o folículo atinge um tamanho entre 30,0 e 35,0 mm (Figura 12), intervenções hormonais como a administração de GnRH (histrelina ou Deslorelina /IM) ou hCG/IV são empregadas para induzir a ovulação, que geralmente ocorre cerca de 36-48 horas após a indução (Samper et al, 2002; Cuervo-Arango e Newcombe, 2011). A presença de líquido intrauterino (LIU) também é monitorada, e caso fosse detectado sua presença era realizado o tratamento com agentes ecbólicos, como a ocitocina, essa medicação é utilizada com intuito de estimular as contrações uterinas para eliminar o acúmulo de líquido intrauterino pela cérvix e pela drenagem linfática (Cadario et al., 1995).

Figura 12 – Folículo dominante.



Estes procedimentos e observações são meticulosamente documentados na ficha ginecológica individual de cada égua, garantindo um acompanhamento preciso e personalizado do processo reprodutivo.

### 3.2 Inseminação Artificial

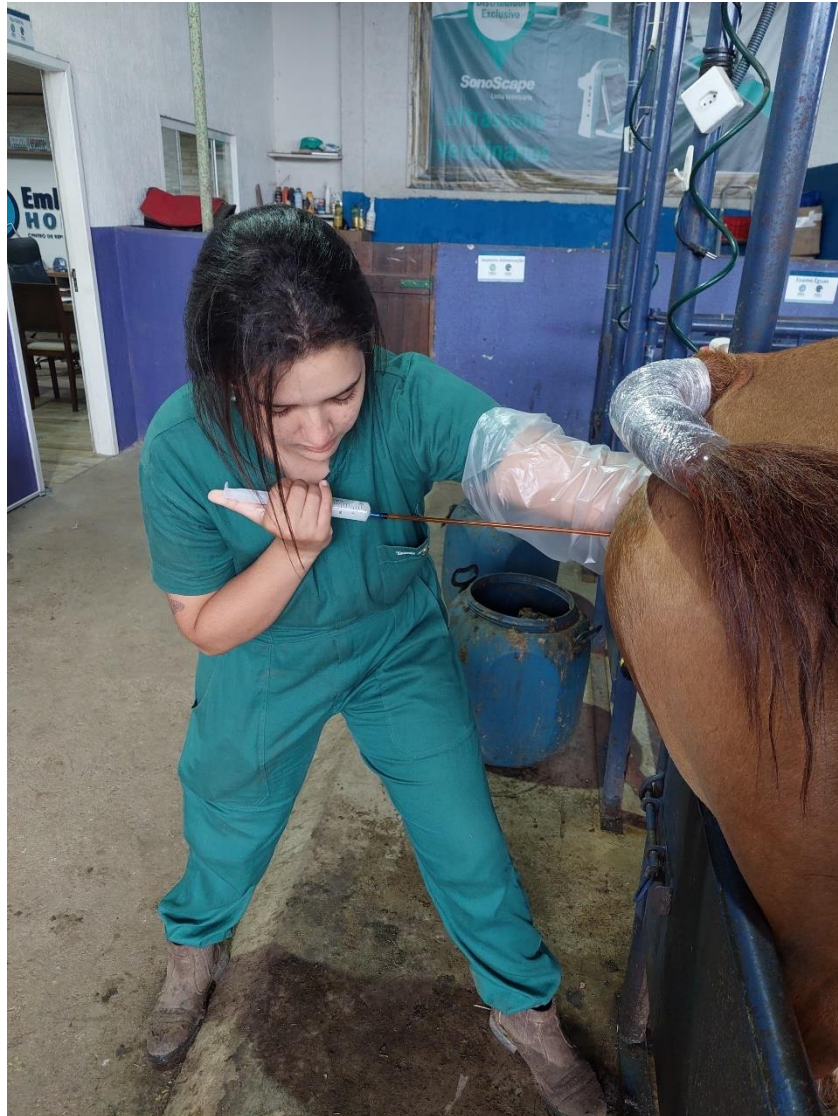
Após observação cuidadosa do ciclo reprodutivo da égua e indução da ovulação, com o folículo dominante medindo de 40 a 45 mm, a égua era inseminada com sêmen resfriado ou fresco, conforme recomendação do veterinário. Antes do processo de inseminação, a cauda da égua foi enrolada e amarrada com segurança em si própria (Figura 13). Para garantir a limpeza ideal, a vulva, o períneo e o ânus foram cuidadosamente limpos com sabão de coco ou neutro e água corrente, repetindo esse processo pelo menos três vezes ou até que a higiene satisfatória fosse alcançada. O procedimento de inseminação artificial propriamente dito foi realizado com pipetas descartáveis, utilizando a dose adequada de sêmen resfriado ( $1000 \times 10^6$  spz viáveis) ou fresco ( $500 \times 10^6$  spz viáveis) (Figura 14). Após um período de 24 horas, a ovulação foi confirmada através do monitoramento ultrassonográfico.

Figura 13 - Contenção da égua.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 14 – Inseminação Artificial com sêmen fresco.



Fonte: Arquivo pessoal.

No processo de utilização de sêmen congelado para IA em éguas, é imperativo monitorar de perto o desenvolvimento dos folículos. Isto garante que o procedimento de inseminação ocorra dentro de uma janela de seis horas após a confirmação da ovulação, maximizando as chances de uma fertilização bem-sucedida. Isso porque, a viabilidade do sêmen descongelado dura aproximadamente 12 horas, alinhando-se com a janela de viabilidade do oócito de aproximadamente 8 horas pós-ovulação (Camargo, 2023) Para facilitar o procedimento de IA, são utilizadas pipetas flexíveis descartáveis para administrar a dose de sêmen descongelado na ponta do corno uterino ipsilateral à ovulação.

