

**COLETA DE AMOSTRA DO CONCEPTO EQUINO VIA FÓRNIX VAGINAL:
ESTUDO DO DIÂMETRO E COMPRIMENTO DA AGULHA NA EFICIÊNCIA DO
PROCEDIMENTO**

**SAMPLE COLLECTION OF THE EQUINE *CONCEPTUS* VIA VAGINAL
FORNIX: STUDY OF THE DIAMETER AND LENGTH OF THE NEEDLE IN THE
EFFICIENCY OF THE PROCEDURE**

**RECOGIDA DE MUESTRAS DEL EMBRIÓN EQUINO VÍA FÓRNIX VAGINAL:
ESTUDIO DEL DIÁMETRO Y LONGITUD DE LA AGUJA EN LA EFICACIA DEL
PROCEDIMIENTO**



10.56238/revgeov17n3-204

Vinicius Motta Ferreira

Graduado em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

Endereço: Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: viniciusmottaferreira@gmail.com

Juli Angélica Narváez Cancimansi

Doutor em Ciências Animal

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

Endereço: Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: jancvet@gmail.com

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6891457475606026>

Orcid: <https://orcid.org/0009-0000-9663-366X>

José Renato Costa Caiado

Doutor em Produção Animal

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

Endereço: Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: jrccaiado@uenf.br

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7567435157683445>

Orcid: <https://orcid.org/0009-0008-2952-5739>

Paulo Roberto de Oliveira Almeida Filho

Graduado em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)

Endereço: Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: betoalmeida3x@gmail.com

Lattes: <https://lattes.cnpq.br/3284887600834348>

Orcid: <https://orcid.org/0009-0008-7183-3807>



Eduardo Shimoda

Doutor em Produção Animal

Instituição: Universidade Cândido Mendes (UCAM)

Endereço: Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: shimoda@ucam-campos.br

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7869107089401453>Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6544-687X>**José Frederico Straggiotti Silva**

Doutor em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Universidade Estadual do Norte

Fluminense Darcy Ribeiro

Endereço: Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: straggio@uenf.br

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1845406575748415>Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-29-75-9382>**RESUMO**

A determinação do sexo do embrião tem de grande importância zootécnica e vem sendo aprimorada ao longo dos tempos. Em humanos, a amniocentese é realizada com sucesso, sendo que as amostras obtidas possibilitam a realização da genotipagem e sexagem dos fetos com precisão. Para realizar a sexagem e genotipagem de embriões equinos, in vivo, o presente trabalho teve como objetivo testar sete calibres diferentes de agulhas para a obtenção de amostras de líquido vitelínico e/ou líquido alantoide de embriões e/ou fetos através da punção por via transvaginal. Procedeu-se um total de 65 intervenções de punção do conceito, independentemente da idade de gestação, em 29 éguas verificando-se em 36 procedimentos sucesso na punção (55%). No decurso das 65 intervenções constatou-se um total de cinco perdas do conceito, isto é, perda em 7,7% do total das intervenções (n=65), 13,8% das éguas em que a punção foi bem sucedidas (n=36) e 17% da população estudada (n=29). A correlação entre idade do conceito e possibilidade de realização ou não da punção mostrou que quanto maior a idade gestacional, menor a possibilidade de realização da punção ($r = -0,3877$; $P = 0,0005$). Na análise da correlação entre idade do conceito e incidência de aborto foi verificada uma baixa correlação sem significância ($r = 0,1114$; $P=0,1888$) e que o diâmetro das agulhas está diretamente relacionado tanto ao sucesso da punção quanto à ocorrência de aborto.

Palavras-chave: Concepto. Equino. Punção. Via Transvaginal.

ABSTRACT

The determination of the sex of the embryo is of great zootechnical importance and has been improved over time. In humans, amniocentesis is performed successfully, and the samples obtained make it possible to perform genotyping and sexing of fetuses with precision. In order to perform the sexing and genotyping of equine embryos, in vivo, the present study aimed to test seven different needle gauges to obtain samples of yolk fluid and/or allantoic fluid from embryos and/or fetuses through transvaginal puncture. A total of 65 puncture procedures were performed, regardless of gestation age, in 29 mares, and 36 procedures were successful in the puncture (55%). During the 65 interventions, a total of five conceptional losses were observed, i.e., loss in 7.7% of the total number of interventions (n=65), 13.8% of the mares in which the puncture was successful (n=36) and 17% of the study



population (n=29). The correlation between the age of the fetus and the possibility of performing or not performing the puncture showed that the higher the gestational age, the lower the possibility of performing the puncture ($r = - 0.3877$; $P = 0.0005$). In the analysis of the correlation between the age of the fetus and the incidence of abortion, a low correlation was found without significance ($r = 0.1114$; $P=0.1888$) and that the diameter of the needles is directly related to both the success of the puncture and the occurrence of abortion.

Keywords: Conceptus. Equinus. Puncture. Transvaginal Route.

RESUMEN

La determinación del sexo del embrión es de gran importancia zootécnica y se ha mejorado con el tiempo. En humanos, la amniocentesis se realiza con éxito y las muestras obtenidas permiten realizar el genotipado y sexado de los fetos con precisión. Con el fin de realizar el sexado y genotipado de embriones equinos, in vivo, el presente estudio tuvo como objetivo probar siete calibres diferentes de agujas para obtener muestras de líquido vitelino y/o líquido alantoideo de embriones y/o fetos mediante punción transvaginal. Se realizaron un total de 65 intervenciones de punción, independientemente de la edad de gestación, en 29 yeguas, y 36 procedimientos fueron exitosos en la punción (55%). Durante las 65 intervenciones se observaron un total de cinco pérdidas del feto, es decir, pérdida en el 7,7% del total de intervenciones (n=65), el 13,8% de las yeguas en las que la punción fue exitosa (n=36) y el 17% de la población estudiada (n=29). La correlación entre la edad del conceptus y la posibilidad de realizar o no la punción mostró que a mayor edad gestacional, menor posibilidad de realizar la punción ($r = - 0,3877$; $P = 0,0005$). En el análisis de la correlación entre la edad del feto y la incidencia de aborto espontáneo, se encontró una correlación baja sin significación ($r = 0,1114$; $P = 0,1888$) y que el diámetro de las agujas está directamente relacionado tanto con el éxito de la punción como con la ocurrencia del aborto.

