

EMBRIÃO PRODUZIDO POR INJEÇÃO INTRACITOPASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDE (ICSI) NA RAÇA FRIESIAN – RELATO DE CASO

EMBRYO PRODUCED BY INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) IN THE FRIESIAN BREED – CASE REPORT

**Tatiana Oliveira de Siqueira¹; Paula de Mattos Guttman²; Daniela Mello Vianna Ferrer²;
Natália Martins Bustamante Sá³; André Vianna Martins²**

RESUMO

A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI) é uma técnica avançada de reprodução assistida que tem ganhado destaque na medicina veterinária, especialmente na reprodução equina. A prática, já consolidada em humanos, vem sendo amplamente estudada e adaptada para diversas espécies, sendo fundamental para equinos de alto valor genético, esportivo ou reprodutivo. O processo envolve a injeção direta de um espermatozoide no oócito, promovendo a fertilização de forma precisa e controlada. Isso possibilita a produção de embriões viáveis, mesmo em casos em que as condições naturais de fecundação são desfavoráveis, seja por fatores relacionados à qualidade do sêmen ou à capacidade reprodutiva da fêmea. No contexto da reprodução equina, a ICSI tem se tornado uma ferramenta essencial para maximizar as chances de sucesso em éguas com dificuldades reprodutivas ou em animais de elite, cujo material genético é altamente valorizado. Além disso, o uso dessa técnica permite a conservação de linhagens genéticas por meio da produção de embriões, que podem ser vitrificados e transferidos em momentos oportunos, ampliando as possibilidades de manejo reprodutivo. A precisão dessa técnica também reduz a quantidade de sêmen necessária, o que é especialmente vantajoso em casos de sêmen escasso ou de qualidade inferior. Esse trabalho relata a produção de um embrião em uma égua Friesian de 8 anos, utilizando a técnica de ICSI, destacando as etapas do procedimento e os resultados obtidos, com ênfase na viabilidade dos folículos aspirados e no desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto.

Palavras-chave: Reprodução. Fertilização. Equinos.

ABSTRACT

Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) is an advanced assisted reproduction technique that has gained prominence in veterinary medicine, especially in equine reproduction. The practice, already consolidated in humans, has been widely developed and adapted for different species, being essential for horses with high genetic, sporting or reproductive value. The process involves the direct injection of a sperm into the oocyte, promoting fertilization in a precise and controlled manner. This makes it possible to produce viable embryos, even in cases where natural fertilization conditions are unfavourable, whether due to factors related to sperm quality or the female's reproductive capacity. In the context of equine reproduction, ICSI has become an essential tool to maximize the chances of success in waters with reproductive difficulties or in elite animals, whose genetic material is highly valued. Furthermore, the use of this technique allows the conservation of genetic lineages through the production of embryos, which can be vitrified and transferred at appropriate times, expanding the possibilities of reproductive management. The precision of this technique also reduces the amount of sperm needed, which is especially advantageous in cases of scarce or poor quality sperm. This work refers to the production of an embryo in an 8-year-old Friesian water, using the ICSI technique, highlighting the steps of the procedure and the results obtained, with emphasis on predicting the aspirated follicles and the development of the embryo up to the stage of blastocyst.

Keywords: Reproduction. Fertilization. Equine.

1 Discente de Medicina Veterinária do UNIFESO - tatyoliveira.s@live.com

2 Docente de Medicina Veterinária do UNIFESO - paulaguttman@unifeso.edu.br; danielaferrer@unifeso.edu.br; andremartins@unifeso.edu.br

3 Médica Veterinária Autônoma - nataliamartinssa@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Cavalos Friesian possuem alta taxa de consanguinidade, registrada nos controles genealógicos, sendo crucial mantê-la abaixo de 12% para evitar problemas hereditários que comprometem a reprodução (1). Originários de regiões frias, esses cavalos enfrentam desafios no Brasil devido ao clima tropical, que afeta tanto o condicionamento físico quanto a fertilidade, especialmente nas éguas importadas, que apresentam baixa taxa reprodutiva (2).

