

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

AMANDA MOREIRA LIMA MARQUES DE BARROS  
EDMAURO DE OLIVEIRA LINS  
ROMULO DUTRA SALES

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES EM EQUINOS: DESAFIOS, AVANÇOS E  
PERSPECTIVAS**

RECIFE/2023.

AMANDA MOREIRA LIMA MARQUES DE BARROS

EDMAURO DE OLIVEIRA LINS

ROMULO DUTRA SALES

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES EM EQUINOS: DESAFIOS, AVANÇOS E  
PERSPECTIVAS**

Monografia apresentada ao Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Professor Orientador: José Carlos Ferreira da Silva

**RECIFE/2023.**

Ficha catalográfica elaborada pela  
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

B277a Barros, Amanda Moreira Lima Marques de.  
Avaliação da produção *in vitro* de embriões em equinos: desafios, avanços e perspectivas/ Amanda Moreira Lima Marques de Barros; Edmauro de Oliveira Lins; Romulo Dutra Sales. - Recife: O Autor, 2023.  
26 p.

Orientador(a): Dr. José Carlos Ferreira da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2023.

Inclui Referências.

1. Cavalo. 2. Reprodução. 3. Embrião. I. Lins, Edmauro de Oliveira. II. Sales, Rômulo Dutra. III. Centro Universitário Brasileiro. - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 619

# **Ficha Catalográfica**

Àqueles que nos inspiram a perseguir o conhecimento e a excelência, dedicamos...

Esta obra é dedicada, em primeiro lugar, às magníficas criaturas que são o foco central de nosso estudo: os equinos. Estes animais majestosos, com sua força, graça e espírito resiliente, têm sido uma fonte de inspiração e admiração ao longo de nossa jornada acadêmica.

Aos nossos mentores e professores, que com sua sabedoria, paciência e orientação incansável, moldaram nosso entendimento e paixão pela medicina veterinária. Sua dedicação não apenas ao nosso desenvolvimento acadêmico, mas também ao nosso crescimento pessoal, será sempre lembrada e valorizada.

Às nossas famílias e amigos, por seu amor incondicional, apoio constante e compreensão nas inúmeras horas dedicadas a este trabalho. Vocês são a base sobre a qual construímos nossos sonhos e aspirações.

Por fim, dedicamos este trabalho a todos os entusiastas e profissionais do universo equestre. Que este estudo contribua, mesmo que modestamente, para a melhoria contínua do bem-estar e da gestão dos equinos, que tanto enriquecem nossas vidas.

**DEDICAMOS...**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, elevamos nossa gratidão a Deus, fonte de toda sabedoria e força, por nos guiar ao longo desta jornada acadêmica. Seu amparo esteve presente em cada desafio, cada descoberta e em cada passo que demos em direção à conclusão deste trabalho. A Ele, somos gratos pela saúde, perseverança e inspiração.

Em segundo lugar, expressamos nossa mais sincera gratidão às nossas famílias. O apoio, amor e compreensão que nos ofereceram foram a base sólida em nossa caminhada. Sem sua paciência, encorajamento e sacrifícios, os obstáculos seriam intransponíveis e as vitórias, menos doces. Vocês são os verdadeiros heróis desta conquista.

Aos nossos professores e à instituição de ensino, nosso profundo agradecimento. Vossas orientações, conhecimento e dedicação não apenas moldaram nosso entendimento acadêmico, mas também nos incentivaram a buscar a excelência. A estrutura e os recursos providenciados pela instituição foram fundamentais para o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho.

Um agradecimento especial aos diversos profissionais do setor equestre que colaboraram e contribuíram com suas experiências práticas e conhecimentos valiosos. Sua participação enriqueceu significativamente nossa pesquisa, fornecendo uma perspectiva aplicada que é essencial em nosso campo de estudo.

Por fim, mas não menos importante, expressamos nossa gratidão aos equinos. Estes seres majestosos não foram apenas o objeto de nosso estudo, mas também uma fonte constante de inspiração e admiração. A cada interação, reforçaram a importância e a beleza do vínculo entre humanos e animais, inspirando-nos a contribuir, através deste trabalho, para o seu bem-estar e cuidado.

Muito Obrigado!!!

“Um poema tanto mais belo é quanto mais parecido for com o cavalo. Por não ter nada de mais nem nada de menos é que o cavalo é o mais belo ser da Criação”

**Mario Quintana**

## **Avaliação da produção in vitro de embriões em equinos: desafios, avanços e perspectivas**

Amanda Moreira Lima Marques de Barros<sup>1</sup>

Edmauro de Oliveira Lins<sup>1</sup>

Romulo Dutra Sales<sup>1</sup>

José Carlos Ferreira da Silva<sup>2</sup>

**Resumo:** A Produção In Vitro de Embriões (PIVE) é uma técnica de reprodução assistida que permite a multiplicação de animais de elevado mérito genético em um curto intervalo de tempo. No entanto, apesar de ser bem estabelecida em bovinos, ainda está em estágio experimental em equinos. Por esse motivo, objetivou-se investigar os principais desafios tecnológicos e biológicos associados à produção in vitro de embriões na espécie equina. Para isso, foi realizada uma revisão sistemática, abrangendo estudos publicados nos últimos cinco anos em bases de dados acadêmicas renomadas. A metodologia envolveu a seleção de artigos através de descritores específicos, com uma avaliação rigorosa dos estudos selecionados para garantir a robustez da análise. Nos equinos, a PIVE enfrenta desafios técnicos e biológicos distintos. Tecnicamente, a aspiração folicular ovariana e a maturação oocitária in vitro apresentam dificuldades devido às características únicas do sistema reprodutivo equino. Biologicamente, a baixa taxa de desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões gerados são desafios cruciais. Estes desafios são agravados pela variabilidade interindividual e pela sensibilidade dos equinos aos procedimentos de manipulação. Por esse motivo, as avaliações embrionárias são importantes, tendo em vista permitirem uma melhor compreensão do desenvolvimento embrionário. A análise morfológica, juntamente com as avaliações moleculares, transcriptômica, proteômica e a metabolômica, são utilizadas para avaliar a viabilidade e qualidade dos embriões. Estes métodos fornecem insights valiosos sobre as etapas críticas do desenvolvimento embrionário e podem ajudar a melhorar as taxas de sucesso da PIVE. As perspectivas futuras para a PIVE em equinos são promissoras. A técnica tem potencial para revolucionar a reprodução assistida em equinos, especialmente em termos de conservação de espécies e melhoramento genético. A pesquisa contínua e o desenvolvimento de novas tecnologias são fundamentais para superar os desafios existentes e aumentar a eficácia da PIVE em equinos. Finalmente é possível admitir que a PIVE terá um papel crucial na reprodução equina, contribuindo para a conservação da biodiversidade, melhoramento genético e compreensão da fisiologia reprodutiva equina.

**Palavras-Chave:** Cavalos. reprodução. embrião.

---

Graduando em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA

E-mail: [amandamrbarros@gmail.com](mailto:amandamrbarros@gmail.com); [edmaurolins@gmail.com](mailto:edmaurolins@gmail.com); [romulodutra9@gmail.com](mailto:romulodutra9@gmail.com)

<sup>2</sup>Professor da UNIBRA. Dr. E-mail: [jose.ferreira@grupounibra.com](mailto:jose.ferreira@grupounibra.com)

## **Evaluation of in vitro embryo production in equine: challenges, advances and perspectives**

Amanda Moreira Lima Marques de Barros<sup>1</sup>

Edmauro de Oliveira Lins<sup>1</sup>

Romulo Dutra Sales<sup>1</sup>

José Carlos Ferreira da Silva<sup>2</sup>

**Abstract:** In Vitro Embryo Production (IVEP) is an assisted reproduction technique that allows the multiplication of animals with high genetic merit in a short period of time. However, despite being well-established in cattle, it is still in the experimental stage in equines. For this reason, the aim was to investigate the main technological and biological challenges associated with in vitro embryo production in the equine species. To this end, a systematic review was conducted, covering studies published in the last five years in renowned academic databases. The methodology involved the selection of articles using specific descriptors, with a rigorous evaluation of the selected studies to ensure the robustness of the analysis. In equines, IVEP faces distinct technical and biological challenges. Technically, ovarian follicular aspiration and in vitro oocyte maturation present difficulties due to the unique characteristics of the equine reproductive system. Biologically, the low rate of embryonic development and the quality of the generated embryos are crucial challenges. These challenges are exacerbated by interindividual variability and the sensitivity of equines to manipulation procedures. For this reason, embryonic evaluations are important, as they allow for a better understanding of embryonic development. Morphological analysis, along with molecular, transcriptomic, proteomic, and metabolomic evaluations, are used to assess the viability and quality of embryos. These methods provide valuable insights into the critical stages of embryonic development and can help improve the success rates of IVEP. The future prospects for IVEP in equines are promising. The technique has the potential to revolutionize assisted reproduction in equines, especially in terms of species conservation and genetic improvement. Continuous research and the development of new technologies are fundamental to overcoming existing challenges and increasing the efficacy of IVEP in equines. Finally, it is possible to admit that IVEP will play a crucial role in equine reproduction, contributing to the conservation of biodiversity, genetic improvement, and understanding of equine reproductive physiology.