Palabras clave: Conceptus. Equino. Punción. Vía Transvaginal.



1 INTRODUÇÃO

O cenário atual da equinocultura nacional demonstra um crescimento no segmento empresarial e cultural da indústria do cavalo e significativos avanços no setor de biotecnologias, o que incentiva os investidores e criadores a procurar novas ferramentas que otimizem sua produção e negócios. A predeterminação do sexo de animais de criação tem várias aplicações e interesses comerciais (PEIPPO *et al.*, 1995).

A amniocentese realizada a partir da 14^a semana é um dos métodos mais difundidos para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas em humanos (NAZARETH *et al.*, 1981). A aspiração de fluido amniótico via amniocentese vaginal é realizada de 70 a 100 dias de gestação em bovinos, utilizando uma pipeta de inseminação acoplada, em uma das extremidades, a uma agulha hipodérmica 40 x 12 e na outra, a uma seringa de 60 mL, o que permite a obtenção de células para análise cromossômica. Esse método é simples e preciso, fornecendo um diagnóstico seguro para detecção do sexo pré-natal e defeitos citogenéticos em bovinos (BONGSO; BASRUR, 1975). Na avaliação da fisiologia reprodutiva de um grupo de éguas, observado e avaliado por ultrassonografia em duas temporadas de monta controladas subsequentes ao procedimento de colheita de material ovariano com agulha Tru-cut[®] através do fundo do saco vaginal mediante a guia ultrassonográfica, demonstrou não apresentar quaisquer alterações do complexo reprodutivo. Em ambas as temporadas de monta controladas foram obtidas prenhes positivas de 100% dos animais do experimento (GEBE *et al.*, 2025).

2 JUSTIFICATIVA

A determinação do sexo do embrião é de grande importância e vem sendo aprimorada ao longo dos tempos, principalmente em bovinos, devido à sua maior adequação às técnicas e metodologias existentes. No entanto, em equinos, as técnicas não são tão precisas, além de só poderem ser realizadas em curtos períodos durante a gestação. Em humanos, assim como em bovinos (KAMIMURA *et al.*, 1996), a amniocentese é realizada com sucesso, visto que as amostras obtidas possibilitam a realização da genotipagem e sexagem dos fetos com precisão (NAZARETH *et al.*, 1981). Para que seja realizada a sexagem e genotipagem de embriões equinos, *in vivo*, de maneira segura, baseadas nas técnicas existentes em humanos e bovinos, faz-se necessário o desenvolvimento de uma técnica de obtenção de amostras de DNA genômico que seja segura para mãe e o conceito.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar o diâmetro e comprimento da agulha na técnica de punção da vesícula embrionária ou fetal, por via transvaginal, de líquido vitelínico de ocorrência preponderante até o dia 30 da fase embrionária e/ou líquido alantoide de embriões e fetos após os 30



dias de gestação, para obtenção de amostras de material genético destinado à sexagem molecular e determinar o período mais indicado à realização da punção.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

O cenário atual da equinocultura nacional demonstra um crescimento no segmento empresarial e cultural da indústria do cavalo e significativos avanços no setor de biotecnologias, o que incentiva os investidores e criadores a procurar novas ferramentas que otimizem sua produção e negócios (CARMO *et al.*, 2007).

O reconhecimento materno da gestação nos equinos se dá de maneira exclusiva (ALLEN 2000). Nesse processo incomum ocorre uma mobilidade do concepto no útero, do dia 0 (dia da ovulação) até o dia 16 ou 17 após a ovulação, quando ocorre um rápido aumento no diâmetro do embrião e um súbito espasmo que aumenta o tônus miometrial e fixa o concepto no eventual local de implantação, levando a uma supressão na liberação cíclica de PGF2 pelo endométrio, permitindo a luteostase necessária para a produção de progesterona e manutenção da gestação (SHARP 2000; STOUT; ALLEN, 2001).

A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adeciuada (ABD-ELNAEIM *et al.*, 2006). Na égua, a aderência placentária ocorre somente por volta dos dias 24 a 40 de gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Este tipo de placentação é não invasivo e produz uma mínima resposta celular materna (GINTHER 1992; GERSTENBERG *et al.*, 1999). A placenta equina é classificada como epiteliocorial, uma vez que o epitélio uterino está em contato com a camada do córion, apresentando, portanto, seis camadas de tecido entre os capilares materno e fetal (endotélio, tecido conjuntivo e epitélio), por isso, nesta espécie não ocorre a passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto, sendo a administração do colostro muito importante para a imunidade do potro. A classificação difusa se deve ao fato de que a vilosidade do córion está distribuída uniformemente sobre toda a superfície de tecido materno, formando pequenos agrupamentos dos vilos apresentando microcotilédones (ALLEN *et al.*, 2002). A característica adeciuada da placenta se deve ao fato de não ocorrer perda de tecido materno durante o parto (GINTHER 1992; GERSTENBERG *et al.*, 1999).

O saco alantoide preenchido com fluido é frequentemente bem definido na imagem ultrassonográfica como uma área não ecogênica (preta) em torno do embrião, que fica localizado no polo ventral e pode ser visualizado a partir do dia 21. O saco vitelino e o saco alantóideo são separados por uma linha ecogênica (branca) que representa as paredes sobrepostas dos dois sacos placentários. O embrião tem a forma de um nódulo ecogênico (branco) na linha de separação. Os batimentos cardíacos (aproximadamente 150 batimentos por minuto) podem ser detectados com um transdutor de 5,0 MHz a partir de 24 dias de idade (GINTHER 1986).

O tamanho do saco alantoide aumenta e o saco vitelino diminui, ocorrendo deslocamento contínuo do embrião, que se distancia da parte ventral da vesícula em direção a sua porção dorsal



(GINTHER, 1986). O saco alantoide aumenta e o saco vitelino diminui. Pode-se observar que o embrião e a linha ecogênica, separando os dois sacos, deslocam-se dorsalmente na vesícula embrionária (GINTHER, 1986).