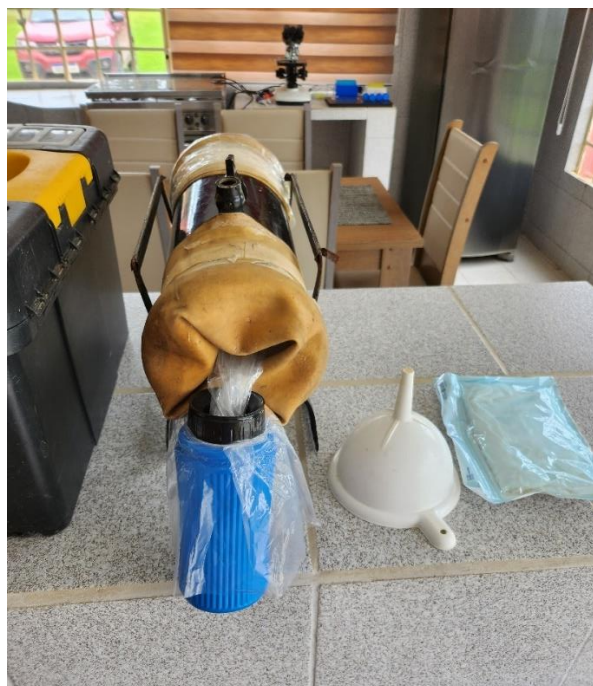
Antes da inseminação, as palhetas de sêmen são descongeladas em banho-maria aquecido a 37 °C por 60 segundos (Fernandes et al, 2017).

### 3.3 Coleta e Manipulação do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas a partir de solicitações específicas de doses, com preferência às segundas, quartas e sextas-feiras. O garanhão foi conduzido até o local de coleta, onde uma égua receptiva foi posicionada ao lado do manequim de coleta em uma baia. Antes da coleta, o pênis do garanhão foi cuidadosamente limpo com água morna e depois seco.

O processo envolveu a utilização de uma vagina artificial modelo Botucatu®, que continha 6 litros de água aquecida a aproximadamente 45 °C. Essa vagina artificial foi equipada com um revestimento plástico e um recipiente com filtro para armazenar o sêmen coletado (Figura 15). Após a ejaculação, a válvula inferior da vagina foi aberta para permitir a drenagem da água e a saída do pênis do garanhão. O recipiente contendo o sêmen foi prontamente destacado e transportado ao laboratório para análise e manipulação imediata.

Figura 15 – Vagina artificial (VA)



Fonte: Arquivo pessoal.

A etapa inicial envolveu registrar o volume da amostra utilizando um béquer. Posteriormente, o diluente apropriado para cada garanhão, foi adicionado a cada amostra na proporção de 1:1. Em seguida, foram realizadas análises quantitativas e qualitativas do sêmen. Para começar, uma lâmina com uma pequena gota de sêmen foi examinada sob um microscópio. Este exame envolveu a avaliação da motilidade (%) e do vigor (1 - 4) dos espermatozoides. Além disso, a concentração de espermatozoides foi estimada na câmara de Neubauer. Para isso, a amostra de sêmen foi diluída em água destilada na proporção de 1:20 e colocada na câmara. Cinco quadrados foram contados em cada lado da câmara e os resultados foram combinados e divididos por 2. Se não houvesse discrepância superior a 10% entre o número total de espermatozoides contados em cada lado, a estimativa foi considerada precisa.

Após a divisão das amostras para análise espermática, o sêmen foi cuidadosamente transferido para tubos Falcon de 50 mL. Para garantir a proteção dos espermatozoides durante o processo de centrifugação, foi adicionado ao fundo desses tubos um meio coloidal de alta densidade denominado RedCushion®, totalizando 3 mL. As amostras foram então submetidas à centrifugação a uma velocidade de 1000 G durante 20 minutos. Concluída a centrifugação, o pellet de espermatozoide localizado entre o RedCushion® e o plasma seminal foi extraído e posteriormente transferido para outro tubo Falcon de 50 mL.

Para garantir uma concentração adequada de espermatozoides móveis, o sêmen foi misturado com o diluente adequado para cada garanhão, garantindo um mínimo de 50 milhões de espermatozoides por mililitro. A dose inseminante resultante foi cuidadosamente colocada em um recipiente de transporte especializado denominado BotuIA® e posteriormente colocada dentro de uma caixa de isopor Botuflex® junto com duas bolsas de gelo recicláveis. Para manter a temperatura entre 2 e 5 °C durante o transporte, foi incluída uma garrafa adicional de água na caixa de transporte, principalmente porque o volume da dose inseminante diluída poderia variar de 30 a 50 mililitros. Conforme afirma Canisso et al. (2008), a diluição de espermatozoide recomendada normalmente fica na

faixa de  $25 \times 10^6$  a  $100 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro, dependendo da duração de armazenamento desejada da amostra.

Para preservar o sêmen, foi realizado um cálculo inicial para determinar o número necessário de palhetas com base na concentração e motilidade dos espermatozoides no ejaculado. É essencial que cada palheta contenha 100 milhões de espermatozoides viáveis. Para determinar o número de palhetas necessárias, o número total de espermatozoides viáveis na ejaculação é dividido por 100. Os espermatozoides viáveis estão naturalmente presentes na ejaculação e sua contagem total é determinada multiplicando o volume da ejaculação pela concentração de espermatozoides e a porcentagem de motilidade.

Em seguida, o ejaculado é misturado com um agente diluente designado em partes iguais e submetido à centrifugação a uma taxa de 2.200 rotações por minuto durante 10 minutos para eliminar o fluido seminal.

Uma vez concluído o processo de centrifugação, os *pellets* obtidos eram então reconstituídos utilizando o diluidor de congelamento aquecido. Para determinar o volume final da suspensão com o diluente de congelamento, multiplica-se o número de palhetas por 0,5, considerando que cada palheta contém 0,5 mL.

O próximo passo envolveram colocar o sêmen em palhetas de 0,5 mL e conservá-lo em geladeira regulada a 5 °C por 20 minutos. Uma vez concluído o processo de estabilização, as palhetas foram rapidamente expostas ao vapor de nitrogênio por mais 20 minutos. Isto é feito posicionando-os cuidadosamente a uma distância específica, variando de 3 a 6 cm, acima do nível de nitrogênio líquido. Todo o procedimento foi realizado dentro de uma caixa térmica coberta.