**Keywords:** Horse. Reproduction. embryo.

---

Graduando em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA

E-mail: [amandamrbarros@gmail.com](mailto:amandamrbarros@gmail.com); [edmaurolins@gmail.com](mailto:edmaurolins@gmail.com); [romulodutra9@gmail.com](mailto:romulodutra9@gmail.com)

<sup>2</sup>Professor da UNIBRA. Dr. E-mail: [jose.ferreira@grupounibra.com](mailto:jose.ferreira@grupounibra.com)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Industria Equestre.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Equinos</b>	<b>15</b>
3.2.1	Inseminação Artificial.....	15
3.2.2	Transferência de Embriões.....	16
3.2.3	Produção in Vitro de Embriões.....	17
3.2.4	Avaliação Embrionária.....	22
3.2.5	Avaliação Molecular.....	24
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie equina tem desempenhado papel de destaque, tanto sob o ponto de vista social quanto econômico, ao longo da história da humanidade. Em diversos países, os cavalos representam uma parte significativa do patrimônio cultural, sendo considerados até mais importantes do que os animais de estimação (Raub, 2018; Genchev; Gray; Wert-Gray, 2018/2019).

O setor equestre no Brasil, além de fazer parte das atividades tradicionais utilizadas no meio rural, impulsiona o turismo, os esportes e, mais recentemente, participa de atividades terapêuticas com esses animais (Sales, 2018; Pereira; Bataglion; Mazo, 2020; Goretti, 2021). O mercado equestre contribui significativamente para o agronegócio por aumentar a oferta de empregos e a geração de receitas com as atividades de competições e comércio de animais (Maciel; Moraes, 2023).

A história da reprodução assistida em equinos, como em outras espécies, tem evoluído rapidamente, especialmente no século atual (Landim-Alvarenga *et al.*, 2018; Squires, 2019). A inseminação artificial (IA) foi a primeira biotécnica a ser utilizada na espécie equina ainda no início do século XX (Galli *et al.*, 2018; Squires, 2020). A partir da segunda metade desse mesmo século, os avanços das pesquisas contribuíram para o desenvolvimento de novas biotécnicas, como a transferência de embriões em equinos (TE) que foi realizada pela primeira vez na década de 1970 e mais recentemente a produção *in vitro* de embriões (PIVE), a qual tem permitido uns avanços importantes no entendimento da fisiologia reprodutiva equina (Gomes *et al.*, 2019; Tkachev; Tkacheva; Guttyj, 2019; Lazzari *et al.*, 2020).

A PIVE, apesar de estabelecida e utilizada em larga escala na espécie bovina em equinos ainda se encontra praticamente em estágio experimental (Morris, 2018; Stout, 2020). Esse progresso histórico não somente reflete o crescimento tecnológico, mas evidencia a possibilidade das biotécnicas contribuírem para melhoria da eficiência reprodutiva, da conservação genética na espécie equina, além de superar problemas de infertilidade quando é utilizada a monta natural (Galli *et al.*, 2018; Carnevale; Metcalf, 2019; Squires, 2020).

A PIVE é uma biotécnica que permite a fecundação entre os gametas ocorra em ambiente artificialmente controlado (Hinrichs, 2018; Urías-Castro; Boeta-Acosta, 2022; Cabeza; Gambini, 2023; Lewis *et al.*, 2023). De forma resumida, essa biotécnica é constituída de diversas etapas, iniciando com a aspiração folicular ovariana guiada por ultrassom (Claes; Stout, 2022; Clutton-Brock; Cuervo-Arango; Arrondo, 2023). No laboratório, os oócitos são selecionados e incubados em estufa de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, os oócitos são novamente

avaliados para a seleção daqueles que apresentarem as características sugestivas de maturação. Imediatamente após esse período, os espermatozoides são preparados e colocados junto aos oócitos para ocorrer a fecundação. Depois da possível fecundação, os presumíveis zigotos são cultivados até alcançarem estágios embrionários passíveis de serem transferidos para o útero das éguas receptoras ou criopreservados (Carnevale; Metcalf, 2019; Brom-de-Luna *et al.*, 2019; Claes; Stout, 2022; Foss, 2022; Lewis *et al.*, 2023; Poggi; Ambrojo, 2023).

Estudar a PIVE em equinos é justificável devido os desafios e limitações impostas pelas peculiaridades reprodutivas inerentes a essa espécie, bem como a sua importância econômica e cultural. Diante desse cenário, o objetivo desse trabalho foi investigar os principais desafios tecnológicos e biológicos associados à PIVE em equinos, analisando os gargalos que influenciam negativamente a eficiência dessa biotécnica. Além disso pretende-se explorar métodos potenciais e inovações tecnológicas que poderiam melhorar a eficiência e o sucesso da PIVE na espécie equina.

## 2 METODOLOGIA

Para a realização desta revisão sistemática, adotamos uma metodologia meticulosa e atualizada. Inicialmente, focamos em artigos científicos redigidos em inglês, português ou espanhol que abordassem especificamente o tema "Produção In Vitro de Embriões em Equinos", restringindo a busca aos trabalhos publicados nos últimos cinco anos, visando a relevância e atualidade das informações.

A pesquisa foi conduzida através de renomadas bases de dados acadêmicas, incluindo PubMed, ScienceDirect, Scopus, Web of Science e Google Scholar. Utilizamos uma estratégia de busca detalhada, empregando uma combinação de descritores e palavras-chave cuidadosamente selecionadas. Os descritores utilizados incluíram "PIVE", "equinos", "fecundação in vitro", "maturação oocitária equina", e "cultura embrionária equina". Para garantir uma cobertura ampla e precisa do tema esses descritores também foram utilizados em inglês e espanhol.

Durante a fase de seleção dos estudos, os títulos e resumos foram criteriosamente avaliados por dois revisores independentes, a fim de assegurar um rigor metodológico na escolha dos artigos. A extração de dados foi realizada utilizando-se um formulário padronizado, que capturou informações essenciais como autores, ano de publicação, objetivos do estudo, metodologia empregada, principais achados e conclusões. Além disso, avaliamos a qualidade metodológica dos estudos, o que contribui para a robustez de nossa análise.

Os dados coletados foram então organizados em categorias temáticas relevantes, permitindo uma análise profunda das tendências atuais, dos resultados mais significativos e das lacunas ainda presentes na pesquisa sobre PIVE em equinos. Finalmente, a revisão foi composta de maneira lógica e coerente, abarcando desde a introdução ao tema, passando pela metodologia, resultados, discussão e considerações finais. Essa abordagem cuidadosa assegura a imparcialidade e a aderência estrita às evidências coletadas, resultando em uma revisão sistemática rigorosa, transparente e atualizada sobre a produção in vitro de embriões na espécie equina.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Indústria Equestre

A indústria equestre desempenha um papel significativo na economia global e apresenta características únicas em cada região. Este setor não só contribui economicamente através da criação, treinamento, comércio e competições de cavalos, como também exerce impacto cultural e social (Grice *et al.*, 2018; White-Lewis, 2020; Vershinina *et al.*, 2021).

A indústria equestre é diversificada e mundialmente abrange desde o turismo equestre até o hipismo competitivo de alto nível (Notzke, 2019; Radmann; Hedenborg; Broms, 2021). Países como Estados Unidos, Reino Unido, Alemanha e Austrália são notáveis por suas robustas indústrias equestres que contribuem significativamente com a economia. Nos EUA, a indústria equestre gera bilhões de dólares anualmente e emprega centenas de milhares de pessoas em várias funções que abrangem desde a criação e treinamento dos animais até setores de suporte, como nutrição e cuidados veterinários (Radmann; Hedenborg; Broms, 2021).

No Brasil, a indústria equestre tem crescido em importância por se destacar na criação de várias raças, notadamente o Mangalarga Marchador, o Puro Sangue Lusitano e o Quarto de Milha. Apesar dessa importância, a equinocultura brasileira ainda é um mercado em expansão que apresenta valor econômico expressivo impulsionado por atividades como cavalgadas, rodeios, corridas e esportes equestres (Lima; Cintra, 2016). Além disso, o setor equestre brasileiro contribui significativamente na geração de empregos diretos e indiretos.

Um dos principais desafios para a indústria equestre nas esferas global e brasileira é a manutenção do bem-estar animal, exigindo práticas adequadas de manejo e cuidados veterinários de qualidade (Silva *et al.*, 2021). Além disso, a sustentabilidade ambiental emerge como um fator crítico tendo em vista a necessidade de vastas áreas de terra para criação e treinamento dos animais (Sturn; Lima; Ribeiro, 2018).

Em termos de oportunidades, a crescente popularidade do turismo equestre e dos esportes hípicas, juntamente com o avanço tecnológico na medicina veterinária e na genética, abre novas portas para o crescimento e a inovação dentro da indústria (Sanmartín Sánchez *et al.*, 2020).