De 35 a 40 dias começa a ser produzido o eCG (*equine chorionic gonadotropin* ou PMSG) pelos cálices endometriais (LUNN *et al.*, 1997; ALLEN *et al.*, 2002b). A fixação ocorre no dia 37, isto é a migração de células do anel coriônico que penetram profundamente no endométrio. O pico de secreção de eCG ocorre ao redor dos 55 a 70 dias de gestação e corresponde ao período de tamanho máximo dos cálices endometriais (ALLEN 2000).

Na égua, em associação com gonadotrofinas da hipófise, a eCG estimula a formação de corpos lúteos acessórios através da luteinização dos folículos das ondas foliculares, com ou sem ovulação (GINTHER 1992; LUNN *et al.*, 1997; WOODING *et al.*, 2001; ALLEN 2001; DE MESTRE *et al.*, 2008). Dessa forma, aos 40 dias de gestação a concentração de progesterona sérica dobra seu valor (LUNN *et al.*, 1997).

Os corpos lúteos acessórios aumentam em número e persistem até a metade da gestação, quando a placenta já está madura o suficiente para assumir inteiramente o suprimento de progesterona para a manutenção da gestação, sem qualquer ajuda dos ovários (ALLEN 2000; ALLEN 2001; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

No dia 40 (final do estágio de embrião) o embrião e seu âmnio já foram movidos para o polo oposto e o saco vitelínico desaparece, surgindo o cordão umbilical (de Mestre *et al.*, 2008). Por conveniência o 40º dia é designado como o término do estágio de embrião, portanto, essa estrutura passa a ser designada como feto. O cordão umbilical alonga-se após o 40º dia, direcionando o feto para o polo ventral do saco alantoide, atingindo-o ao redor do 48º dia (GINTHER 1986).

Em estudos realizados, foi observada uma maior porcentagem de perda de prenhez em éguas, das raças Puro Sangue Inglês e *Standarbreed*, entre os dias 14 a 28 (23 de 42 perdas) do que entre os dias 28 e 42 (9 de 42) ou 42 a 56 (10 de 42). Estudos ultrassonográficos fornecem subsídios para a hipótese formulada de que a maior incidência de perda embrionária ocorre antes do dia 20 ou 25 do que após estes dias. Essas considerações enfatizam a utilidade da ultrassonografia na detecção precoce de perda embrionária, tanto em nível clínico como em nível de pesquisa. Num outro estudo achou-se uma alta porcentagem de perda entre os dias 15 e 20 (26% de 61 perdas durante o período de 15 a 50 dias de gestação), uma taxa similar foi encontrada entre os dias 30 e 35, porém isso não tem sido confirmado em outros estudos. Já está estabelecido que a taxa de perda embrionária excede a taxa de perda fetal em éguas com gestação simples. Tal fato determina o manejo prático existente nos haras, no qual se consideram éguas com prenhes positiva aquelas que apresentam mais de 42 dias de gestação (GINTHER 1986).



Entre os parâmetros de estado reprodutivo: égua virgem, recém-parida, vazia, com vulvoplastia e o fator idade, o único que teve relação com a perda de prenhes foi a idade das éguas. Éguas de 3 a 6 anos com 15,1% de perda comparando-se com éguas de 7 a 9 anos (19,3%), 10 a 12 anos (21,5%) ou mais velhas (22,2%) (GINTHER 1986).

Outra consideração associada com perda de prenhes é a história de perdas prévias. Em um estudo verificou-se que a taxa de perda em éguas com gestações restabelecidas foi de 40% (8/20). Esse achado indica a presença de problemas crônicos em pelo menos algumas éguas desse grupo (GINTHER 1986).

Transpassar a placenta não implica riscos maiores (CRANE; KOPTA, 1984). A amniocentese realizada a partir da 14ª semana é um dos métodos mais difundidos para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas em humanos (NAZARETH *et al.*, 1981). A punção amniótica precoce em humanos pode ser realizada a partir da nona semana, preferencialmente da 13ª semana em diante (ELEJALDE *et al.*, 1990). O risco de sérias complicações, incluindo perda fetal, varia, nos diferentes centros, de 0,2% a 0,5%. Essa variação deve ser decorrente do método de monitoramento aplicado à punção. Os bons serviços só executam o procedimento de punção se realizado com toda a assepsia de um teatro operatório, incluindo o uso de material esterilizado e o revestimento da sonda de ultrassom com invólucro estéril, uma vez que ela acompanhará a introdução da agulha até o lago amniótico escolhido (GOLBUS *et al.*, 1979).

O mais importante é, realmente, esse monitoramento, de modo a dar a certeza do caminho a ser percorrido pela agulha, o que implica menor probabilidade de obter líquido com sangue ao evitar que a agulha atravesse a cavidade amniótica e puncione vasos ou a placenta localizada posteriormente. O monitoramento evita, também, que a agulha seja introduzida mais de uma vez, o que diminui a possibilidade de lesões fetais. Outras complicações menores são as lesões fetais que aparecem ao nascimento como pequenas cicatrizes na região tocada pela agulha. Se não monitorizadas pelo ultrassom, poderão ocorrer lesões graves, dependendo da região atingida pela agulha, tendo já sido descrita gangrena de membro e lesão de articulação de joelho (MILUNSKY 1979).

Em bovinos a aspiração de fluido amniótico via amniocentese vaginal é realizada de 70 a 100 dias de gestação, utilizando uma pipeta de inseminação acoplada, em uma das extremidades, a uma agulha hipodérmica 40 x 12 e na outra, a uma seringa de 60 mL, o que permite a obtenção de células para análise cromossômica. Esse método é simples e preciso, fornecendo um diagnóstico seguro para detecção do sexo pré-natal e defeitos citogenéticos em bovinos (BONGSO; BASRUR, 1975).

A concentração de testosterona no líquido amniótico, entre 90 e 150 dias de gestação em bovinos, pode ser utilizada para determinar o sexo fetal, com os valores de 442 ± 20 picogramas de testosterona por mililitro para feto masculino e 215 ± 8 picogramas por mililitro para fetos femininos (BONGSO *et al.*, 1976). As células cianofílicas (basofílicas) pequenas e nucleadas no líquido amniótico são as mais ativas e mitóticas e podem ser utilizadas para a detecção do sexo e perfil



citogenético do feto bovino (BONGSO; BASRUR, 1975).