Os ovários desempenham papel central na reprodução, produzindo hormônios e gametas, as éguas atingem a puberdade entre 14 e 18 meses, marcando o início do cio (3). A idade afeta diretamente a resposta hormonal, éguas jovens apresentam respostas mais consistentes, enquanto as mais velhas enfrentam declínio na reserva ovariana, prejudicando a superovulação e a recuperação de ovócitos (4). Um manejo alimentar adequado é essencial para manter condições metabólicas ideais, que impactam o desenvolvimento folicular e a qualidade dos ovócitos, aspectos cruciais em reprodução assistida (5). Durante o ciclo estral, os ovários alternam entre crescimento e regressão folicular, sob influência do FSH, ocorre o recrutamento de uma onda de folículos, mas apenas um se torna dominante e ovula, enquanto os demais sofrem atresia, o folículo dominante libera o ovócito, captado pelas tubas uterinas para fertilização, esse processo envolve não só o crescimento folicular, mas também a seleção e maturação dos óvulos, essenciais para técnicas de reprodução assistida (6). O FSH é amplamente utilizado em protocolos de superovulação para estimular o crescimento de múltiplos folículos, após o tratamento, a administração de hCG ou deslorelina induz a ovulação (7). A deslorelina, um análogo do GnRH, promove a liberação de LH e é eficiente para controle preciso da ovulação em éguas submetidas à aspiração folicular (8). O estrogênio, produzido pelos folículos sob ação do FSH, regula o ciclo reprodutivo, desencadeia o comportamento de estro e provoca alterações fisiológicas no útero, como edema uterino, indicador do período fértil (9). Durante o estro, gestação ou transições entre períodos ovulatórios e anovulatórios, ocorrem as ondas foliculares. Elas incluem recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia. No recrutamento, vários folículos antrais crescem sob influência do FSH e, durante a seleção, apenas alguns continuam crescendo, enquanto os demais entram em atresia (4).

A contenção e preparação das éguas são etapas cruciais para a aspiração folicular: o animal é colocado em tronco de contenção e sedado para minimizar o estresse e os movimentos, o uso de analgésicos e relaxantes musculares aumenta o conforto e facilita o procedimento, a higienização do períneo com soluções antissépticas é fundamental para reduzir o risco de infecções (10).

A técnica transvaginal guiada por ultrassom é a mais utilizada, oferecendo segurança e precisão, alternativamente, podem ser aplicados métodos laparoscópicos ou trans-abdominais em casos específicos, a eficiência da coleta depende da utilização da ultrassonografia para guiar o procedimento (11). Na técnica transvaginal, um transdutor de ultrassom é inserido na vagina para localizar os folículos ovarianos, uma agulha de aspiração, conectada a um sistema de vácuo, é guiada até o folículo alvo para aspirar o líquido folicular (11). A agulha utilizada é fina, geralmente entre 18 e 20 gauge, com comprimento adaptado para alcançar os ovários em diferentes profundidades, penetrando diretamente no folículo sem causar danos excessivos ao tecido ovariano, a experiência do veterinário é crucial para maximizar a precisão no manuseio do ultrassom e na introdução da agulha, reduzindo riscos aos folículos e aumentando a taxa de recuperação de ovócitos viáveis (11). Protocolos com doses múltiplas de FSH aumentam significativamente o número de folículos em desenvolvimento, elevando a taxa de recuperação de ovócitos (4). Essa taxa varia com o tamanho e estágio de maturação dos folículos. Folículos pré-ovulatórios, maiores e mais maduros, apresentam taxas de recuperação superiores, entre 60% e 80%, pois o ovócito já está parcialmente desprendido da parede folicular, facilitando a coleta (8). O sucesso na produção de blastócitos *in vitro* é influenciado pela qualidade do sêmen utilizado, no caso do sêmen congelado, há variações entre lotes devido a fatores como idade do garanhão, características do ejaculado e efeitos do congelamento, apesar de eficaz, o congelamento pode causar danos ao DNA espermático (12). Por outro lado,

o sêmen fresco oferece maior concentração de espermatozoides viáveis, com alta motilidade e integridade celular, resultando em maior taxa de sucesso na fertilização e no desenvolvimento embrionário (13). Contudo, em situações que requerem transporte ou preservação genética, o sêmen congelado permanece uma alternativa valiosa, mesmo com taxas de fertilização reduzidas (4).

OBJETIVO

Este relato de caso tem o objetivo descrever a produção de um embrião produzido por injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) em equino da raça Friesian, envolvendo as etapas do procedimento, desde a aspiração folicular até o desenvolvimento do embrião ao estágio de blastocisto.

RELATO DE CASO

Relatos de caso dispensam a aprovação da CEUA, de acordo com o deliberado na contextualização do anexo da Resolução Normativa nº 22(25/6/2015) do CONCEA.