## 3.2 Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Equinos

### 3.2.1 Inseminação Artificial

A IA em equinos representa uma técnica progressivamente popular na reprodução assistida dessa espécie (Ferreira *et al.*, 2018). As vantagens da IA com sêmen congelado ou até mesmo resfriado são consideráveis por permitir a utilização do sêmen de garanhões em locais geograficamente distantes e assim aumentar o pool genético disponível e aprimorar a qualidade genética do plantel (Ferreira-Silva *et al.*, 2018ab; Ferreira *et al.*, 2019; Sales *et al.*, 2019). Além disso, diminui significativamente o risco de doenças sexualmente transmissíveis e lesões decorrentes do acasalamento natural. Do ponto de vista de gestão reprodutiva, a IA facilita o planejamento e aumenta o controle sobre o processo reprodutivo, permitindo múltiplas inseminações durante a estação de reprodução (Sales *et al.*, 2018).

No entanto, algumas associações de raça possuem regulamentos específicos referentes à IA, o que pode restringir seu uso em certos contextos. A conservação, refrigeração ou congelamento, e o transporte do sêmen são etapas que requerem atenção especial, pois são cruciais para manter a viabilidade do material genético (Sales *et al.*, 2019). Ademais, é importante destacar que, em comparação a outras espécies domésticas, as taxas de sucesso da IA em equinos são relativamente mais baixas, exigindo manejo, conhecimento técnico e infraestrutura especializados para otimizar os resultados (Kowalczyk; Czerniawska-Piątkowska; Kuczaj, 2019; Fanelli *et al.*, 2023).

Essa técnica envolve a coleta de sêmen do garanhão, seguida pela sua inserção no útero da égua o mais próximo do momento da ovulação (Ferreira-Silva *et al.*, 2018/2019). As vantagens da IA sobre o acasalamento natural abrangem desde a ampliação das possibilidades genéticas até a prevenção de doenças transmissíveis e a minimização de riscos físicos para os animais envolvidos (Pandey *et al.*, 2022). A coleta de sêmen é geralmente realizada com vagina artificial e as avaliações macroscópica e microscópica que definem a qualidade do sêmen são efetuadas, imediatamente após a coleta (Greiser *et al.*, 2020; Medica; Lambourne; Aitken, 2023).

Dentre os parâmetros seminais avaliados, a motilidade, a concentração e a morfologia espermática são imprescindíveis para determinar sua viabilidade (Ferreira *et al.*, 2018/2019; Ferreira-Silva *et al.*, 2018ab; Sales *et al.*, 2019/2019; Harris *et al.*, 2023). As éguas devem ter o ciclo estral diariamente monitorado com ultrassonografia e quando possível utilizar parâmetros hormonais para complementar o exame físico com relação ao desenvolvimento

folicular para serem inseminadas o mais próximo possível da ovulação (Ferreira-Silva *et al.*, 2019; Claes; Stout, 2022).

A IA deve ser realizada depositando-se o sêmen no útero ou mais próximo possível da entrada das tubas uterinas, ressaltando-se que o sucesso dessa biotécnica depende da qualidade do sêmen e da sincronia da inseminação com a ovulação da égua (Ferreira-Silva *et al.*, 2019; Orsolini; Meyers; Dini, 2021). É permissível comentar ainda que a IA é uma ferramenta importante na indústria equestre porque, entre outros tantos motivos, permite a conservação de linhagens genéticas privilegiadas, fato que aumenta a popularização dessa biotécnica, solidificando ainda mais seu papel vital na reprodução equina (Carnevale; Metcalf, 2019; Lazzari *et al.*, 2020).

### 3.2.2 Transferência de Embriões

A transferência de embriões (TE) na espécie equina é uma biotécnica importante da área de reprodução porque contribui significativamente para a propagação de material genético superior para a melhoria dos animais (Ferreira-Silva *et al.*, 2019; Dordas-Perpinya; Bruyas, 2019; Squires, 2020; Allen; Wilsher, 2020). Segundo Nieto-Olmedo *et al.* (2020), a TE permite ainda que uma égua portadora de caracteres genéticos importantes produza vários embriões numa estação reprodutiva. Adicionalmente, permite que éguas senis ou com problemas reprodutivos ainda possam contribuir geneticamente por meio da transferência de seus embriões para receptoras (Pietrani; Losinno; Arango, 2019).

O programa de TE numa propriedade tem início com a seleção cuidadosa das éguas doadoras de alto valor genético e receptoras após exame ginecológico que consta de cuidadosa anamnese para avaliar tanto o histórico de fertilidade quanto a regularidade do ciclo estral (Dordas-Perpinya; Bruyas, 2019; Ferreira-Silva *et al.*, 2019). Além disso, é avaliada a condição da saúde genital das éguas examinando-se vulva, vagina, útero e ovários por palpação retal e ultrassonografia tanto pelo modo convencional quanto, mais recentemente, pelo modo color doppler, o qual tem contribuído para uma avaliação mais precisa da capacidade reprodutiva das éguas (Azevedo *et al.*, 2021; Sales *et al.*, 2021).

A TE é também conhecida como produção *in vivo* de embriões porque a fecundação ocorre na tuba uterina e o desenvolvimento dos embriões no útero da égua após a monta natural ou inseminação artificial (Dordas-Perpinya; Bruyas, 2019). Decorridos sete a oito dias da ovulação, a égua doadora, sincronizada com a receptora, é submetida a lavagem uterina para recuperação do embrião que poderá ser imediatamente transferido para a égua receptora

que se encontra obrigatoriamente no mesmo período do ciclo estral da doadora ou será congelado para ser utilizado em momento oportuno (Ferreira-Silva *et al.*, 2019; Pietrani; Losinno; Arango, 2019; Nieto-Olmedo *et al.*, 2020).

Apesar da importância dessa biotécnica ela ainda apresenta alguns desafios tendo em vista que as taxas de recuperação embrionária podem variar consideravelmente e nem todos os embriões coletados serão viáveis para transferência ou congelamento (Squires *et al.*, 2020; Urías-Castro; Boeta-Acosta, 2022). Adicionalmente, o procedimento exige habilidade técnica especializada e infraestrutura adequada para realização da coleta e rastreio dos embriões, além do brete de contenção animal (Squires, 2019).

De um modo geral, a produção *in vivo* de embriões em equinos é uma ferramenta poderosa para o avanço genético e reprodutivo na indústria equestre. Com as contínuas melhorias das técnicas de manejo reprodutivo, sincronização de ciclo e na preservação de embriões, esta técnica deve manter-se em uma posição de destaque dentro das biotecnologias reprodutivas utilizadas na espécie equina.

### 3.2.3 Produção *in Vitro* de Embriões

A PIVE em equinos, evoluindo das primeiras experimentações para uma prática sofisticada e estabelecida, representa um desenvolvimento notável da reprodução assistida (Squires, 2020). A história da PIVE evidencia que a década de 1970 foi marcada como um período de intensas pesquisas na área da reprodução assistida nos equinos, mesmo com resultados iniciais bastante modestos quando comparados com os obtidos em bovinos (Dijkstra *et al.*, 2020; Lazzari *et al.*, 2020). Os primeiros trabalhos focaram na superação dos desafios relacionados à coleta e a maturação dos oócitos, bem como concernentes a fecundação e ao cultivo *in vitro* dos embriões (Morris, 2018; Galli *et al.*, 2018). Todavia, devido as peculiaridades anatomofisiológicas dos equinos e as exigências para ofertar condições adequadas para o cultivo *in vitro* dos oócitos e embriões, os avanços iniciais foram limitados (Morris, 2018; Landim-Alvarenga *et al.*, 2018).

Somente na década de 1980 é que foram obtidos consideráveis progressos com a PIVE em equinos ao serem utilizadas técnicas mais eficazes para coletar oócitos e condições mais adequadas para maturar *in vitro* os oócitos (Allen; Wilsher, 2020). Avanços importantes ocorreram na década de 1990, particularmente no que concerne à fecundação *in vitro* e ao cultivo de embriões (Poggi; Ambrojo, 2023). Durante esse período, houve um melhor entendimento das condições de cultivo ideais, como os requisitos nutricionais dos embriões

equinos (Cuervo-Arango; Claes; Stout, 2019; Claes; Stout, 2022). Além disso, começaram a ser utilizadas técnicas de manipulação de gametas, como a ICSI que aumentou as possibilidades de fecundação com espermatozoides de menor viabilidade (Brom-de-Luna *et al.*, 2019/2021).

As pesquisas mais recentes concentram-se em otimizar as condições de maturação e cultivo dos oócitos e embriões, além da implementação de técnicas como a criopreservação que visa a longevidade e viabilidade dos embriões (Claes *et al.*, 2019; Hinrichs, 2020). Nesse contexto, é possível observar que desde o início do século XXI, a PIVE nessa espécie foi beneficiada com os avanços tecnológicos tendo em vista a melhoria da qualidade dos embriões produzidos e do número de gestações confirmadas (Hinrichs, 2020; Umair *et al.*, 2023).