Após o processo de resfriamento, as palhetas são submetidas ao congelamento por imersão em nitrogênio líquido. Antes da sua utilização, uma palheta é descongelada para avaliar a eficácia do procedimento. O descongelamento é realizado em banho-maria à temperatura de 37 °C durante 60 segundos. Depois de descongelado, o sêmen é examinado para determinar sua viabilidade e qualidade, abrangendo fatores como motilidade acima ou igual a 30%, vigor maior ou igual a 3 e apresentar mais de 40% de espermatozoides com defeito (CBRA, 1998).

### 3.4 Transferência de Embriões

#### 3.4.1 Seleção de Receptoras

As éguas receptoras são selecionadas usando vários critérios, por exemplo, é aconselhável que as éguas receptoras estejam na faixa etária de 3 a 15 anos (McCue; Squires 2015).

A avaliação do sistema reprodutivo feminino requer a realização de palpação retal e ultrassonografia. Esta avaliação abrangente inclui a observação dos ovários, da mucosa uterina e a detecção de quaisquer anomalias, como cistos ou presença de líquido uterino. Além disso, é realizado um exame minucioso da genitália externa, com especial atenção à avaliação da estrutura da vulva e do períneo.

Conforme afirmado por McCue, Scoggin e Lindholm (2011), o período de estro é caracterizado por aumento do edema uterino, crescimento dos folículos ovarianos e relaxamento do colo do útero. Por outro lado, a presença de edema uterino ou relaxamento do colo do útero durante o diestro pode indicar potenciais condições patológicas como endometrite e incompetência cervical. Isso ocorre porque o colo do útero normalmente permanece relaxado apenas durante o estro e o nascimento, e não durante o diestro (Troedsson, 2011; LeBlanc; McKinnon, 2011).

No programa de transferência de embriões, as éguas receptoras foram categorizadas de acordo com a quantidade prevista de embriões a serem transferidos semanalmente, obedecendo a um cronograma pré-determinado. As éguas elegíveis para transferência foram escolhidas no intervalo de tempo dos dias D4 a D7 do ciclo estral, sendo D0 definido como o dia da ovulação ou da administração de progesterona no caso de protocolos de ciclo artificial. No dia da transferência cada égua disponível nos parâmetros citados era examinada para avaliar as características uterinas e ovarianas antes do procedimento, para que a inovulação do embrião ocorresse no animal mais adequado.

Ao selecionar uma égua receptora para transferência de embriões, vários fatores são levados em consideração. Isso inclui considerar o momento da ovulação em relação à égua doadora, com preferência para éguas receptoras no

5º dia do ciclo estral. A qualidade geral do ciclo estral também é considerada, como a presença de líquido uterino durante o estro, a condição do corpo lúteo e o tônus do útero e do colo do útero. Outros fatores incluem a ausência de edema uterino e o tamanho da égua receptora em comparação com a doadora (Mccue; Squires, 2015). Segundo Lopes (2015), é seguro utilizar éguas receptoras para transferência de embriões entre o D4 e D7 do ciclo estral. No entanto, esse prazo pode ser estendido com o uso de medicamentos como a progesterona.

#### 3.4.2 Colheita do Embrião

Para realizar o procedimento de coleta de embriões, foi utilizada uma sonda bivona de via simples para lavagem uterina. Antes do processo de lavagem, todas as fezes presentes na ampola retal da égua foram cuidadosamente eliminadas. Para minimizar a contaminação do animal, a cauda foi bem enrolada com uma bandagem e amarrada na própria égua. A região da vulva, períneo e ânus foi submetida a limpeza completa com sabão neutro ou de coco, seguida de enxágue com água corrente e posterior secagem. Por fim, um gel lubrificante foi aplicado na borda dos lábios vulvares.

Para evitar a contaminação do útero, uma luva de palpação retal é invertida e utilizada. A sonda bivona é então guiada através do colo do útero até o corpo uterino, fixando-a na cérvix inflando o balão com 50 mL de ar. Simultaneamente, é introduzido pela sonda até 1 litro de solução de Ringer com lactato, aquecida à temperatura de 37 °C, já que é uma solução que não apresenta diferença de osmolaridade para com o embrião. O veterinário indicará quando o útero estiver totalmente distendido, momento em que o soro será extraído e substituído por um filtro de embrião para eliminar o soro remanescente. Este processo é repetido no mínimo 3 vezes ou até que o embrião seja recuperado com sucesso. Após a coleta, independentemente do resultado, é administrado 5 mg de DINOPROST (Lutalyse®) por injeção intramuscular, para que não apresente risco do embrião permanecer na égua doadora.

### 3.4.3 Manipulação do Embrião

Após a coleta, o filtro contendo aproximadamente 20 mL de ringer remanescente do lavado era levado ao laboratório. O líquido era transferido para uma placa de Petri descartável que tinha traços verticais pré-delineados para facilitar a busca pelo embrião. A localização do embrião era realizada com o auxílio de um estereomicroscópio com aumento de 10 vezes. E com base na qualidade embrionária, o embrião foi classificado em uma escala de 4 graus, variando de excelente (grau 1) a degenerado (grau 4) (Mccue; Squires 2015).

Os embriões eram então manipulados usando um manipulador e palhetas estéreis de 0,5 ou 0,25 mL, dependendo do tamanho do embrião coletado. Embriões eram limpos em uma placa de Petri descartável de 100 x 20 mm, onde foram colocadas 9 gotas de meio de suporte. Durante a troca de gotas, a palheta estéril também foi trocada simultaneamente para minimizar possíveis reações inflamatórias no útero das receptoras após a transferência. No caso de embriões classificados como grau 1, sem detritos ou sujidade aderida, eles eram transferidos diretamente para uma placa de Petri de 35 x 10 mm contendo meio de manutenção embrionária onde era devidamente envasado.

### 3.4.4 Inovulação do Embrião

O embrião é transferido usando um inovulador de embrião equino, protegido por uma bainha e uma camisa sanitária. Uma palheta de 0,25 ou 0,5 mL, contendo o embrião entre gotas de meio de suporte e bolhas de ar, para proteger o embrião, foi acoplada ao inovulador.