Kamimura e colaboradores (1996) realizaram 35 aspirados via transvaginal a partir de 30 vacas, obtendo 33 amostras. Cinco vacas foram aspiradas duas vezes com um intervalo de 10 dias, utilizando-se um transdutor de 5,0 MHz equipado com uma guia de biopsia acoplada a uma agulha de 65 cm de comprimento com calibre de 8 mm. Ocorreram 5 abortos após 1 semana da punção. Concluiu-se que o procedimento requer considerável habilidade e oferece risco à viabilidade fetal.

Na avaliação da fisiologia reprodutiva de éguas submetidas ao procedimento de colheita de material ovariano com agulha Tru-cut® mediante a guia ultrassonográfica pelo fundo do saco vaginal, demonstrou-se em duas temporadas de monta controladas subsequentes que não apresentaram quaisquer alterações do complexo reprodutivo. Em ambas as temporadas de monta controladas foram obtidas prenhes positivas de 100% dos animais do experimento (GEBE *et al.*, 2025). O que corrobora com o verificado por Franco (2006) que as lesões ovarianas causadas pela agulha de aspiração que se utiliza do fundo do saco vaginal não afetam a função ovariana no ciclo subsequente, em éguas crioulas, mesmo sendo o ovário que irá ovular, o mesmo anteriormente aspirado. Gaetano *et al.* (2005) confirmam que em éguas submetidas a exames ultrassonográfico após cada aspiração nenhuma alteração foi encontrada com exceção de duas éguas nas quais o corpo lúteo (CL) não se formou após aspiração de folículo do estro. Das 20 éguas envolvidas neste estudo, 10 foram inseminadas artificialmente com sêmen fresco de um único garanhão fértil no primeiro cio espontâneo após a aspiração anterior. Das 10 éguas inseminadas, sete estavam prenhes 16, 30 e 50 dias após a inseminação artificial (IA), indicando que aspiração transvaginal guiada por ultrassons repetidos não afetaram adversamente a fertilidade.

Segundo Viana *et al.* (2003), um outro fator que pode dificultar o estabelecimento mais preciso da relação entre intensidade de punção para coleta de oócitos em equinos e ocorrência de lesões é o tipo de agulha utilizado. É relatada a utilização de agulhas com calibres 17 (GIBBONS *et al.*, 1994; FRY *et al.*, 1998; SCHERNTHANER *et al.*, 1999); calibres 18 (STUBBINGS; WALTON, 1995; BONI *et al.*, 1997); calibres 19 (MACHATKOVÁ *et al.*, 2000); e calibres 20 (BOLS *et al.*, 1996b); Gauge descartáveis (MACHATKOVÁ *et al.*, 2000) ou não (VOS *et al.*, 1994; STUBBINGS; WALTON, 1995; BONI *et al.*, 1997). Agulhas de menor calibre apresentam menor área de corte, sendo potencialmente menos danosas ao tecido, enquanto agulhas descartáveis, por terem o bisel mais afiado, exercem menor pressão sobre as estruturas puncionadas (BOLS *et al.*, 1997). A baixa incidência de lesões em animais submetidos a até 20 sessões de punção é coerente com a observação de que o procedimento não causa, necessariamente, comprometimento da fertilidade (GIBBONS *et al.*, 1994). O uso de agulhas de menor diâmetro (19 e 20 G) e descartáveis pode ter contribuído para reduzir a extensão das lesões decorrentes das punções. Nos animais submetidos a mais de 20 sessões, a incidência de alterações macroscópicas



e histológicas aumentou significativamente. A frequência das punções, neste caso, pode ter sido superior à capacidade de regeneração do órgão (SANTL *et al.*, 1998).

5 MATERIAIS E MÉTODO

O aparelho de punção foi testado *in-vivo* e em peças de abatedouro (aparelho reprodutivo feminino equino). Foram testadas e adaptadas duas guias de biópsia que se utiliza em aspiração folicular, uma acoplada a uma sonda setorial móvel e outro a uma sonda setorial fixa. O protótipo compõe-se de um aparelho de punção acoplado de maneira adaptada a uma das guias de biópsia, conforme Figura 1.

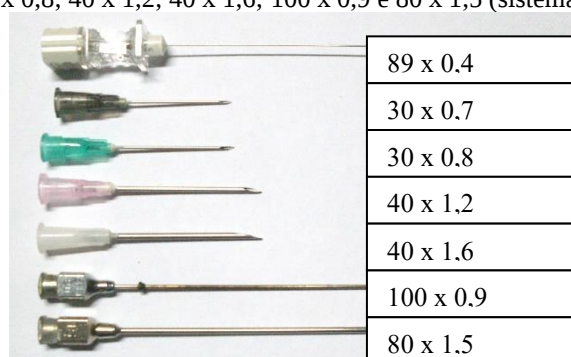
Figura 1: Aparelho de punção: verifica-se recipiente de armazenagem de amostra (palheta 0,5 mL), acoplado numa extremidade a uma agulha e a outra extremidade a uma seringa que é o módulo do aparelho de punção que encontra-se dorsalmente acoplado à guia de biópsia guiado por transdutor setorial conectado a um aparelho de ultrassonografia Falcon®.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Também, foram testados calibres e comprimentos de agulhas variados a fim de verificar a eficácia destes em transpassar as barreiras: fórnix, útero e anexos placentários. Foram testadas as agulhas 27G 3^{1/2}; 22G 1^{1/4}; 21G 1^{1/4}; 18G 1^{1/2}; 16G 1^{1/2}; 20G 4; 15G 3^{3/20} (sistema inglês, pol.) de, respectivamente, seguintes dimensões no sistema métrico em milímetro (comprimento x diâmetro): 89 x 0,4; 30 x 0,7; 30 x 0,8; 40 x 1,2; 40 x 1,6; 80 x 1,5 e 100 x 0,9 e, respectivamente, sistema adotado pelo comércio: 89x4; 30x7; 30x8; 40x12; 40x16; 80 x 15 e 100 x 09, mostrado na Figura 2.

Figura 2: Agulhas testadas para a punção de vesículas embrionária/fetal equina via fundo do saco vaginal, de cima para baixo: 89 x 0,4; 30 x 0,7; 30 x 0,8; 40 x 1,2; 40 x 1,6; 100 x 0,9 e 80 x 1,5 (sistema métrico em milímetro (mm)).



Fonte: Elaborado pelos autores.