Além disso, a integração de novas tecnologias moleculares e genômicas tem proporcionado um entendimento mais aprofundado dos mecanismos biológicos subjacentes à embriogênese e ao desenvolvimento inicial (Bastos *et al.*, 2019; Fernández-Hernández *et al.*, 2020; Ishak *et al.*, 2022; Podico *et al.*, 2023). Por sua vez, esse progresso está sendo responsável para aprimorar a seleção e a avaliação de embriões com resultados positivos da PIVE. Essa biotécnica consiste em várias etapas, como coleta e maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) cultivo *in vitro* dos embriões, culminando com a transferência do embrião para a receptora ou com sua criopreservação para uso futuro (Galli *et al.*, 2018; Morris, 2018; Felix *et al.*, 2022; Campos-Chillon; Altermatt, 2023).

A coleta de oócitos, além de ser um momento crítico da PIVE é sua primeira etapa porque a qualidade e a viabilidade dos oócitos coletados são fundamentais para o sucesso das demais etapas dessa biotécnica (Cuervo-Arango *et al.*, 2019; Claes; Stout, 2022). Os oócitos são obtidos de folículos ovarianos de éguas doadoras por aspiração folicular guiada por ultrassom ou através de ovários obtidos em matadouros, geralmente utilizados para pesquisa (Bols; Stout, 2018; Castañeira *et al.*, 2023).

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom é uma técnica minimamente invasiva que pode ser realizada tanto nas éguas em estro natural quanto em animais tratados com protocolos hormonais para estimular o desenvolvimento folicular. O protocolo hormonal é frequentemente aplicado para sincronizar o ciclo estral e induzir a formação de múltiplos folículos para potencializar o aumento do número de oócitos a serem recuperados (Bols; Stout, 2018). O monitoramento do desenvolvimento folicular pela ultrassonografia é fundamental para determinar o momento ideal para a aspiração folicular (Ginther, *et al.*, 2018; Duval *et al.*, 2022).

Durante a aspiração folicular guiada por imagens ultrassonográficas, uma agulha é inserida nos folículos através da parede vaginal (Cuervo-Arango; Claes; Stout, 2019). O conteúdo folicular é aspirado e os oócitos são recuperados do fluido folicular, ressaltando-se que esse procedimento requer habilidade e precisão para maximizar a recuperação de oócitos viáveis sem causar danos significativos aos folículos ou a égua. Os oócitos equinos são particularmente sensíveis ao manuseio e às condições ambientais, exigindo manipulação cuidadosa e meios de cultura otimizados (Hinrichs, 2020). Além disso, existe variabilidade individual em responder aos protocolos hormonais e a eficiência da recuperação de oócitos podem afetar significativamente o sucesso da PIVE (Hinrichs, 2020; Metcalf *et al.*, 2020).

Após a coleta, os oócitos são cuidadosamente lavados e avaliados quanto à sua maturidade e qualidade. Apenas os oócitos de boa qualidade são selecionados para a MIV, na qual completam a primeira divisão meiótica e preparam o oócito para a fecundação (Spacek; Carnevale, 2018). Essa etapa é realizada em condições de laboratório que tentam mimetizar o ambiente folicular, com o uso de meios de cultura específicos que suportam o crescimento e a maturação. A MIV é a fase da PIVE que permite os oócitos imaturos, coletados de folículos ovarianos, atingirem tanto a maturidade citoplasmática quanto a nuclear necessária para a fecundação bem-sucedida (Spacek; Carnevale, 2018; Lewis *et al.*, 2020).

O meio de maturação dos oócitos geralmente contém hormônios, como o FSH e o LH, além de outras substâncias que promovem a maturação do oócito, como o ácido hialurônico e a cisteamina (Angel *et al.*, 2020). Um dos principais desafios da MIV de oócitos equinos é alcançar taxas consistentes de maturação e subsequente desenvolvimento embrionário. Os oócitos de éguas têm características únicas em comparação com os de outras espécies, como um tempo prolongado de maturação e uma sensibilidade maior a variações no ambiente de cultivo (Fernández-Hernández *et al.*, 2020). Além disso, a eficiência da MIV pode ser influenciada por fatores como idade da égua, condição dos folículos e técnicas de coleta utilizadas (Cuervo-Arango; Claes; Stout, 2019; Agnieszka *et al.*, 2021).

Para otimizar a MIV de oócitos equinos, outros fatores também devem ser cuidadosamente controlados. Dentre eles, a composição e o pH do meio de cultura, a atmosfera de incubação (níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), temperatura e o tempo de maturação (Campos-Chillon; Owen; Altermatt, 2019; Ramírez-Agámez *et al.*, 2023). Normalmente, os oócitos são incubados por cerca de 24 a 30 horas, mas este período pode variar dependendo das características individuais de cada oócito e das condições específicas de cultivo (Morris, 2018).

Avanços contínuos para a otimização do meio de maturação e das condições de cultivo são essenciais para melhorar o sucesso dessa técnica. O progresso na MIV em equinos, não somente aprimora as técnicas de reprodução assistida na medicina veterinária, mas também proporciona insights valiosos para a pesquisa reprodutiva e biotecnológica em geral (Lewis *et al.*, 2020).

Uma vez maturados, os oócitos são expostos aos espermatozoides previamente capacitados para ocorrer a fusão entre os gametas (Metcalf *et al.*, 2020). Em equinos, essa etapa da FIV representa um grande desafio pela complexidade de serem obtidos resultados satisfatórios de fecundação em decorrência dos espermatozoides terem mais dificuldade para penetrarem na zona pelúcida do oócito quando comparada com a de outras espécies. Por essa razão, o ambiente de cultivo precisa fornecer os nutrientes necessários e manter as condições físico-químicas ideais, como pH e osmolaridade apropriados (Brooks *et al.*, 2019).

A FIV é uma ferramenta poderosa na reprodução equina, particularmente útil para superar barreiras de fertilidade e para preservar indivíduos com genética superior (Lazzari *et al.*, 2020). Por essa razão, técnicas inovadoras, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), têm sido aplicadas para melhorar os resultados da FIV em equinos (Deleuze *et al.*, 2018).

A ICSI envolve a injeção direta de um único espermatozoide capacitado no citoplasma de um oócito, contornando as dificuldades da penetração espermática na zona pelúcida ((Lazzari *et al.*, 2020; Agnieszka *et al.*, 2021). Ela é particularmente benéfica para casos em que o sêmen disponível é de qualidade subótima ou em quantidades limitadas, como nos garanhões com problemas de fertilidade ou quando se utiliza sêmen congelado (Ramírez-Agámez *et al.*, 2023). Essa técnica representa um marco significativo no campo da reprodução assistida, especialmente na PIVE em equinos (Papas *et al.*, 2021). Como apenas um espermatozoide é necessário para cada oócito, é possível gerar múltiplos embriões de um único ejaculado ou até mesmo de espermatozoides extraídos post-mortem, ampliando as oportunidades para a preservação e utilização de linhagens genéticas valiosas (Lewis *et al.*, 2016).

A ICSI não somente tem aplicações práticas em termos de melhoramento e reprodução equina, mas também é uma ferramenta valiosa para a pesquisa científica (Spacek; Carnevale, 2018). Ela possibilita o estudo detalhado da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Adicionalmente apresenta potencial em programas de conservação de espécies por permitir a reprodução a partir de gametas coletados de indivíduos raros ou em extinção (Spacek; Carnevale, 2018; Bragulat *et al.*, 2023). Apesar de suas vantagens, a ICSI em

equinos ainda apresenta desafios porque requer equipamentos especializados, habilidades técnicas refinadas e um entendimento aprofundado da fisiologia reprodutiva equina (Hatzel; Stokes, 2021).

A TE em equinos é uma etapa fundamental no processo da PIVE porque é o momento em que os embriões são transferidos para o útero da égua receptora que deve estar sincronizado para permitir a implantação do embrião (Ferreira-Silva *et al.*, 2019). A escolha da égua receptora é outro aspecto crítico, devendo-se selecionar animais saudáveis, com bom histórico reprodutivo (se possível), sem anormalidades uterinas (Sieme *et al.*, 2018; Allen, 2018). A transferência propriamente dita é um procedimento delicado e requer habilidade técnica. Geralmente é realizada de forma não cirúrgica através de um cateter especial que é suavemente introduzido no útero para depositar o embrião (Dordas-Perpinya; Bruyas, 2019).

Embora que a técnica de TE esteja bem estabelecida, o sucesso não é garantido como em todas as espécies animais tendo em vista que aspectos relacionados com a qualidade do embrião, habilidade do técnico e condição da receptora influenciam nas taxas de prenhez (Galli *et al.*, 2018; Dordas-Perpinya; Bruyas, 2019). Em equinos, essas taxas podem variar, mas com a técnica adequada e o manejo correto, as chances de uma gestação bem-sucedida são significativas (Claes; Stout, 2022).