Durante a inovulação do embrião, evita-se a manipulação cervical para reduzir a secreção de prostaglandinas endógenas. No entanto, quando as éguas eram muito manipuladas durante a transferência, era feita a administração de progesterona e dexametasona. A progesterona foi utilizada para melhorar o ambiente uterino, controlando o tônus e a secreção das glândulas endometriais, enquanto os anti-inflamatórios minimizam a secreção de prostaglandinas, que são responsáveis pela luteólise (Lopes, 2015; Mccue; Squires 2015).

As coletas de embrião eram realizadas sempre no D8 para embriões de sêmen fresco ou refrigerado, e no D9 para embriões de sêmen congelado, já que

esses embriões tinham um tamanho menor comparados com de sêmen fresco no mesmo dia (Mccue, 2011). A maioria dos embriões transferidos na CER foi enviada por outros médicos veterinários, chegando armazenados em criotubos contendo meio de suporte ou embalados em palhetas estéreis de 0,25 mL nos casos de embriões de ICSI ou clones.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A experiência adquirida durante o estágio supervisionado nas centrais de reprodução equina EmbryoHorse e CER proporcionou uma compreensão profunda e prática dos desafios e avanços no campo da reprodução equina. A indústria equina, com sua significativa contribuição econômica e avanços tecnológicos, destaca-se como um setor de vital importância para o Brasil. As técnicas de Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) demonstraram ser ferramentas valiosas na melhoria das taxas reprodutivas e na preservação de linhagens genéticas valiosas.

A predominância de padrões raciais e de desempenho atlético historicamente valorizados na seleção genética apresenta desafios, como problemas de fertilidade em animais de alto valor. No entanto, as biotecnologias reprodutivas oferecem alternativas promissoras para superar esses obstáculos. A prática e a pesquisa realizadas nas centrais EmbryoHorse e CER são exemplos claros do compromisso com a excelência e a inovação na reprodução equina.

A integração entre conhecimento teórico e prático foi essencial para o desenvolvimento de habilidades e competências na área. A observação e participação em procedimentos como controle folicular, inseminação artificial, coleta e manipulação de sêmen, e transferência de embriões, foram fundamentais para a formação profissional. Essas atividades não apenas reforçaram a importância da precisão e do cuidado em cada etapa do processo reprodutivo, mas também destacaram a necessidade de um manejo adequado e de um ambiente propício para o bem-estar dos animais.

Em suma, o estágio proporcionou uma visão holística da reprodução equina, enfatizando a necessidade de abordagens inovadoras e sustentáveis para garantir o futuro do setor. A experiência adquirida é um testemunho do

potencial das biotecnologias reprodutivas em contribuir significativamente para o avanço da indústria equina no Brasil e no mundo.

## **CAPÍTULO II**

### **1 INTRODUÇÃO**

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom representa um avanço significativo na biotecnologia reprodutiva equina, oferecendo uma alternativa não invasiva e eficiente para a coleta de oócitos. Este método, pioneiramente relatado em bovinos por Pieterse et al., em 1988, e adaptado para equinos por Bruck et al., em 1992, tem se mostrado uma ferramenta valiosa para a obtenção de gametas femininos, especialmente em éguas com dificuldades reprodutivas ou de alto valor genético.

A técnica permite a recuperação de oócitos diretamente dos folículos ovarianos sem a necessidade de cirurgia, possibilitando múltiplas coletas no mesmo ciclo estral e minimizando o impacto sobre a fertilidade do animal. A precisão e a segurança do procedimento são asseguradas pelo uso de equipamentos especializados e pela habilidade do profissional, que deve ser capaz de manipular delicadamente os folículos e garantir a integridade dos oócitos (Araújo, 2015).

Neste capítulo, discutiremos a metodologia empregada na aspiração folicular transvaginal em éguas, abordando desde a preparação do animal até a coleta e classificação dos oócitos. Além disso, exploraremos as implicações dessa técnica para o avanço das biotecnologias reprodutivas e seu papel no aprimoramento genético da espécie equina. A aspiração folicular não apenas contribui para a conservação de linhagens valiosas, mas também abre caminho para pesquisas futuras em clonagem e maturação *in vitro*, ampliando as fronteiras do conhecimento na reprodução equina (Araújo, 2015).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anatomofisiologia

O sistema reprodutor feminino dos equinos consiste em órgãos internos e externos, sendo os órgãos internos cruciais para o processo de reprodução. Esses órgãos internos incluem ovários, ovidutos, útero, colo do útero, vestíbulo e vagina. Os ovários têm um papel vital na produção de gametas e hormônios como estrogênio e progesterona. Os ovidutos são responsáveis pela captação dos oócitos liberados pelos ovários, onde ocorre a fertilização ao encontrar os espermatozoides. Uma vez fecundado, o embrião segue para o útero, onde se desenvolve durante a gestação. A vagina e o vestíbulo desempenham várias funções relacionadas à cópula, parto e excreção urinária. O útero é sustentado pelo ligamento largo, que inclui o mesovário, mesossalpinge e mesométrio. Esses componentes, semelhantes ao peritônio, fornecem suporte para o ovário, oviduto e útero, respectivamente (Prestes, 2012).

Em relação aos órgãos tubulares presentes no sistema reprodutor feminino das éguas, cada um é composto por quatro camadas distintas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Dentro do útero, essas camadas são chamadas de endométrio (que inclui a mucosa e a submucosa), miométrio e perimétrio. O endométrio é composto principalmente por um epitélio colunar simples e contém glândulas tubulares que secretam diretamente no lúmen uterino. Os músculos lisos constituem o miométrio, com uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa. Entre essas camadas musculares encontra-se uma camada vascular (Junqueira & Carneiro, 2017).

Desempenhando um papel vital no processo da gestação, o útero é um órgão em forma de tubo que serve de conexão entre os ovidutos e o colo do útero. Dividido em dois cornos e um corpo, o útero apresenta uma característica distintiva de fusão estreita entre os cornos, resultando em cornos mais curtos em comparação com um corpo uterino maior. Posicionado dentro da cavidade abdominal, o útero se estende brevemente para a cavidade pélvica (Junqueira & Carneiro, 2017).