O presente trabalho irá adotar na sua explanação o sistema métrico na especificação das agulhas testadas. O aparelho de punção compõe-se de uma agulha acoplada a uma palheta de 0,5 mL (recipiente

de armazenagem de amostra); este conjunto acopla-se a uma das extremidades de uma pipeta de inseminação equina e na outra extremidade da pipeta a uma seringa de 1 mL. A guia de biópsia se acopla a um transdutor setorial de cinco MHz, que é conectado a um aparelho de ultrassom Falcon Vet®. O aparelho de ultrassom possui uma opção de programação, para o transdutor setorial móvel, que exibe na tela uma linha indicando o trajeto da agulha.

Foram utilizadas 29 éguas para punção de amostras de líquido vitelínico e/ou alantoide de embriões e/ou fetos equinos num total de 65 procedimentos de punções, portanto, ocorreram repetições em momento diferentes e/ou com agulhas diferentes em certas éguas. As amostras de anexos embrionários ou fetais de equinos foram coletadas por meio de punção via fundo de saco vaginal de éguas prenhes, utilizando o protótipo acoplado à guia de biópsia. O procedimento iniciou-se com a antisepsia do trato genital externo utilizando detergente e água corrente, secando-se a região perineal com papel-toalha. O embrião, ou feto, foi localizado por meio de exame retal, enquanto a guia de biópsia é introduzida por via vaginal e guiada até o fórnix na área mais próxima ao *conceptus*. A guia de biópsia é revestida com digluconato de clorexidina 0,7 % em pasta (Furanil®), a fim de promover a antisepsia do local da punção, possuindo efeito antimicrobiano geral, antifúngico e antiprotzoário. Em seguida, a agulha foi exposta e atravessou as camadas da parede vaginal; logo após, o útero e anexos embrionários, ou placentários, chegando ao espaço preenchido por líquido vitelínico ou alantoide. Este líquido proveniente do *conceptus* foi puncionado e armazenado no interior do aparelho de biópsia. Todo o procedimento foi guiado ultrassonograficamente com transdutor setorial, via fundo de saco vaginal. Após a obtenção do fluido dos anexos, a agulha retornou à proteção da guia de biópsia e o conjunto foi retirado da égua. Não foi preestabelecido um período de gestação em que a punção pudesse ser feita, sendo que esta foi realizada entre 18 dias e 11 meses de gestação. A análise estatística consistiu na comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de animais puncionados e a frequência de abortos de acordo com o tipo (100 x 09; 30 x 0,7; 30 x 0,8; 40 x 1,2; 40 x 1,6; 80 x 1,5; 89x0,4), comprimento (30; 40; 80; 89; 100 mm) e o diâmetro da agulha (0,4; 0,7; 0,8; 0,9; 1,2; 1,5; 1,6 mm). Também foi verificada a existência de correlação entre a frequência de animais puncionados e a frequência de abortos com o diâmetro e comprimento da agulha e idade dos animais. O aplicativo estatístico utilizado foi o Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se nas éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 89 x 0,4 mm que não foi possível proceder com a punção, tanto da prenhes precoce (30 dias) quanto mais da tardia (150 dias) (Figura 3).



Figura 3: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 89 x 0,4 mm Punção (- = não obtenção de fluido, +=obtenção de fluido).

Agulha 89x4 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
11	7	30	-	-
20	9	150	-	-
53	26	150	-	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

A utilização da agulha 30 x 0,7 mm nas éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal (Figura 4) mostrou-se eficiente nas gestações mais precoces, isto é, até os 60 dias, não causando perda embrionária em nenhuma das intervenções.

Figura 4: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 30 x 0,7 mm Punção (- = não obtenção de fluido, + = obtenção de fluido).

Agulha 30 x 0,7 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
6	3	21	+	-
48	22	21	+	-
2	2	23	+	-
12	7	30	+	-
47	21	30	+	-
52	25	30	+	-
8	5	45	+	-
13	7	60	+	-
14	8	60	+	-
9	6	70	-	-
15	8	90	-	-
34	14	90	-	-
41	18	90	-	-
36	15	120	+	-
39	17	120	-	-
62	29	150	-	-
37	16	180	-	-
59	28	180	-	-
22	10	210	-	-
56	27	210	-	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

No caso das éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 30 x 0,8 mm (Figura 5) verificou-se uma maior possibilidade de se realizar a punção até os 90 dias de gestação, sem se constatar perdas do conceito.



Figura 5: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 30 x 0,8 mm Punção (- = não obtenção de fluido, + = obtenção de fluido).

Agulha 30 x 0,8 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
10	6	70	+	-
35	14	90	+	-
42	18	90	+	-
49	23	90	+	-
18	9	120	-	-
21	9	150	+	-
30	12	150	-	-
32	13	150	-	-
54	26	150	-	-
50	24	180	-	-
3	2	210	-	-
24	10	240	-	-
27	11	240	-	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

A agulha 100 x 0,9 mm mostrou o mesmo comportamento da agulha 30 x 0,8 mm nas éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal, isto é, possibilidade maior de punção até os 90 dias de gestação, porém, verificou-se perda deste conceito (Figura 6).

Figura 6: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 100 x 0,9 mm Punção (- = não obtenção de fluido, + = obtenção de fluido).

Agulha 100 x 0,9 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
1	1	18	+	-
17	8	90	+	+
64	29	150	-	-
61	28	180	-	-
51	24	180	+	-
4	2	210	-	-
58	27	210	-	-
28	11	240	-	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

A punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 40 x 1,2 mm possibilitou um maior sucesso do procedimento até os 120 dias de gestação. Aos 150 dias de gestação ocorreu perda de gestação de uma das éguas puncionadas com a agulha 40 x 1,2. A agulha 40 x 1,2 proporcionou alguns sucessos do procedimento de punção em casos mais avançados como aos 180 e 210 dias de gestação sem perda do conceito (Figura 7).



Figura 7: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 40 x 1,2. Punção (- = não obtenção de fluido, + = obtenção de fluido).