A PIVE na espécie equina ainda enfrenta desafios significativos, especialmente em comparação com a dos bovinos e suínos, nas quais a técnica encontra-se mais estabelecida (Claes *et al.*, 2019; Claes; Stout, 2022). Nos equinos as taxas de prenhez são geralmente baixas, mas com o aprimoramento das técnicas de maturação, fecundação e cultivo embrionário é esperado que essa biotécnica contribua significativamente para melhoria genética dos animais abrindo novas possibilidades para o aprimoramento genético e a preservação de linhagens importantes de equinos (Valenzuela *et al.*, 2018; Squires, 2019; Cabeza; Gambini, 2023).

#### 3.2.4 Avaliação Embrionária

A avaliação embrionária é um aspecto fundamental para garantir bons resultados PIVE e de outras biotécnicas relacionadas com a reprodução assistida (Carnevale; Metcalf, 2019; Lazzari *et al.*, 2020). Essa avaliação não somente auxilia na determinação da viabilidade do embrião, mas também oferece insights essenciais sobre a qualidade embrionária, o que é fundamental para melhorar as taxas de prenhez e nascimentos.

A avaliação morfológica de embriões, que envolve a análise visual do embrião pela microscopia para determinar sua qualidade, viabilidade e potencial de implantação é um procedimento vital para a PIVE (Carnevale; Metcalf, 2019). Durante a avaliação morfológica, diversos aspectos do embrião são meticulosamente examinados. O primeiro e um dos mais importantes critérios é o estágio de desenvolvimento embrionário porque embriões em diferentes fases de desenvolvimento, desde o ovo unicelular (zigoto) até o estágio de blastocisto, apresentam características morfológicas distintas (Mccue, 2021). A sincronia entre a idade do embrião e o seu estágio de desenvolvimento é um indicador chave de sua normalidade e viabilidade (Ferreira-Silva *et al.*, 2019).

Outro aspecto crucial é a integridade estrutural e a simetria do embrião. Embriões com formas irregulares, fragmentação celular ou anormalidades no tamanho das células (blastômeros) indicam problemas no desenvolvimento (Clérico *et al.*, 2021). A clareza do citoplasma e a presença de inclusões citoplasmáticas também são avaliadas, pois podem sugerir anormalidades metabólicas ou degenerativas. No caso específico dos equinos, a avaliação do envoltório do embrião ou zona pelúcida é fundamental porque alterações na integridade ou espessura dessa camada podem influenciar na capacidade de implantação do embrião e a subsequente gestação (Goszczyński *et al.*, 2022).

Apesar de sua importância, a avaliação morfológica tem limitações. Ela não pode detectar defeitos genéticos ou moleculares e a sua subjetividade e variações entre observadores podem influenciar na interpretação dos achados (Hissey; Ross; Meyers, 2021). Portanto, é comum utilizar essa avaliação em conjunto com análises genéticas e biomoleculares para uma avaliação mais abrangente (Angel-Velez *et al.*, 2023).

Na prática, a experiência e o treinamento do avaliador são fundamentais para garantir a precisão na avaliação morfológica. Embora métodos automáticos e computadorizados estejam em desenvolvimento, a avaliação manual continua sendo um pilar na seleção de embriões. A precisão na avaliação morfológica é vital por determinar quais embriões são passíveis de serem transferidos, congelados ou descartados, impactando diretamente nos resultados da PIVE e outras técnicas de reprodução assistida na espécie equina (Valberg *et al.*, 2018; Vegas *et al.*, 2022).

A utilização da microscopia de alta resolução na avaliação de embriões equinos representa um avanço significativo no campo da medicina veterinária reprodutiva, especialmente em programas de PIVE. Esta tecnologia permite uma análise detalhada e refinada dos embriões, transcendendo as limitações das técnicas tradicionais de microscopia (Brooks *et al.*, 2019). O principal benefício da microscopia de alta resolução é sua capacidade

de fornecer imagens extremamente claras e detalhadas dos embriões (Camozzato *et al.*, 2019). Isso inclui a visualização de estruturas celulares internas, como núcleo, mitocôndria e outras organelas que são cruciais para avaliar a viabilidade e o potencial de desenvolvimento do embrião (Meyers *et al.*, 2019). Tal nível de detalhe é essencial para identificar possíveis anormalidades cromossômicas ou defeitos de desenvolvimento que poderiam passar despercebidos em microscópios convencionais (Lewis *et al.*, 2019).

Essa tecnologia também permite estudar a morfologia embrionária com uma precisão sem precedentes. Aspectos como simetria celular, integridade da zona e uniformidade do citoplasma podem ser examinados em detalhes finos (Caballeros *et al.*, 2019). Essas observações são cruciais para decisões relativas à seleção de embriões para transferência, criopreservação e outros estudos. Adicionalmente, a microscopia de alta resolução tem um papel importante no aprimoramento da compreensão sobre a cinética de desenvolvimento embrionário nos equinos (Lewis *et al.*, 2023). Acompanhando o desenvolvimento embrionário em estágios iniciais, os profissionais podem obter insights valiosos sobre as primeiras etapas da vida e identificar os momentos críticos para intervenções terapêuticas ou modificação das condições de cultivo *in vitro*.

A incorporação dessa tecnologia nos laboratórios de PIVE também impulsiona a pesquisa e o desenvolvimento da área. Com ela, é possível investigar melhor as causas das falhas no desenvolvimento embrionário e na implantação, levando à otimização dos protocolos de PIVE com consequente aumento dos resultados. Por outro lado, é importante destacar que o uso da microscopia de alta resolução exige formação específica e experiência. A interpretação adequada das imagens requer um profundo conhecimento sobre a biologia embrionária equina e sobre os parâmetros de desenvolvimento normal e anormal.

### 3.2.5 Avaliação Molecular

A utilização de avaliações moleculares, como transcriptoma, proteômica e metabolômica, na avaliação de embriões equinos, representa um avanço significativo na compreensão e aprimoramento da reprodução assistida nessa espécie. Essas técnicas de análise molecular fornecem informações profundas sobre os processos biológicos, moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, contribuindo para a melhoria das taxas de sucesso da PIVE (Carnevale; Metcalf, 2019; Brooks *et al.*, 2019; Gastal *et al.*, 2021; Sanchez *et al.*, 2021).

A utilização de avaliações do transcriptoma na avaliação de embriões equinos representa uma abordagem inovadora e detalhada no campo da reprodução assistida (Chavatte-Palmer *et al.*, 2022). O transcriptoma, que é o conjunto completo de transcritos de RNA em uma célula, incluindo o mRNA e o RNA não codificante, desempenha um papel crucial no entendimento das regulações genéticas e expressões gênicas durante o desenvolvimento embrionário (Parreira; Araújo, 2018).

No contexto da PIVE em equinos, a análise do transcriptoma permite aos profissionais compreenderem de forma mais aprofundada os processos biológicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial (Ortiz-Rodriguez *et al.*, 2019). Especificamente, essa análise pode revelar informações vitais sobre a expressão gênica no momento da fecundação, bem como durante as fases críticas do desenvolvimento embrionário, tais como a divisão celular, a implantação e a ativação do genoma embrionário (Paterson *et al.*, 2020; Vegas *et al.*, 2022).

Entender a expressão gênica em embriões equinos é essencial para identificar padrões normais e anormais de desenvolvimento. Anormalidades na expressão gênica podem ser indicativos de problemas de desenvolvimento, o que pode, em última instância, afetar a qualidade e a viabilidade do embrião (Angel-Velez *et al.*, 2023). Por exemplo, a expressão anormal de certos genes pode ser relacionada com falhas na implantação ou no desenvolvimento embrionário posterior (Goszczyński *et al.*, 2022).

A tecnologia de sequenciamento de RNA de última geração (RNA-seq) é uma ferramenta poderosa para a realização destas análises porque fornece uma visão abrangente e quantitativa da expressão gênica em uma amostra (Groff *et al.*, 2019; Owens; Domenico; Gilchrist, 2019). Esta tecnologia não somente permite a identificação de genes expressos, mas também a quantificação exata da expressão gênica, além de revelar novos transcritos (Zhou *et al.*, 2019).

Na prática, a análise do transcriptoma de embriões equinos pode ser utilizada para melhorar as técnicas de PIVE. Segundo Boakari *et al.* (2020), ao identificar os genes ou vias de sinalização que são críticos para o desenvolvimento embrionário saudável, pode-se otimizar os meios de cultivo e as condições de cultivo *in vitro* para apoiar melhor a expressão gênica saudável. Além disso, a análise do transcriptoma pode contribuir para a criação de biomarcadores para a seleção de embriões com maior potencial de implantação e desenvolvimento subsequente (Paterson *et al.*, 2020; Verstraete *et al.*, 2022).