A cérvix, por sua vez, é um esfíncter muscular com paredes apertadas e espessas. Não apenas auxilia no transporte dos espermatozoides através do

mucos cervical, mas também serve como filtro inicial, seletor e bloqueio dos espermatozoides (Davies Morel, 2003).

Seguindo ao longo da via reprodutiva, encontramos a seção cranial do órgão copulador feminino, conhecido como vagina. Esta estrutura fibromuscular de paredes espessas estende-se desde o orifício uterino externo até o orifício externo da uretra. Composta por mucosa, camada muscular e adventícia, a vagina é revestida por epitélio escamoso estratificado e repousa sobre uma lâmina própria substancial. O vestibulo, localizado na extremidade caudal da vagina, serve como espaço compartilhado para os sistemas urinário e reprodutivo e abriga o orifício uretral (Hafez et al., 2004).

O segmento terminal do sistema reprodutor feminino é representado pela vulva. Composta por dois conjuntos de lábios vulvares que convergem nas extremidades superior e inferior, a vulva abrange o clitóris em sua junção inferior. Assemelhando-se a uma contraparte rudimentar do pênis masculino, o clitóris reside na fossa clitoriana e torna-se mais perceptível nas éguas durante o ciclo estral, à medida que se torna visível devido ao movimento dos lábios (Hafez et al., 2004).

As éguas exibem um padrão reprodutivo poliéstrico monovulatório e sazonal, o que significa que experimentam um ciclo de ovulação por ciclo estral e vários ciclos estrais dentro de uma estação reprodutiva. A ocorrência desses ciclos está intimamente ligada à quantidade de luz, pois é regulada pelo sistema nervoso central (SNC) em resposta ao prolongamento do dia durante a primavera e o verão. Esta resposta desencadeia a liberação de hormônios gonadotrópicos pelo eixo hipotálamo-hipófise, nomeadamente o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH), que desempenham um papel crucial no processo de ovulação. Como resultado, as éguas exibem a sua maior atividade reprodutiva durante os dias mais longos da primavera e do verão, enquanto a sua atividade reprodutiva diminui durante os dias mais curtos do inverno, um fenómeno comumente referido como anestro sazonal (Mateu-Sánchez et al., 2016).

Nos ovários, múltiplos folículos antrais são recrutados durante o ciclo estral, com particular sensibilidade ao FSH. Em seguida, inicia-se a fase de

seleção, onde alguns folículos progridem no desenvolvimento enquanto os demais sofrem degeneração, conhecida como atresia. Espécies monovulatórias, como éguas, normalmente apresentam um único folículo dominante que emerge, distinguido por sua elevada produção de estrogênio. Este folículo dominante responde ao gatilho ovulatório iniciado pela liberação do hormônio LH (Driancourt, 2001).

De acordo com Hafez et al. (2004), a duração do ciclo estral de uma égua pode variar de 19 a 25 dias e é dividido em duas fases – a fase folicular (estro) e a fase lútea (diestro). O estro, que dura cerca de 4 a 8 dias, significa o período de receptividade sexual de uma égua a um garanhão. É governado principalmente pelos níveis de estrogênio circulante (Frandsen, 1979). A maioria das éguas apresenta o anestro durante o inverno até o início da primavera, quando a exposição à luz solar diminui.

Nesta fase, os ovários são pequenos, com 3 mm de tamanho, enquanto o útero é flácido com uma parede fina que dificulta a palpação, e a cérvix está relaxada e pode chegar a revelar a luz uterina. Em termos de cor, tanto o colo do útero quanto a vagina são pálidos (Mateu-Sánchez et al., 2016).

## 2.2 Aspiração Folicular

Pieterse et al. (1988) foram os primeiros a relatar a coleta e transferência de oócitos em animais domésticos por meio de aspiração transvaginal guiada por ultrassom, especificamente em bovinos. Bruck et al. (1992) foram pioneiros na descrição desta técnica em equinos, demonstrando que a coleta de oócitos em éguas pode ser realizada através de lavagem e aspiração folicular transvaginal, guiada por ultrassom. Embora o estudo tenha produzido apenas um oócito, eles enfatizaram a eficiência, a precisão e o mínimo de invasividade da técnica.

A aspiração folicular transvaginal oferece a vantagem de ser um procedimento não cirúrgico, o que significa que pode ser repetido sem impactar negativamente a fertilidade da égua. Esta técnica é particularmente benéfica para a obtenção de oócitos em éguas que apresentam problemas de infertilidade e estão sendo submetidas a outras biotecnologias. Bézard (1997) apoia ainda a

natureza não invasiva da aspiração folicular transvaginal em éguas, destacando a sua versatilidade em ser realizada em diferentes ciclos do mesmo animal.

Para realizar a aspiração folicular e retirar oócitos da égua, é necessário que a égua esteja seguramente contida e em posição estacionária. A etapa inicial envolve a retirada das fezes do reto e a garantia da higienização adequada do períneo do animal. Para obter uma imagem ultrassonográfica dos folículos, o ovário é manipulado e posicionado contra a parede do fundo vagina (Silva et al., 2004).

O uso de agulha de duplo lúmen 14G ou 16G para aspiração é prática comum, pois permite a lavagem e punção do folículo, aumentando a taxa de retirada do oócito. Esta solução de recuperação facilita a liberação do oócito da parede do folículo. Assim que os ovários estiverem devidamente posicionados, o folículo alvo é observado e a agulha é inserida suavemente na parte inferior da vagina para alcançar o folículo. Uma solução tamponada e heparina a 37 °C são utilizadas para lavar o folículo e evitar a coagulação do material aspirado. O fluido folicular é coletado em um copo durante o processo de sucção. É importante utilizar níveis de pressão que variam de 90 mmHg a 400 mmHg, evitando níveis excessivamente elevados para evitar danos aos oócitos (Pycock, 1996; Araújo, 2015; Carnevale et al., 2001).