Agulha 40 x 1,2 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
7	4	35	+	-
16	8	90	-	-
19	9	120	+	-
40	17	120	+	-
31	12	150	+	+
33	13	150	+	-
63	29	150	-	-
55	26	150	-	-
38	16	180	+	-
60	28	180	-	-
57	27	210	-	-
23	10	210	+	-
25	10	240	-	-
43	19	300	-	-
45	20	300	-	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

No grupo de éguas onde se utilizou a agulha 80 x 1,5 mm para a realização da punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal constatou-se a possibilidade de sucesso aos 210 dias de gestação e aos 240 dias um dos procedimentos não obteve sucesso (Figura 8). Não se verificou a perda do conceito ao se utilizar a agulha 80 x 1,5 mm nas suas punções.

Figura 6: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando a agulha 80 x 1,5 mm Punção (- = não obtenção de fluido, + = obtenção de fluido).

Agulha 80 x 1,5 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
65	8	210	+	-
5	2	210	+	-
26	10	240	-	-
29	11	240	+	-

Fonte: Elaborado pelos autores.

Nas éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando agulha 40 x 1,6 mm (Figura 9) verificou-se a possibilidade de punção nas gestações tardias, porém, os dois procedimentos levaram a perda do conceito.

Figura 9: Éguas submetidas a punção de vesículas embrionária/fetal via fundo do saco vaginal utilizando agulha 40 x 1,6 mm Punção (- = não obtenção de fluido, + = obtenção de fluido).

Agulha 40 x 1,6 mm				
Nº da intervenção	Nº da égua	Dias de prenhes	Punção	Reabsorção aborto
44	19	300	+	+
45	20	300	+	+

Fonte: Elaborado pelos autores.

Na maioria das intervenções, as agulha de menor calibre transpassaram a parede do útero mas não perfuraram a placenta, empurrando-a sem penetra-la. Nas gestações mais avançadas as agulhas de



menor calibre amassavam-se e não penetravam as barreiras, fazendo-se necessária a utilização de agulhas de calibres maiores na medida do avançar da gestação. Período de punção ideal está compreendido entre dias 35 e 60, por ser um período de menor percentual de ocorrência de perdas naturais e constatar-se que os anexos placentários ainda não estão tão espessos, além do posicionamento do útero permitir sua manipulação com maior facilidade.

Procedeu-se um total de 65 intervenções de punção do concepto, independentemente da idade de gestação, em 29 éguas verificando-se em 36 procedimentos sucesso na punção (55%), isto é, obtenção de fluido do concepto. No decurso das 65 intervenções constatou-se um total de cinco perdas do concepto, que reflete uma perda de 7,7% das intervenções (n=65), 13,8% das éguas em que a punção foi bem sucedidas (n=36) e 17% da população estudada (n=29).

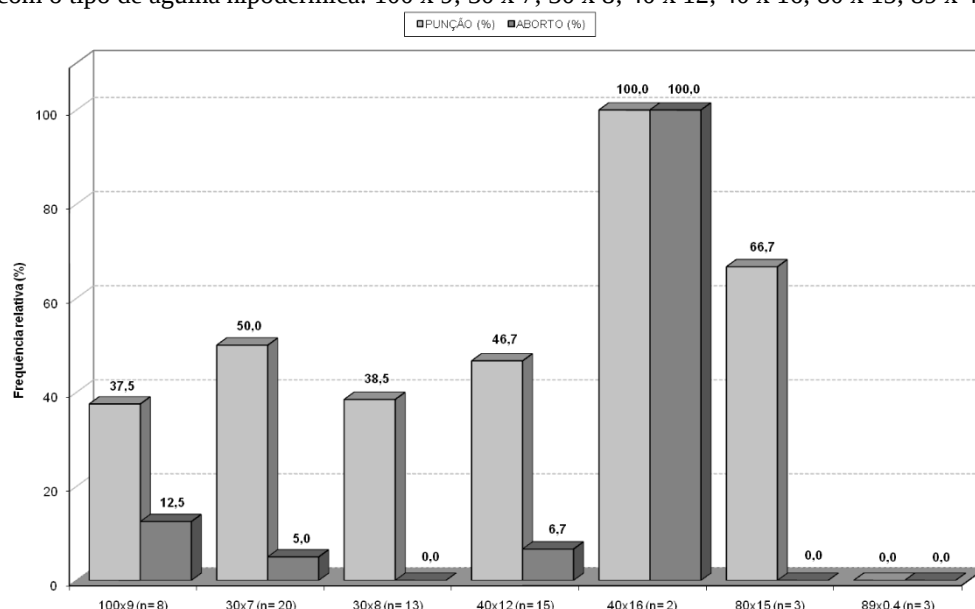
Um fator a ser considerado é a determinação do dia mínimo em que a técnica deve ser realizada, objetivando-se evitar o período em que há possibilidade de ocorrerem perdas embrionárias espontâneas, evitando dúvidas a respeito da causa da perda embrionária. Pode-se tomar como exemplo o caso da égua número 26 na qual houve perda embrionária e que foi puncionada nesse período (dia 30) em que ocorrem 21,4 % das perdas naturais (Ginter 1986). Nesse caso não foi possível estabelecer a causa real da perda embrionária. A contração uterina no dia da punção desta égua não condizia com uma contração característica de prenhes, o que evidencia uma concentração ineficiente de progesterona. Em tal período ainda não há formação dos cálices endometriais (dia 33), que são responsáveis pela formação dos corpos lúteos acessórios produtores de progesterona. No dia seguinte à punção, o embrião apresentava formato normal; após cinco dias (dia 35) foi realizada a ultrassonografia da égua e constatou-se a perda embrionária. Outro fator a ser considerado é a produção de prostaglandinas que levam à luteólise, decorrentes de agressões ao útero. Os abortos das éguas de número 8 (punção aos 3 meses de gestação) e 13 (punção aos 5 meses) ocorreram 5 dias após as punções, nos dois conceptos obteve-se as amostras de fluido do concepto na terceira tentativa. Não há constatação do que pode ter causado o aborto, porém pode ter sido o excesso de manipulação. A causa do aborto dos fetos de dez meses, éguas de número 20 e 21, provavelmente tenha sido da técnica, pois durante a punção os fetos se mexiam muito e as éguas encontravam-se inquietas, além de ter sido difícil perfurar as placentas e chegar a cavidade alantoide, devido à espessura das placentas em relação ao comprimento das agulhas utilizadas. Primeiro com agulhas de calibre 40/1,2 mm não foi possível a realização da punção. Com a agulhas de calibre 40/1,6 mm (maior calibre testado) foram necessárias várias tentativas, até que a agulha perfurasse os anexos placentários e, provavelmente, resultou na perda do concepto. Indica-se, portanto, em casos de prenhes avançada, a utilização de agulhas de maior comprimento. Em uma das tentativas a agulha atingiu o feto da égua 21 provocando a presença de sangue na amostra e na guia de biópsia. Esses fatores podem ter contribuído para o aborto que foi observado no dia seguinte. A técnica pode ser melhorada através da compreensão de que existe uma