Esse trabalho relata o caso de uma égua Frísia de oito anos, nascida na Holanda, medindo 1.70cm de cernelha, utilizada em competições de hipismo clássico, estabelecida em uma propriedade localizada no município de São Gonçalo em sistema de criação semi-intensiva, estabulada à noite em baia e solta durante o dia em piquete. Sua dieta consistia em ração concentrada, suplementos minerais, feno e alfafa, estando em excelente estado corporal, não apresentava histórico de doenças sistêmicas, sejam eles, claudicação ou outros problemas de saúde. Não possui histórico reprodutivo. Diante do interesse dos proprietários em reproduzir o animal, optou-se pela utilização da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoide para a produção de embriões.

Para a realização do procedimento a égua foi encaminhada para o centro de reprodução, localizada no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, onde passou por preparação hormonal para estimular a maturação folicular 36 horas antes do procedimento, sendo utilizados 2500UI de hCG e 100mcg de GnRH, ambas via intravenosa, a fim de promover a maturação dos folículos ovarianos, a atividade ovariana era avaliada a cada dois dias, por meio de palpação e ultrassom. Foi palpada a cada 12 horas para acompanhar o crescimento folicular, quando apresentou folículos com diâmetro médio de 35mm e teve manifestação de estro recebeu nova dosagem de 2500UI de hCG via intravenosa. No dia do procedimento a égua foi contida em tronco de palpação e foi sedada com 5mg de detomidina e 10mg de butorfanol, ambas via intravenosa. Adicionalmente foi administrado 20mg de escopolamina, via intravenosa, a fim de diminuir os espasmos musculares e facilitar a manipulação. A cauda da égua foi enrolada, houve o esvaziamento retal e a região do períneo foi limpa com solução de clorexidina a 2%, foi inserido um transdutor transvaginal que possibilitou a observação de folículos com diâmetro médio de 35mm no ovário esquerdo, o útero se apresentava edema significativo. Foi acoplada a sonda o sistema de punção, composto por agulha de aspiração, equipo, copo coletor e bomba de vácuo responsável por promover pressão negativa. O ovário foi segurado por via transretal e a aspiração dos folículos foi feita por meio transvaginal guiada por ultrassom. Os folículos foram aspirados de ambos os ovários. No total foram aspirados 10 folículos, que foram colocados em meio de preservação ovocitária e enviados para o laboratório de reprodução animal, localizado na cidade de Mogi Mirim, São Paulo para o processo de fertilização. Após o procedimento de aspiração folicular a égua foi medicada com 1,5g de ceftiofur, por via intramuscular por 5 dias e com meloxicam por via oral por 3 dias. No dia seguinte ao procedimento a égua foi reavaliada e apresentou comportamento normal, sem sinal de dor ou complicações, não havendo intercorrências ou reações adversas relacionadas ao procedimento ou medicamentos.

O material da égua foi enviado juntamente com uma palheta de sêmen congelado de um garanhão Frísio para o laboratório responsável. Após análise, 9 ovócitos foram considerados viáveis, o que resultou em uma recuperação de 90%, no qual todos os 9 seguiram para o processo de fertilização, alcançando 100% de sucesso. Desses, 8 ovócitos passaram pela fase de clivagem e após 7 dias de cultivo, foi relatado que apenas um embrião atingiu o estágio de blastocisto, que foi considerado de excelente qualidade para a transferência. O embrião viável foi vitrificado e armazenado para transferência futura em uma égua receptora.

DISCUSSÃO

A égua do caso relatado possui de oito anos de idade, fase em que, de acordo com Ley (3), a maturidade fisiológica e reprodutiva já está bem desenvolvida, proporcionando condições ideais para responder a estímulos hormonais e técnicas reprodutivas, assim como, Ginther (4) reforça que éguas jovens apresentam melhores reservas ovarianas e taxas mais elevadas de ovócitos viáveis em comparação com animais mais velhos, um fator determinante para o sucesso do procedimento. O manejo alimentar neste caso pode ter tido influência positiva, sendo composto por ração concentrada, feno, alfafa e suplementação mineral, que de acordo com Presicce (5), o estado nutricional de um animal é um dos fatores que mais influenciam a resposta hormonal, destacando a importância de fornecer uma dieta equilibrada para garantir que os estímulos reprodutivos tenham efeitos positivos. A égua do presente relato não apresenta problemas reprodutivos, possuindo ciclicidade reprodutiva normal, o que pode influenciar positivamente na fertilidade e qualidade dos folículos, o que vai de acordo com o afirmado por Côrte (6) que destaca que a ciclicidade reprodutiva normal e a ausência de problemas reprodutivos são fatores determinantes para a qualidade dos folículos. Neste caso, para estimular a ovulação e o desenvolvimento folicular, foram administradas doses de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que de acordo com Carnevale (7) a aplicação de hCG em doses adequadas é eficaz para promover a ovulação, especialmente em éguas com histórico de dificuldades reprodutivas, enquanto Hinrichs (8) descreve o hCG como uma ferramenta de controle estratégico da ovulação em programas de aspiração folicular. Neste relato o diagnóstico do estro foi confirmado tanto pelo comportamento característico quanto pela presença de edema uterino que reforça a fase estrogênica do ciclo, que segundo Tezza e Dittrich (9) concordam que o edema uterino é um dos principais indicadores de estro em éguas, sendo um dado essencial para o planejamento do momento da aspiração folicular. A égua teve acompanhamento ultrassonográfico a cada 12 horas, para acompanhar o crescimento folicular, indo de acordo com as recomendações de Ginther (4) e Hinrichs (8), que enfatizam a importância do monitoramento contínuo dos folículos para determinar o momento ideal de intervenção.