Além da avaliação do transcriptoma, a utilização do proteoma para a avaliação de embriões equinos é uma área crescente de interesse para a pesquisa e para a medicina

veterinária, especialmente no campo da reprodução assistida (Bastos *et al.*, 2019; Fernández-Hernández *et al.*, 2021; Ishak *et al.*, 2022). O proteoma, que engloba o conjunto total de proteínas expressas por um genoma, uma célula, ou um organismo, oferece uma compreensão detalhada das funções celulares e dos processos biológicos. No contexto da PIVE em equinos, a análise proteômica tem um papel importante na avaliação da qualidade e do potencial de desenvolvimento embrionário (Smits *et al.*, 2018).

A análise proteômica em embriões pode fornecer informações valiosas sobre a expressão de proteínas durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (BASTOS *et al.*, 2019). Este tipo de análise é fundamental para entender os mecanismos moleculares e celulares que dirigem o desenvolvimento embrionário normal e identificar potenciais marcadores de viabilidade e qualidade embrionária (Sanchez *et al.*, 2021). As técnicas proteômicas, como a espectrometria de massa e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS), permitem identificar e a quantificar uma grande gama de proteínas presentes em amostras embrionárias (Vieira *et al.*, 2022). Essas técnicas podem detectar e quantificar proteínas relacionadas em alguns processos, como a divisão celular, resposta ao estresse, metabolismo energético e outras vias críticas para o desenvolvimento embrionário saudável (Walter *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2022).

No campo da reprodução equina, a análise proteômica pode ser usada para otimizar as técnicas de PIVE, melhorando a seleção de embriões para transferência e aumentando as taxas de prenhez e nascimentos (Bastos *et al.*, 2018; Fernández-Hernández *et al.*, 2021). A identificação de padrões específicos de expressão proteica pode ajudar a distinguir embriões de alta qualidade daqueles com menor potencial de implantação (Itze-Mayrhofer; Brem, 2020). Além disso, essas informações podem auxiliar na adaptação dos meios de cultivo e das condições *in vitro*, fornecendo um ambiente mais favorável para desenvolvimento embrionário (Paula Junior *et al.*, 2018). A proteômica é também uma ferramenta valiosa para diagnosticar alterações na expressão proteica podem indicar estresse metabólico, anormalidades cromossômicas, ou outras condições que podem afetar adversamente o desenvolvimento do embrião (Vieira *et al.*, 2022).

A utilização de avaliações do metaboloma para a análise de embriões também é uma abordagem inovadora e cada vez mais relevante na área da medicina veterinária, especialmente na esfera da reprodução animal (Simintiras *et al.*, 2021). O metaboloma refere-se ao conjunto completo de metabólitos - pequenas moléculas como açúcares, ácidos, peptídeos e lipídios - presentes em uma célula, tecido, órgão ou organismo. Estes metabólitos são o resultado final de processos celulares e, portanto, fornecem uma representação dinâmica

do estado fisiológico de um organismo ou de um tecido específico, como o embrião (Uhde *et al.*, 2018; Gatien *et al.*, 2019; Simintiras *et al.*, 2021).

Na reprodução equina, a análise do metaboloma dos embriões pode oferecer informações cruciais sobre o estado metabólico e o potencial de desenvolvimento do embrião (Hamdi *et al.*, 2019). Essas informações são de grande valor para melhorar as técnicas de PIVE, aumentando assim as taxas de prenhez e nascimento de potros saudáveis. O metaboloma de embriões equinos pode ser influenciado por vários fatores, incluindo a qualidade dos gametas parentais, as condições de cultivo *in vitro*, e o meio ambiente materno (Fernández-Hernández *et al.*, 2020; González-Fernández *et al.*, 2020). Assim, a análise do metaboloma oferece a oportunidade de ajustar esses fatores para criar um ambiente mais propício para o desenvolvimento embrionário saudável. De um modo geral, o perfil metabólico pode indicar um estresse oxidativo excessivo ou deficiências nutricionais no meio de cultivo que poderiam ser corrigidos para melhorar a qualidade do embrião (González-Fernández *et al.*, 2020).

Além disso, a avaliação do metaboloma dos embriões pode auxiliar na seleção de embriões com maior potencial de implantação e desenvolvimento. Diferenças nos perfis metabólicos podem ser indicativas da viabilidade do embrião, auxiliando os profissionais escolherem os melhores candidatos para transferência, o que é fundamental para o sucesso da reprodução assistida (Lewis *et al.*, 2020).

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PIVE, embora ainda em estágio evolutivo na espécie equina, mostra um potencial significativo para superar desafios reprodutivos, especialmente em casos de infertilidade, doenças genéticas e otimização de linhagens genéticas.

Os avanços em técnicas de manipulação de oócitos, melhorias nos meios de cultivo e métodos de transferência de embriões estão gradualmente impulsionando a eficácia da PIVE em equinos. Técnicas inovadoras como a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) mostraram-se promissoras ao superar dificuldades de fecundação e ao permitir a utilização de espermatozoides de qualidade subótima. Além disso, o aprimoramento dos sistemas de cultivo que simulam o ambiente uterino natural tem contribuído para o aumento das taxas de desenvolvimento embrionário e a qualidade dos embriões produzidos.

A PIVE tem implicações importantes não apenas para a reprodução equina, mas também para a conservação da biodiversidade e a indústria equestre. Ela oferece um meio eficiente de preservar linhagens genéticas valiosas e pode contribuir significativamente para o melhoramento genético e a multiplicação de animais de alto valor genético. Contudo, ainda há desafios a serem enfrentados, como a necessidade de melhoria contínua dos resultados e a redução dos custos associados a essa biotécnica para ampliar sua aplicabilidade e acessibilidade.

Diante desses desafios, a avaliação embrionária é fundamental. A avaliação embrionária é vital para o sucesso da PIVE em equinos. A Avaliação Morfológica, que examina características como tamanho, forma e clareza do citoplasma do embrião sob microscopia, é fundamental para determinar a sua capacidade de implantação e viabilidade gestacional. A Microscopia de Alta Resolução expande essa avaliação, fornecendo imagens detalhadas das estruturas internas do embrião, essenciais para aferir sua viabilidade e potencial de desenvolvimento. Avanços significativos vêm da Análise do Transcriptoma e Proteoma, que revela informações sobre funções celulares e processos biológicos. Essas técnicas aprofundam o entendimento das regulações genéticas e expressões gênicas durante o desenvolvimento embrionário. A Avaliação Molecular e Metabolômica, analisando processos biológicos, moleculares e bioquímicos, identifica condições como estresse oxidativo e deficiências nutricionais. Esses métodos são cruciais para selecionar embriões de alta qualidade e viabilidade, elevando as taxas de sucesso da PIVE e outras técnicas de reprodução assistida em equinos, sendo essenciais para o progresso da medicina veterinária reprodutiva e conservação da biodiversidade equestre.

Em conclusão, a PIVE em equinos está em uma fase de evolução promissora, com potencial para transformar a reprodução equina. Espera-se que com o avanço contínuo das biotécnicas, a PIVE se torne uma ferramenta cada vez mais relevante e eficaz, contribuindo para a solução de desafios de longa duração na conservação e no melhoramento genético dos equinos. Este trabalho, ao compilar e analisar os dados atuais, oferece uma contribuição valiosa para o campo da medicina veterinária reprodutiva e abre caminhos para futuras pesquisas e aplicações práticas na indústria equestre.

## REFERÊNCIAS

- AGNIESZKA, N. *et al.* In vitro maturation of equine oocytes followed by two vitrification protocols and subjected to either intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or parthenogenic activation. **Theriogenology**, v. 162, p. 42-48, 2021.
- ALLEN, W. R. T. Embryo transfer in the horse. *In: MAMMALIAN egg transfer.* CRC Press, 2018. p. 135-154.
- ALLEN, W. R. T.; WILSHER, S. Historical aspects of equine embryo transfer. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102987, 2020.
- ANGEL-VELEZ, D. *et al.* Embryo development after vitrification of immature and in vitro-matured equine oocytes. **Cryobiology**, v. 92, p. 251-254, 2020.
- ANGEL-VELEZ, D. *et al.* Transcriptomics reveal molecular differences in equine oocytes vitrified before and after in vitro maturation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 6915, 2023.
- AZEVEDO, M. V. *et al.* Evaluation of corpus luteum vascularization in recipient mares by using color Doppler ultrasound. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, 2021.
- BASTOS, H. B. A. *et al.* Early Embryo Development in Mares: proteomics of uterine fluid. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 186-187, 2018.
- BASTOS, H. B. A. *et al.* Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224-235, 2019.
- BOAKARI, Y. L. *et al.* Elevated blood urea nitrogen alters the transcriptome of equine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 16, p. 1239-1249, 2020.
- BOLS, P. E. J.; STOUT, Tom A. E. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval (OPU: Ovum Pick-Up) in cows and mares. *In: ANIMAL biotechnology 1: reproductive biotechnologies.* [S. l.]: Springer, 2018. p. 209-233.
- BRAGULAT, A. P. F. *et al.* Time-lapse imaging and developmental competence of donkey eggs after ICSI: Effect of preovulatory follicular fluid during oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 195, p. 199-208, 2023.
- BROM-DE-LUNA, J. G. *et al.* Equine blastocyst production under different incubation temperatures and different CO<sub>2</sub> concentrations during early cleavage. **Reproduction Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1823-1829, 2019.
- BROM-DE-LUNA, J. G. *et al.* Culture protocols for horse embryos after ICSI: Effect of myo-inositol and time of media change. **Animal Reproduction Science**, v. 233, p. 106819, 2021.
- BROOKS, K. E. *et al.* Assessing equine embryo developmental competency by time-lapse image analysis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1840-1850, 2019.