correlação positiva entre o calibre das agulhas e a idade de gestação e que quanto maior a idade de gestação também maior deve ser o comprimento da agulha, respectivamente, devido a maior resistência e maior espessura da placenta. A utilização de tranquilizantes e anestesia peridural na égua deve ser levada em conta, de maneira semelhante à metodologia utilizada em bovinos (Kamimura *et al.*,1996), visto que a inquietação da égua prejudica a realização da técnica.

A correlação entre idade do concepto e possibilidade de realização ou não da punção mostrou que quanto maior a idade gestacional, menor a possibilidade de realização da punção ($r = -0,3877$; $P = 0,0005$). Na análise da correlação entre idade do concepto e incidência de aborto foi verificada uma baixa correlação sem significância ($r = 0,1114$; $P=0,1888$).

Figura 10: Comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de éguas puncionadas e a frequência de abortos de acordo com o tipo de agulha hipodérmica: 100 x 9; 30 x 7; 30 x 8; 40 x 12; 40 x 16; 80 x 15; 89 x 4 (calibre).



Fonte: Elaborado pelos autores.

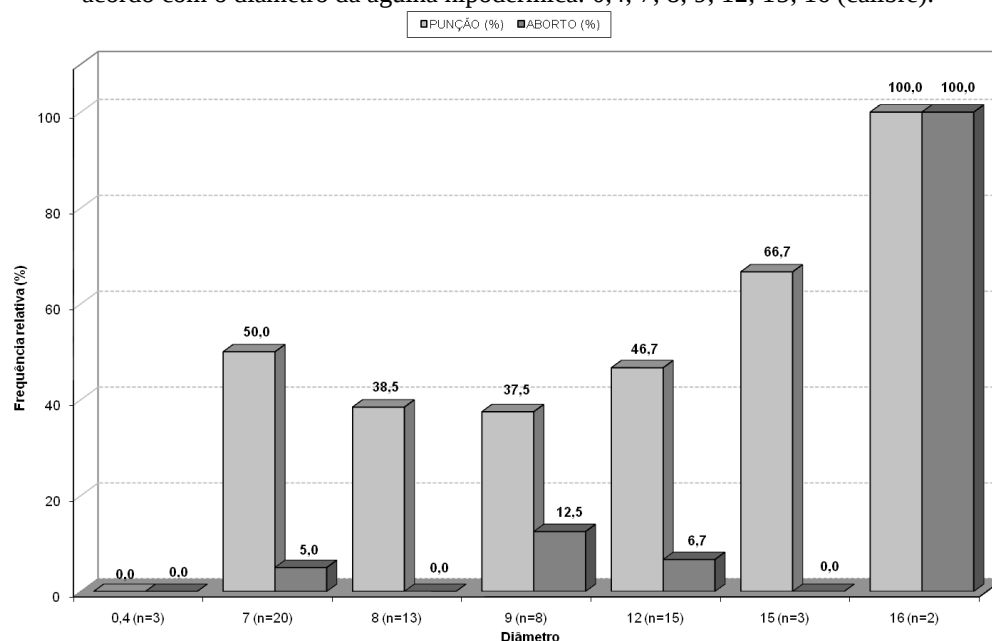
Ao comparar as agulhas na figura 10, deve-se ressaltar a idade gestacional e consequente espessura do fôrnix, útero e placenta em que elas foram utilizadas, visto que em gestações iniciais foram utilizadas agulhas de baixo calibre e em gestações mais avançadas as de maior calibre. A agulha 40 x 16 mm obteve o pior desempenho no que diz respeito ao aborto; no entanto, foi eficiente na punção, apesar do número pequeno de eventos. Não houve nenhum aborto com as agulhas 30 x 8 e 80 x 15 mm, apesar de ter um diâmetro grande, a agulha 80 x 15 mm mostrou-se eficiente, pois foi utilizada em gestações mais avançadas (a partir de 210 dias). A agulha 89 x 4 mm não obteve sucesso em perfurar as estruturas, ela se curvava ao ser pressionada contra o fôrnix e não o perfurava; ao cessar a pressão, a agulha voltava a seu formato normal.

O diâmetro das agulhas está diretamente relacionado tanto ao sucesso da punção quanto à ocorrência de aborto como verificado na Figura 11. Quanto menor o diâmetro, menor é a resistência



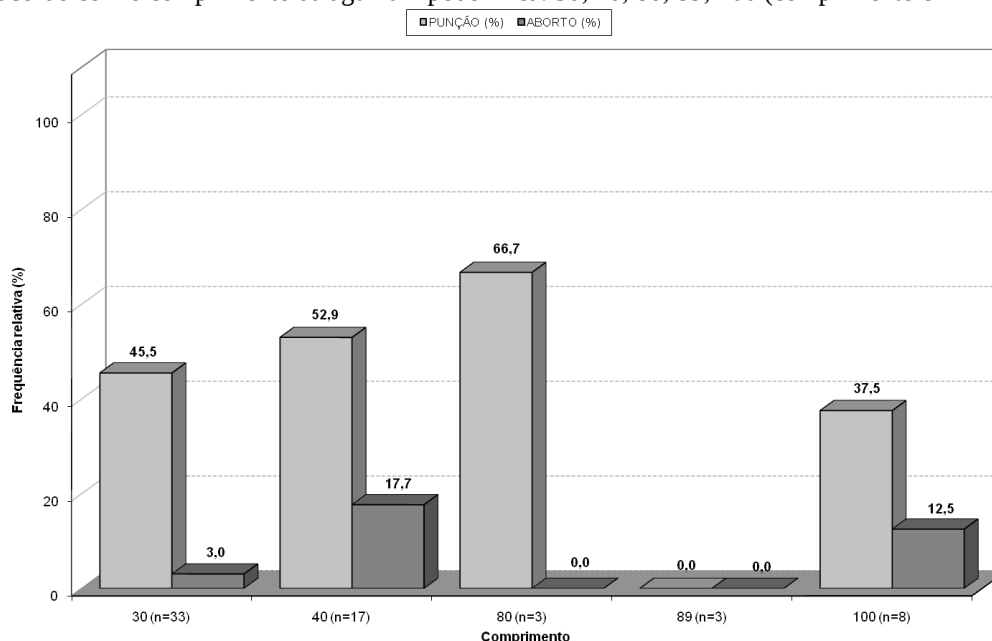
da agulha em relação a dano estrutural (entortar-se) e menor é a porcentagem de sucesso na punção. Vale lembrar, quanto maior a espessura a ser perfurada, maior resistência é exigida da agulha. Quanto maior o diâmetro da agulha, maior é o diâmetro da perfuração e maior é a lesão na estrutura perfurada.