Neste relato a égua foi submetida a contenção física e farmacológica, com o objetivo de garantir sua segurança e minimizar o estresse, facilitando a realização da aspiração folicular, que de acordo com Hinrichs (8) o uso de sedativos é amplamente reconhecido na literatura como uma combinação eficaz para promover sedação e analgesia em equinos, sendo considerado seguro para procedimentos invasivos. O uso de escopolamina neste relato de caso foi empregado para reduzir a contração dos músculos lisos do útero, com o objetivo de aumentar o conforto da égua e facilitar a execução da aspiração. Esse procedimento está de acordo com o que Hinrichs (8) afirma, destacando que a administração de antimuscarínicos, como a escopolamina, pode ajudar a relaxar a musculatura lisa uterina, promovendo condições mais favoráveis para a realização do procedimento. Neste relato foi feita a higienização adequada do períneo e o manejo da cauda, com o objetivo reduzir o risco de contaminação durante o procedimento, essa prática vai de acordo com Samper (10), que diz que essa prática é fundamental para minimizar a introdução de patógenos no trato reprodutivo da égua, prevenindo complicações infecciosas pós-procedimento. O procedimento realizado neste caso empregou a técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal, utilizando um sistema de punção composto por agulha de aspiração, equi-

pe de coleta e bomba de vácuo que vai de acordo com Dascanio e McCue (11), que aponta que o uso desses materiais está em conformidade com a técnica descrita, que é reconhecida por sua eficácia na recuperação de ovócitos. A combinação do ultrassom para localização precisa dos folículos e a aspiração controlada por vácuo garante maior eficiência e segurança, minimizando riscos para o animal e otimizando os resultados na coleta dos gametas. Houve a recuperação dos 10 folículos, com 90% de viabilidade ovocitária (9 ovócitos) demonstra que os cuidados no preparo do animal e a precisão técnica no momento da aspiração folicular foram adequados, podendo ter influência no resultado da recuperação dos folículos, que de acordo com Ginther (4) e Dascanio e McCue (11), a maturidade dos folículos, associada a um manejo reprodutivo adequado, desempenha papel crucial na taxa de recuperação de ovócitos, sendo que quando comparado com estudos anteriores de Hinrichs (8), encontramos taxas de recuperação de ovócitos variando entre 60 e 80%, podendo variar de acordo com a condição física do animal e a técnica utilizada. Neste caso, ambos os ovários foram aspirados, utilizando uma agulha fina e longa, que foi ajustada para alcançar os ovários, a aspiração foi realizada de acordo ao que aponta Dascanio e McCue (11) que cita que a possibilidade de ajuste da profundidade permite que aspiração transvaginal guiada por ultrassom seja o método mais eficaz para recuperar ovócitos em éguas, sua versatilidade de comprimento permite que ela penetre diretamente no folículo sem causar danos excessivos ao tecido ovariano circundante. No presente relato foi feito o manejo pós aspiração, onde a égua recebeu antibióticos e anti-inflamatórios para prevenir infecções e fazer o controle da dor que condizem com o recomendado por Dascanio e McCue (11) que afirmam que o uso de agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios após procedimentos invasivos, como a aspiração folicular, é essencial para prevenir infecções, controlar a inflamação e garantir o bem-estar do animal durante o processo de recuperação. Neste relato, foi utilizada uma palheta de sêmen congelado para executar a técnica de ICSI no laboratório, a partir da qual foi possível gerar um embrião viável. De acordo com Claes e Stout (12), o sêmen do garanhão influencia diretamente o sucesso na produção de blastocistos *in vitro*. Fatores como a qualidade do sêmen, a idade do garanhão e os efeitos do congelamento e armazenamento têm um impacto significativo na taxa de sucesso dessa produção.