Concluída a aspiração, o líquido folicular é cuidadosamente colocado em uma placa de Petri para permitir a identificação e classificação dos ovócitos. Esses oócitos são então transferidos para meios de cultura específicos para maturação *in vitro*, criopreservação ou transferência imediata. A qualidade dos oócitos pode ser avaliada examinando o complexo cumulus-oócitos, que deve apresentar ooplasma uniforme, cor marrom e células do cumulus bem fechadas (Hinrichs et al., 1990).

A recuperação de oócitos pode produzir resultados diferentes dependendo dos protocolos, equipamentos e conhecimentos específicos utilizados em cada estudo. Vários fatores, incluindo terapias hormonais, a fase do ciclo estral, o tamanho do folículo e o nível de habilidade do profissional, podem impactar o sucesso da recuperação do oócito (Silva et al., 2004).

Geralmente, à medida que o folículo se desenvolve, o processo torna-se mais fácil devido ao afrouxamento das junções entre as células do cumulus e a parede folicular. No entanto, oócitos de folículos pré-ovulatórios podem ser utilizados imediatamente, sem a necessidade de maturação *in vitro*. Estudos demonstraram taxas variadas de recuperação de oócitos, com a administração de progesterona não tendo impacto significativo na taxa de recuperação. Em média, cada ovário contém cerca de 5,3 folículos medindo 5 mm de diâmetro, resultando em uma taxa de recuperação aproximada de 3,8 oócitos por folículo punccionado (Pycock, 1996; Araújo, 2015; Carnevale et al., 2001).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Três éguas, sem raça definida e entre 8 e 12 anos, que eram utilizadas como receptoras, foram selecionadas para passarem pelo processo de aspiração folicular, com o intuito dos oócitos recuperados serem utilizados no processo de clonagem de éguas com alto valor genético. Esses animais foram escolhidos por apresentarem maior número de folículos em crescimento com base nos resultados do monitoramento ultrassonográfico folicular.

Para obter analgesia e relaxamento visceral, foi administrada hioscina sódica na dose de 10 mg/kg e tartarato de butorfanol na dose de 0,01 mg/kg antes da punção folicular. Para fins de sedação, o Cloridrato de Detomidina foi administrado por via intravenosa na dose de 0,01 mg/kg. Duas doses de Flunixin Meglumina IV foram administradas às éguas na dose de 1 mg/kg cada; a primeira dose foi administrada antes do procedimento de aspiração folicular e a segunda 24 horas após o procedimento para efeito analgésico e antiinflamatório. Foi utilizado também 20.000UI/kg, IM profunda, de Benzilpenicilina Procaína por três dias, como antibiótico profilático, e caso fosse necessário poderia ser feito o uso de loimbina na dose de 0,1mg/kg, IV, como antagonista alfa.

Para se preparar para o procedimento de aspiração, os animais foram colocados de forma segura num tronco de contenção. O reto, períneo e vulva dos animais foram cuidadosamente limpos com sabão neutro em três lavagens separadas. Além disso, o rabo do animal estava amarrado a si mesmo.

Utilizando uma sonda de ultrassom equipada com sonda microconvexa de 5MHz, uma agulha 12G foi conectada a ela para puncionar e escarificar o folículo (Figura 17). A sonda foi cuidadosamente inserida por via transvaginal sob orientação de ultrassom até atingir a vizinhança do ovário. Durante a palpação transretal, o veterinário direcionou o ovário desejado para a lateral do colo do útero, posicionando-o próximo ao fundo do saco vaginal. Uma vez que as duas partes entraram em contato, a agulha foi utilizada para realizar a punção (Figura 18).

Para evitar a coagulação do material aspirado, cada folículo foi lavado múltiplas vezes (entre cinco a dez) com solução tamponada e heparina a uma temperatura de 37 °C. Simultaneamente, a sonda foi movimentada para escarificar a parede do folículo, facilitando a liberação do material aspirado e o complexo cumulus-oócitos. A pressão utilizada durante a aspiração, com o auxílio de uma bomba de vácuo, estava ajustada a 150 mmHg, onde era conectada a uma garrafa coletora de 500mL para armazenar o fluido folicular aspirado.

Figura 16 - Material utilizado.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17 - Procedimento de aspiração.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após a recuperação, o frasco de coleta foi prontamente transportado para o laboratório. Para isolar os oócitos contidos no fluido folicular, era imperativo filtrar todo o conteúdo aspirado (Figura 19). Esse processo de filtração às vezes resultava em um filtro de coleta visivelmente sanguinolento, atribuído à escarificação dos folículos, mas não afetava a qualidade dos oócitos. Posteriormente, o conteúdo folicular aspirado foi delicadamente transferido para uma placa de Petri medindo 146x21mm (Figura 20).

Figura 18 - Filtração do conteúdo aspirado



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 19 - Transferência para placa de Petri



Fonte: Arquivo pessoal.

Sob a ampliação de um estereomicroscópio ajustado para 40x, um exame minucioso foi realizado para identificar a localização precisa dos oócitos (Figura 21). Os oócitos foram categorizados com base na sua morfologia de acordo com o sistema de classificação estabelecido por Gonçalves et al. (2008). A classificação inclui quatro graus:

Grau 1: Os oócitos desta categoria apresentam um cumulus compacto com mais de três camadas de células, juntamente com ooplasma que apresenta granulação fina e homogênea. A zona pelúcida é preenchida com uma cor marrom.

Grau 2: Os oócitos neste grau podem ter uma presença parcial de cumulus compactos ao redor do oócito ou um entorno completo com menos de três camadas celulares. O ooplasma apresenta distribuição heterogênea de grânulos, com maior concentração no centro e menor coloração na periferia. Também pode aparecer como uma mancha condensada de aparência escura. O ooplasma preenche o espaço interior da zona pelúcida.

Grau 3: Os oócitos neste grau exibem um cumulus expandido. O ooplasma está contraído e degenerado, apresentando presença de vacúolos ou fragmentação com espaços entre a membrana celular e a zona pelúcida. O preenchimento do espaço perivitelino é irregular.

Grau 4: Os oócitos nesta categoria estão desnudos, sem qualquer células do cumulus.