CABALLEROS, J. E. *et al.* Ultrastructural and histological characteristics of the equine endometrium at day 5 post ovulation. **Theriogenology**, v. 132, p. 106-112, 2019.

CABEZA, J. P.; GAMBINI, A. Advancements and challenges in vitro reproductive technologies for the conservation of equine species. **Theriogenology Wild**, p. 100036, 2023.

CAMOZZATO, G. C. *et al.* Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 123, p. 1-10, 2019.

CAMPOS-CHILLON, L. F.; ALTERMATT, J. L. Effect of cooled vs frozen stallion semen on the efficiency of equine in vitro embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104634, 2023.

CAMPOS-CHILLON, L. F.; OWEN, C. M.; ALTERMATT, J. L. Equine and bovine oocyte maturation in a novel medium without CO<sub>2</sub> gas phase. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, p. 51-55, 2019.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; STOKES, J. A. E. In vitro culture of embryos from horses. **Comparative Embryo Culture: Methods and Protocols**, p. 219-227, 2019.

CARNEVALE, E. M.; METCALF, E. S. Morphology, developmental stages and quality parameters of in vitro-produced equine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1758-1770, 2019.

CASTAÑEIRA, C. *et al.* Efficiency of equine oocyte recovery from post mortem ovaries or by ovum pick up. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104638, 2023.

CHAVATTE-PALMER, P. *et al.* Effect of sex on gene expression in equine blastocysts. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 113, p. 103980, 2022.

CLAES, A. *et al.* Factors affecting the likelihood of pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved in vitro produced equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 4, p. 446-450, 2019.

CLAES, A.; STOUT, T. A. E. Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. **Theriogenology**, v. 187, p. 215-218, 2022.

CLÉRICO, G. *et al.* Mitochondrial function, blastocyst development and live foals born after ICSI of immature vitrified/warmed equine oocytes matured with or without melatonin. **Theriogenology**, v. 160, p. 40-49, 2021.

CLUTTON-BROCK, A.; CUERVO-ARANGO, J.; ARRONDO, P. Effect of breed and embryo sexing on the efficiency of a commercial OPU-ICSI program in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104640, 2023.

CUERVO-ARANGO, J. *et al.* The effect of different flushing media used to aspirate follicles on the outcome of a commercial ovum pickup–ICSI program in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 75, p. 74-77, 2019.

- CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. **Theriogenology**, v. 132, p. 36-44, 2019.
- CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T. A. E. Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1894-1903, 2019.
- DELEUZE, S. *et al.* Ovum pick up and in vitro maturation of jennies oocytes toward the setting up of efficient in vitro fertilization and in vitro embryos culture procedures in donkey (*Equus asinus*). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 111-117, 2018.
- DIJKSTRA, A. *et al.* Monozygotic multiple pregnancies after transfer of single in vitro produced equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 258-261, 2020.
- DORDAS-PERPINYA, M.a; BRUYAS, J. F. Practical aspects of equine embryo transfer. **Translational Research in Veterinary Science**, v. 2, n. 1, p. 23-39, 2019.
- DUVAL, L. H. *et al.* Ovarian and uterine dynamics during the estrous cycle in Criollo breed mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 118, p. 104131, 2022.
- FANELLI, D. *et al.* Interspecific and intraspecific artificial insemination in domestic equids. **Animals**, v. 13, n. 4, p. 582, 2023.
- FELIX, M. R. *et al.* Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 107, n. 6, p. 1551-1564, 2022.
- FERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, P. *et al.* Study of the metabolomics of equine preovulatory follicular fluid: a way to improve current in vitro maturation media. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 883, 2020.
- FERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, P. *et al.* The proteome of equine oviductal fluid varies before and after ovulation: a comparative study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 694247, 2021.
- FERREIRA, H. N. *et al.* Variable inter-assay estimation of sperm DNA fragmentation in stallions classified as good and bad semen freezers. **CryoLetters**, v. 39, n. 1, p. 67-71, 2018.
- FERREIRA, H. N. *et al.* Functional assessment of diluent choice for semen cryopreservation from stallions with high and low freezability. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, 2019.
- FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Evaluation of embryo collection and transfer days on pregnancy rate of Mangalarga Marchador mares during the breeding season. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 32, n. 3, p. 214-220, 2019.
- FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Freezing of stallion semen: in vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved under different glycerol concentrations. **Pferdeheilkunde**, v. 34, n. 1, 2018a.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Freezing of stallion semen: in vitro evaluation of motility and acrosin activity in sperm cells cryopreserved using different semen extenders. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 6, p. 439-443, 2018b.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Induction of ovulation in Mangalarga Marchador mares by hCG or GnRH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 6-6, 2018.

FOSS, R. Equine intracytoplasmic sperm injection laboratory: an overview of management challenges. **Clinical Theriogenology**, v. 14, n. 3, 2022.

GALLI, C. *et al.* Equine assisted reproduction and embryo technologies. **Animal Reproduction (AR)**, v. 10, n. 3, p. 334-343, 2018.

GASTAL, G. da *et al.* Epigenetic changes in equine embryos after short-term storage at different temperatures. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1325, 2021.

GATIEN, J. *et al.* Metabolomic profile of oviductal extracellular vesicles across the estrous cycle in cattle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6339, 2019.

GENCHEV, S. E.; GRAY, G. T.; WERT-GRAY, S. A conceptual and qualitative study of outsourcing criteria and the role of emotions in decision-making: the case of equine sports transportation outsourcing. **Journal of Transportation Management**, v. 30, n. 1, p. 7, 2019.

GENCHEV, S. E.; GRAY, G. T.; WERT-GRAY, S. **Sports logistics outsourcing: a conceptual and qualitative study in the equine industry.** [S. l.]: Association of Marketing Theory and Practice, 2018.

GINTHER, O. J. *et al.* Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction (AR)**, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2018.

GOMES, G. M. *et al.* Can sperm selection, inseminating dose, and artificial insemination technique influence endometrial inflammatory response in mares? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, p. 43-47, 2019.

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

GORETTI, R. G. Empreendedorismo na reprodução equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 500-501, 2021.

GOSZCZYNSKI, D. E. *et al.* Genome activation in equine in vitro-produced embryos. **Biology of Reproduction**, v. 106, n. 1, p. 66-82, 2022.

GREISER, T. *et al.* Breed and stallion effects on frozen-thawed semen in warmblood, light and quarter horses. **Theriogenology**, v. 142, p. 8-14, 2020.

GRICE, A. L. *et al.* American horse council economic impact study. *In: PROCEEDINGS of the 64th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.* San Francisco, Cal. US: American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2018. p. 502-504.

- GROFF, A. F. *et al.* RNA-seq as a tool for evaluating human embryo competence. **Genome research**, v. 29, n. 10, p. 1705-1718, 2019.
- HAMDI, M. *et al.* Gene expression and metabolic response of bovine oviduct epithelial cells to the early embryo. **Reproduction**, v. 158, n. 1, p. 85-94, 2019.
- HARRIS, I. T. *et al.* Temporal trends in equine sperm progressive motility: a systematic review and meta-regression. **Reproduction**, v. 165, n. 6, p. M1-M10, 2023.
- HATZEL, J. N.; STOKES, J. Intracytoplasmic sperm injection. **Equine Reproductive Procedures**, p. 187-189, 2021.
- HINRICHS, K. Advances in holding and cryopreservation of equine oocytes and embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102990, 2020.
- HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 4-13, 2018.
- HISEY, E.; ROSS, P. J.; MEYERS, S. A. A review of OCT4 functions and applications to equine embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 98, p. 103364, 2021.
- ISHAK, G. M. *et al.* Follicular fluid proteomics during equine follicle development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 89, n. 7, p. 298-311, 2022.
- ITZE-MAYRHOFER, C.; BREM, G. Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: female reproductive fluids. **Journal of Proteomics**, v. 225, p. 103884, 2020.
- KOWALCZYK, A.; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, E.; KUCZAJ, M. Factors influencing the popularity of artificial insemination of mares in Europe. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 460, 2019.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C. *et al.* New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. **Animal Reproduction (AR)**, v. 5, n. 3, p. 67-82, 2018.
- LAZZARI, G. *et al.* Laboratory production of equine embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 103097, 2020.
- LEWIS, N. *et al.* Effect of oocyte source and transport time on rates of equine oocyte maturation and cleavage after fertilization by ICSI, with a note on the validation of equine embryo morphological classification. **Clinical Theriogenology**, v. 8, n. 1, p. 25-39, 2016.
- LEWIS, N. *et al.* Energy metabolism of the equine cumulus oocyte complex during in vitro maturation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3493, 2020.
- LEWIS, N. *et al.* Equine in vitro produced blastocysts: relationship of embryo morphology, stage and speed of development to foaling rate. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 35, n. 4, p. 338-351, 2023.
- LEWIS, N. *et al.* Glucose concentration during equine in vitro maturation alters mitochondrial function. **Reproduction**, v. 160, n. 2, p. 227-237, 2020.