No presente relato houve a produção de um embrião viável, demonstra que uma série de fatores influencia a quantidade final de embriões viáveis, como afirmam Martins et al. (13), destacando que a qualidade dos gametas, as condições de laboratório e os procedimentos realizados têm impacto direto no sucesso da produção de embriões viáveis. Este relato de caso foi realizado por um médico veterinário experiente e devidamente treinado, o que pode ter influenciado na eficácia do procedimento, que de acordo com Dascanio e McCue (11), quanto maior a experiência do profissional, melhor a precisão no manuseio do equipamento, o que reduz os riscos de danos aos folículos viáveis. O controle consciente da pressão de aspiração é fundamental, pois o manuseio inadequado pode resultar em uma pressão excessiva, danificando os ovócitos, enquanto uma pressão insuficiente pode levar à falha na recuperação do líquido folicular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI) tem se consolidado como uma técnica de grande relevância na reprodução assistida de equinos, especialmente para animais com alto valor genético ou que apresentam desafios reprodutivos. No caso da égua Friesian avaliada, a produção de um embrião no estágio de blastocisto, mesmo diante de condições como a ausência de histórico reprodutivo e o envolvimento em competições esportivas, destaca a eficácia e o potencial da técnica. A ICSI oferece vantagens importantes, como a maximização do uso de gametas, a superação de barreiras reprodutivas e a possibilidade de preservação de embriões por vitrificação, o que proporciona maior flexibilidade no manejo reprodutivo. Contudo, seu alto custo, a necessidade de infraestrutura adequada e a demanda por profissionais altamente capacitados ainda representam desafios à sua ampla implementação. Assim, conclui-se que a técnica de ICSI é uma ferramenta inovadora e promissora para a

reprodução equina, contribuindo significativamente para a preservação genética, o melhoramento de características desejáveis e o aumento das taxas de sucesso em programas reprodutivos de alta performance. Com o contínuo avanço tecnológico e a capacitação de profissionais, espera-se que sua aplicação seja cada vez mais acessível e difundida, consolidando sua relevância na medicina veterinária e na indústria equina. A técnica de ICSI se mostrou eficiente na produção de um embrião nesse animal da raça friesian.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao UNIFESO pelo suporte e pela infraestrutura oferecida, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto e para a realização das etapas práticas e de pesquisa necessárias ao sucesso deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. KFPS. Koniglijke Vereniging Het Friesch Paarden Stamboek. Fokdoel. 2021. [acesso em 23 abr. 2024]. Disponível em: <https://kfps.nl/fokdoel>.
2. Fernandes, C. Conheça o cavalo friesian, raça elegante que custa até R\$ 500 mil: entrevista. [5 de junho, 2022]. São Paulo: Globo Rural. Entrevista concedida a André Ganc.
3. Ley WB. *Reprodução em éguas para veterinários de equinos*. 1ªed. São Paulo: Roca; 2006. P.240.
4. Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: Basic and applied aspects. 1ª ed. **Cross Plains, Wisconsin**: Equiservices Publishing; 1992. P.90.
5. Presicce G. Reproductive technologies in buffalo and other farm animals. In: Presicce G, ed. *Reproductive technologies in animals*. Londres: Academic Press; 2020. P. 233-259.
6. Côrte L. Controle do desenvolvimento folicular na égua através da ultra-sonografia. *Ciência Rural*, Santa Maria, 1993; 23:221-225.
7. Carnevale EM. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. [acesso 25 set 2024]. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432004000545?via%3Dihub>>
8. Hinrichs K. Techniques for equine cloning. *Reproduction, Fertility, and Development*, Melbourne, 2005; 17(6):799-805.
9. Tezza LB, Dittrich JR. Reprodução em equinos. [acesso em 16 abr. 2024]. Disponível em: <https://doceru.com/doc/vvv8cn>.
10. Samper JC. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2ª ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. P.416.
11. Dascanio J, McCue P. Equine reproductive procedures. 2ª ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2021. P.672.
12. Claes A, Stout TAE. Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*. 2022; 187:215-218.
13. Martins C, Silva A, Rumpf R. Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na redução dos bovinos. Brasília: EMBRAPA; 2002. P.23.