Figura 20 - Análise no estereomicroscópio



Fonte: Arquivo pessoal.

Depois de lavados adequadamente com solução DPBS, os oócitos eram transferidos para meio específico e preparados para envase na transportadora de oócitos, que então era enviada para a clínica responsável pela clonagem.

#### 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Esse caso envolveu a coleta de oócitos de três éguas por meio de aspiração folicular, com o objetivo de utilizá-los para realização de clones. Os resultados mostraram diferenças notáveis entre as éguas em termos da quantidade de folículos aspirados e de oócitos recuperados.

Durante o exame inicial da égua 990, o ovário esquerdo produziu 7 folículos enquanto o ovário direito produziu 4 folículos, resultando num total de 11 folículos. Desta coleta, um total de 5 oócitos foram recuperados com sucesso. Conforme afirmado nas diretrizes estabelecidas por Brück et al. (1992), esta observação pode ser atribuída à distribuição desigual dos folículos dentro dos ovários, com maior concentração encontrada no ovário esquerdo. Essa assimetria

é uma ocorrência comum em equinos e pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a dominância ovariana e o tamanho do corpo lúteo.

Durante o segundo exame da égua 1333, foi observado maior número de folículos com líquido aspirado, especificamente 11 no ovário esquerdo e 9 no ovário direito. Porém, o número de oócitos obtidos foi comparativamente menor, totalizando 7. Esse resultado está de acordo com a pesquisa realizada por Carnevale et al. (2004), o que sugere uma resposta ovariana aumentada à estimulação folicular nesta égua em particular. Vários fatores, incluindo genética, idade e condição reprodutiva, podem contribuir para esse fenômeno.

No caso da terceira égua, 1205, foi aspirado um número significativamente menor de folículos, sendo apenas 2 do ovário esquerdo e 3 do ovário direito. Consequentemente, apenas 2 oócitos foram recuperados. Esses achados indicam uma resposta ovariana mais restrita nesta égua, como evidenciado pelo número limitado de folículos aspirados e oócitos recuperados. Esses resultados corroboram ainda mais a eficácia da técnica de aspiração folicular em éguas, conforme discutido por Silva et al. (2004). Fatores individuais, como a história reprodutiva da égua, idade avançada e condições de saúde, podem oferecer explicações plausíveis para estes resultados.

Vale ressaltar que os resultados desta pesquisa são consistentes com os resultados de outras publicações. Estudos anteriores esclarecem a inconsistência na reação dos ovários animal por animal devido a um conjunto de fatores contribuintes, como raça, idade, estado nutricional e controle reprodutivo (Pycock, 1996; Araújo, 2015; Carnevale et al., 2001).

## **5 CONCLUSÃO**

A aspiração folicular transvaginal, guiada por ultrassom, representa um avanço significativo na biotecnologia reprodutiva equina. Esta técnica minimamente invasiva permite a coleta de oócitos de éguas, potencializando o uso de animais com alto valor genético para programas de clonagem e outras aplicações biotecnológicas. A habilidade de realizar múltiplas aspirações em um

mesmo ciclo estral sem comprometer a fertilidade da égua é uma vantagem notável que amplia as possibilidades de aproveitamento genético.

A eficácia da aspiração folicular depende de uma série de fatores, incluindo a habilidade do operador, a qualidade do equipamento utilizado e o protocolo de aspiração. A manipulação cuidadosa dos folículos e o uso de pressões adequadas durante a aspiração são cruciais para evitar danos aos oócitos e garantir sua viabilidade para procedimentos subsequentes.

Os resultados obtidos através desta técnica são promissores, com taxas de recuperação de oócitos que permitem a realização de maturação *in vitro*, criopreservação ou transferência imediata. A classificação morfológica dos oócitos coletados é um passo fundamental para determinar sua qualidade e potencial de desenvolvimento, sendo um indicador chave para o sucesso das técnicas de reprodução assistida.

Em suma, a aspiração folicular transvaginal é uma ferramenta valiosa no campo da reprodução equina, oferecendo uma alternativa eficiente e menos invasiva para a obtenção de oócitos de qualidade. A integração desta técnica com outras biotecnologias reprodutivas tem o potencial de revolucionar a seleção genética e a preservação de linhagens equinas de valor, contribuindo para o avanço da ciência veterinária e o desenvolvimento sustentável da indústria equina.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, R.R. Estudo em larga escala dos efeitos da idade sobre os parâmetros reprodutivos e viabilidade de oócitos equinos após injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) usando sêmen sexado. 2015. 108f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus São Paulo, SP.

ARISTIZABAL, V. H. V.; GARCIA, H. D. M.; JUNIOR, J. A. D. Influence of Injection Altrenogest in Uterine Tone and Embryonic Vesicle Growth in Recipient Mares. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, n. 1, p. 157-157, 2017.

BOGH, I.B.; BRINK, P.; JENSEN, H.E. et al. Ovarian function and morphology in the mare after multiple follicular punctures. *Equine Vet. J.*, v.35, p.575-579, 2003.

BRUCK, I., STOLLA, S., AURICH, J., & AURICH, K. (1992). Transvaginal follicular aspiration in mares. *Theriogenology*, 38(2), 419-425.

CAMARGO, C. E.. A arte de inseminar éguas com sêmen congelado. *Rev. bras. reprod. anim*, p.226-230, 2023.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A. L. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 6, p. 389-398, 2008.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, D. F., CARNEVALE, A. M., FERREIRA, E. C., BARROS, M. J., & CRESCENTE, R. E. J. (2004). Comparative efficiency of transvaginal and transcuteaneous ultrasound-guided aspiration of follicles for embryo production in mares. *Animal Reproduction Science*, 80(1-2), 111-122.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J.; SILVA, M.A.C. et al. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. *Anim. Reprod. Sci.* , v.68, p.305-314, 2001.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COSTA, P. M. Reprodução equina: Técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões. São Paulo: Paco Editorial, 2014.

CROWELL-DAVIS, S. Sexual behavior of mares. *Hormones and Behavior*, v.52, pp. 12-17, 2007.