LEWIS, N. *et al.* Morphokinetics of early equine embryo development in vitro using time-lapse imaging, and use in selecting blastocysts for transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1851-1861, 2019.

LIMA, R. A. de S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília, DF: MAPA, 2016.

MACIEL, F.; MORAES, J. A. de. A contribuição de uma empresa do agronegócio do cavalo crioulo para o desenvolvimento do município de Rolante - RS. **Revista de Administração de Empresas Eletrônica-RAEE**, n. 18, p. 70-94, 2023.

MCCUE, P. M. Embryo evaluation. **Equine Reproductive Procedures**, p. 231-234, 2021.

MEDICA, A. J.; LAMBOURNE, S.; AITKEN, R. J. Predicting the outcome of equine artificial inseminations using chilled semen. **Animals**, v. 13, n. 7, p. 1203, 2023.

METCALF, E. S. *et al.* Conditions to optimise the developmental competence of immature equine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 11, p. 1012-1021, 2020.

MEYERS, S. *et al.* Equine non-invasive time-lapse imaging and blastocyst development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1874-1884, 2019.

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

NIETO-OLMEDO, P. *et al.* Power doppler can detect the presence of 7–8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 145, p. 1-9, 2020.

NOTZKE, C. Equestrian tourism: animal agency observed. **Current Issues in Tourism**, v. 22, n. 8, p. 948-966, 2019.

ORSOLINI, M. F.; MEYERS, S. A.; DINI, P. An update on semen physiology, technologies, and selection techniques for the advancement of in vitro equine embryo production: section II. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3319, 2021.

ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M. *et al.* Transcriptome analysis reveals that fertilization with cryopreserved sperm downregulates genes relevant for early embryo development in the horse. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0213420, 2019.

OWENS, N. D. L.; DOMENICO, E. de; GILCHRIST, M. J. An RNA-seq protocol for differential expression analysis. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2019, n. 6, p. 10, 2019.

PANDEY, A. *et al.* Hysteroscopic insemination: a new trend of artificial insemination. **Ann. For. Res**, v. 65, n. 1, p. 4380-4391, 2022.

PAPAS, M. *et al.* Anti-müllerian hormone and opu-icsi outcome in the mare. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 2004, 2021.

- PARREIRA, J. R.; ARAÚJO, S. de S. Studying the animal transcriptome: state of the art and challenges in the context of animal and veterinary sciences. **Proteomics in Domestic Animals: from Farm to Systems Biology**, p. 421-446, 2018.
- PATERSON, Y. Z. *et al.* Genome-wide transcriptome analysis reveals equine embryonic stem cell-derived tenocytes resemble fetal, not adult tenocytes. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.
- PAULA JUNIOR, A. R. *et al.* Proteomic analysis of follicular fluid from tropically-adapted goats. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 35-44, 2018.
- PEREIRA, E. L.; BATAGLION, G. A.; MAZO, J. Z. Equoterapia, saúde e esporte: figurações da prática no Rio Grande do Sul, 1970-2000. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 27, p. 879-897, 2020.
- PIETRANI, M.; LOSINNO, L.; ARANGO, J. C. Effect of the interval from prostaglandin F2 alpha treatment to ovulation on reproductive efficiency rates in a commercial equine embryo transfer program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 78, p. 123-126, 2019.
- PODICO, G. *et al.* Uterine inflammatory response, embryo recovery and morphometry in interspecies breeding. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104739, 2023.
- POGGI, J. C. G.; AMBROJO, K. S. History of horses and the biotechnologies applied to its reproduction. *In: EQUINE science-applications and implications of new technologies.* IntechOpen, 2023.
- RADMANN, A.; HEDENBORG, S.; BROMS, L. Social media influencers in equestrian sport. **Frontiers in Sports and Active Living**, v. 3, p. 87, 2021.
- RAMÍREZ-AGÁMEZ, L. *et al.* Sperm factors associated with the production of equine blastocysts by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 195, p. 85-92, 2023.
- RAUB, R. H. The back-yard horse owner and the equine industry at large. **Journal of Animal Science**, v. 96, p. 33-34, 2018.
- SALES, A. de A. S. **O complexo do agronegócio do cavalo: uma análise sistêmica da equinocultura e tendências de mercado.** 2018.
- SALES, F. A. B. M. *et al.* Correlations of corpus luteum blood flow with fertility and progesterone in embryo recipient mares. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 2, p. 280, 2021.
- SALES, F. A. B. M. *et al.* Freezing of Stallion Semen: in vitro and in vivo evaluation of sperm motility and acrosin Activity in frozen-thawed semen with addition of post-diluent extenders. **CryoLetters**, v. 39, n. 6, p. 401-407, 2018.
- SALES, F. A. B. M. *et al.* In vitro and in vivo efficiency of extenders added to thawed stallion semen. **Cryoletters**, v. 40, n. 4, p. 231-236, 2019.

SANCHEZ, D. J. D. *et al.* Proteomic profile of pre-implantational ovine embryos produced in vivo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, n. 4, p. 586-603, 2021.

SÁNCHEZ, L. S. *et al.* Welfare assessment at a spanish army equine breeding centre. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 137-146, 2020.

SIEME, H. *et al.* Equine embryo transfer. **Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies**, p. 179-192, 2018.

SILVA, G. E. L. *et al.* Importância das práticas de bem-estar na performance equina. **PUBVET**, v. 16, p. 102, 2022.

SIMINTIRAS, C. A. *et al.* Conceptus metabolomic profiling reveals stage-specific phenotypes leading up to pregnancy recognition in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 104, n. 5, p. 1022-1033, 2021.

SMITS, K. *et al.* Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 5249, 2018.

SPACEK, S. G.; CARNEVALE, E. M. Impact of equine and bovine oocyte maturation in follicular fluid from young and old mares on embryo production in vitro. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 68, p. 94-100, 2018.

SQUIRES, E. L. Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1753-1757, 2019.

SQUIRES, E. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102981, 2020.

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

STURN, R.; LIMA, F. T.; RIBEIRO, A. Boas práticas e bem-estar em cavalos de hipismo: oportunidades de melhorias. **Enciclopedia Biosfera**, v. 15, n. 27, 2018.

TKACHEV, A. V.; TKACHEVA, O. L.; GUTYJ, B. V. The modern methods of reproduction physiology of horses. **Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 18-23, 2019.

UHDE, K. *et al.* Metabolomic profiles of bovine cumulus cells and cumulus-oocyte-complex-conditioned medium during maturation in vitro. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9477, 2018.

UMAIR, M. *et al.* Vitriifying expanded equine embryos collapsed by blastocoel aspiration is less damaging than slow-freezing. **Theriogenology**, v. 202, p. 28-35, 2023.

URÍAS-CASTRO, C.; BOETA-ACOSTA, M. Collection, vitrification and post-warming transfer of equine embryos produced in vivo: a literature review. **Abanico Veterinario**, v. 12, 2022.

VALBERG, S. J. *et al.* Proteome and transcriptome profiling of equine myofibrillar myopathy identifies diminished peroxiredoxin 6 and altered cysteine metabolic pathways. **Physiological Genomics**, v. 50, n. 12, p. 1036-1050, 2018.

VALENZUELA, O. A. *et al.* Impact of equine assisted reproductive technologies (standard embryo transfer or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with in vitro culture and embryo transfer) on placenta and foal morphometry and placental gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 2, p. 371-379, 2018.

VEGAS, A. R. *et al.* Dynamic regulation of the transcriptome and proteome of the equine embryo during maternal recognition of pregnancy. **FASEB BioAdvances**, v. 4, n. 12, p. 775, 2022.

VERSHININA, A. O. *et al.* Ancient horse genomes reveal the timing and extent of dispersals across the Bering Land Bridge. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 23, p. 6144-6161, 2021.

VERSTRAETE, M. H. *et al.* Transcriptomic analysis of the chorioallantois of equine cloned pregnancies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 113, p. 103983, 2022.

VIEIRA, J. I. T. *et al.* Proteomic profile of vitrified in vitro-produced bovine embryos (*Bos Taurus Indicus*). **Cryoletters**, v. 43, n. 4, p. 206-221, 2022.

WALTER, J. *et al.* Analysis of the equine “cumulome” reveals major metabolic aberrations after maturation in vitro. **Bmc Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-24, 2019.

WHITE-LEWIS, S. Equine assisted therapies using horses as healers: a concept analysis. **Nursing Open**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2020.

ZHOU, Q. *et al.* Single cell RNA seq reveals distinct dynamic behavior of sex chromosomes during early human embryogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 7, p. 871-882, 2019.