DAVIES MOREL, M. C. G. The reproductive anatomy of the mare. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. 2ed. Cambridge, CABI Publishing, 2003. cap. 1, p. 1-15.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.

FERNANDES, V. H. et al. Comparação entre duas técnicas de descongelamento de sêmen equino baseada na motilidade e vigor espermático. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 15, p. 137-138, 2017.

FRANDSON, R. D. Anatomia e fisiologia dos animais domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, p. 301-304, 1979.

GINTHER, O. J et al. Systemic and intrafollicular components of follicle selection in mares. Domestic animal endocrinology, v.59, p. 116-133, 2017.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses, livro 2. Madison: University of Wisconsin, p. 394, 1995.

GLÓRIA, I. P. A utilização da acupuntura em medicina veterinária. Dissertação (Mestrado) - Universidade Évora. Escola de Ciências e Tecnologia. Évora, 2017.

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C.; PEREZ, E. G. de A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafolliculares. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.122-132, abr./jun. 2008. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7. ed. Barueri-SP: Manole, p. 21-24,59, 193-210, 2004.

HINRICHS, K., DYKSTRA, C. F., & VARNER, D. D. (1990). Oocyte recovery by transvaginal follicle aspiration in the mare. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement, 44, 299-304.

HINRICHS, K.; KENNEY, D.F.; KENNEY, R.M. Aspiration of oocyte mature and immature preovulatory follicles in the mare. Theriogenology , v.34, p.107-112, 1990.

KANITZ, W.; BECKER, F.; ALM, H.; TORNER, H. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. Biol. Reprod. Monogr. Ser. , v.1, p.225-231, 1995.

LIMA, E. A.; BASSO, A. F.; ALBUQUERQUE, F. T. de. Exame ginecológico e acompanhamento reprodutivo em éguas. Revista Científica de Medicina Veterinária- ISSN 1679-7353. Ano XIV- Número 28, 2017.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Transferência de embriões em equinos: revisão. Acta Veterinaria Brasilica, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

LOPES, E. P. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 39, p. 223- 229, 2015.

MATEU-SÁNCHEZ, S., NEWCOMBE, J., GARCÉS-NARRO, C., & CUERVO-ARANGO, J. (2016). The period of the follicular phase during which the uterus of mares shows estrus-like echotexture influences the subsequent pregnancy rate.. *Theriogenology*, 86, 6, 1506-1515 .  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.009>.

MCCUE, PATRICK M. Transferência de embriões em equinos: recuperação do embrião. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, v. 9, n. 3, p. 94-98, 2011.

MCCUE, P. M.; SCOGGIN, C. F.; LINDHOLM, A. R. G. Estrus, cap. 179, p. 1716-1727. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, . L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine Reproduction*. 2 ed. New Delhi, Índia, John Wiley & Sons, 2011.

MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. *Equine Embryo Transfer*, 1 ed., Lexington, Kentucky, USA, Teton Newmedia, 2015.

MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Persistent anovulatory follicles in the mare, *Theriogenology*, v. 58, p. 541-543, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00769-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00769-0).

MCKINNON A.O.; SQUIRES E.L.; CARNEVALE E.M. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology* 29:1055-1063, 1988.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. 2007. Embryo transfer and related technologies, p.319-334. In: *Current Therapy Equine Reproduction*. Saunders, Missouri.

MEINTJES, M., HINRICHS, K., & VARNER, D. D. (1994). Oocyte recovery from live donor mares by transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration: technique and preliminary results. *Equine veterinary journal*, 26(3), 234-238.

MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; PAUL, J.B. et al. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in cyclic and pregnant horse and pony mares for a in vitro fertilization. *Biol. Reprod. Monogr. Ser.* , v.1, p.281, 1995a.

NEWCOMBE JR, CUERVO-ARANGO J. Comparison of the efficacy of different single doses of huserelin with hCG for timed ovulation induction in the mare. *Anim Reprod Sci*, v 41, p57, 2011.

OLIVEIRA, R. A. de. Conduzindo um garanhão de forma segura para cobertura ou colheita de Sêmen. Rev. Bras Reprod. Anim, v.45, n.1, p, 12-17, jan/mar. 2021.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JR., J. A.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; RAMIRES-NETO, C. Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino, 57 p., 2018.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine reproduction. Malvern: Lea & Febiger, 1993. p. 161-171.

PYCOCK, J. F. Recovery of oocytes using transvaginal ultrasound in the mare: current equipment, technique and applications. Arq. Fac. Vet. UFRGS, v.24, p.148-167, 1996.

PYCOCK, J.F. Ultrasonography, cap. 203, p. 1914-1921. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, . L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. Equine Reproduction. 2 ed. New Delhi, Índia, John Wiley & Sons, 2011.

RICKETS, S. W. Avaliação clínica do sistema reprodutivo. In: KNOTTENBELT, D. C. (Ed.). Medicina e cirurgia equina. São Paulo: Manole, 2008. p. 887-898.

RODRIGUES, R. Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom em equinos. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Campus de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. Manual de clínica equina. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

SAMPER JC, JENSEN S, SERGENT J. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon J Equine Vet Sci, v.22, p.320-323, 2002.

SETOGUCHI, L. S. et al. Plasma Estradiol Profile After Administration of Different Types of Estradiol Esters in Acyclic Mares. Journal of Equine Veterinary Science, v. 127, p. 104824, 2023.

SILVA, L. H. A., SÁ, J. C. de, ARAÚJO, L. H. L. DE, & FERREIRA, J. C. (2004). Intrafollicular Oocyte Aspiration Technique in Mares: A New Tool for Equine Reproductive Management. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 41(3), 204-210.

SILVA, M.A.C; CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J. et al. Oocytes transfer in mare with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. *Theriogenology* , v.61, p.705-713, 2004.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, p. 91—104, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X98002349>. Acesso em: 23 jan. 2024.

ZENT, W.W. History, cap. 200, p. 1897-1899. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, . L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. *Equine Reproduction*. 2 ed. New Delhi, Índia, John Wiley & Sons, 2011.