Figura 11: Comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de éguas puncionadas e a frequência de abortos de acordo com o diâmetro da agulha hipodérmica: 0,4; 7; 8; 9; 12; 15; 16 (calibre).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 12: Comparação, pelo teste de qui-quadrado, entre a frequência de éguas puncionadas e a frequência de abortos de acordo com o comprimento da agulha hipodérmica: 30; 40; 80; 89; 100 (comprimento em mm).



Fonte: Elaborado pelos autores.

O comprimento está diretamente relacionado ao sucesso da punção, uma vez que em gestações mais avançadas a espessura útero/placenta é maior, conforme se verifica na Figura 12. Verificou-se, na



técnica da punção, que a distância não depende apenas das espessuras fundo de saco vaginal, parede uterina e placenta do concepto, uma vez que a aproximação dessas estruturas depende da força que o técnico exerce sobre elas, pressionando-as, além do grau de dificuldade, que é variável nos indivíduos. Soma-se a esse fato a variação da contração da musculatura retal, já que a aproximação da vesícula é realizada por esta via. É importante ressaltar que o fundo de saco vaginal funciona como um limitador do alcance da agulha, pois a força exercida na superfície deste é aumentada visto que a agulha se encontra no interior da guia de biópsia, que possui uma área de superfície muito maior, limitando a elasticidade e deslocamento do fórnix em direção ao útero durante a punção. Sugere-se que nos estudos subsequentes a guia de biópsia seja modificada de forma que o aparelho de punção possa ultrapassar a porção final da guia de biópsia, podendo haver, provavelmente, uma perda momentânea da visualização correta do local da punção durante a pressão final da agulha sobre o fórnix. No entanto, deve-se ressaltar que durante a punção ocorre visualização do caminho percorrido pela agulha, tornando diminuta a relação entre comprimento da agulha e porcentagem de aborto e que no cálculo estatístico dessa relação os valores obtidos estão influenciados pelo diâmetro.

Conclui-se que o diâmetro das agulhas está diretamente relacionado tanto ao sucesso da punção quanto à ocorrência de aborto, quanto maior a idade gestacional menor é a possibilidade de realização da punção e que não houve nenhum dano às éguas mesmo quando houve reabsorção ou abortamentos, mostrando que a técnica é segura para as éguas, independente de suas fases gestacionais.



REFERÊNCIAS

ABD-ELNAEIM, M.M.M.; LEISER, R.; WILSHER, S.; ALLEN, W.R. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta**, v. 27, p. 1103-1113, 2006. Disponível em: <https://sci-hub.se/10.1016/j.placenta.2005.11.005>, Acessado em 15/02/2025.

ABREU, R.G.; PEDRETTI, J.E.; ALMEIDA FILHO, P.R.O.; CARVALHO, E.C.Q.; SHIMODA, E.; SILVA, J.F.S. Agulha Tru-Cut® associada a guia ultrassonográfica paa a coleta de biópsias de ovário equino. **Revista Aracê**, v. 7, n. 6, p.29816-29835, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.56238/arev7n6-045>, Acesso em: 12/06/2025.

ALLEN, W.R. **The Physiology of Early Pregnancy in the Mare**. In: American Association of Equine Practitioners. Proceedings, v. 46, p. 338-354, 2000. Disponível em: <https://www.ivis.org/sites/default/files/library/aaep/2000/338.pdf>, Acesso em: 17/02/2025.

ALLEN, W.R.; WILSHER, S.; STEWART, F.; OUSEY, J.; FOWDEN, A. The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy. **Journal of Endocrinology**, v. 172, p. 237-246, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11834441/>, Acesso em: 11/02/2025.

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 121, p. 513-527, 2001. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/4/513.xml>, Acesso em: 11/02/2025.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M. & DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-1014, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X96000283>, Acesso em: 13/02/2025.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on themorphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728071/>, Acesso: 17/02/2025.

BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K. Prenatal diagnosis of sex in cattle by amniocentesis, **Vet. Rec.**, v. 96, n. 6, p. 124-126, 1975. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1119062/>, Acesso em 14/11/2024.

BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K.; YOUNGLAI, E. V. Prediction of fetal Sex in cattle by testosterone levels in allantoic fluid, **J. Reprod. Fertil.**, v. 46, n. 2, p. 441-442, 1976. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/943530/>, Acesso em: 20/02/2025.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J. & KRUIP, T. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v. 48, p. 277-289, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X97840757>, Acesso em: 23/03/2025.

CARMO M.T.; OLIVEIRA J.V.; ALMEIDA M.T.; ALVARENGA M.A. **Sexagem em equinos através da avaliação ultrassonográfica da gônada fetal**. In: *SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES*, 08, 2007, Costa do Sauípe. Anais...Costa do Sauípe: SBTE, 2007.



CRANE, J.P.; KOPTA, M.M. Genetic amniocentesis: impact of placental position upon the risk of pregnancy loss. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.150: 813-816, 1984. Disponível em: [https://www.ajog.org/article/0002-9378\(84\)90454-X/abstract](https://www.ajog.org/article/0002-9378(84)90454-X/abstract), Acesso em 14/03/2025.

DE MESTRE, A.M.; BACON, S.J.; COSTA, C.C.; LEADBEATER, J.C.; NORONHA, L.E.; STEWART, F.; ANTCZAK, D.F. Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles. **Placenta**, 29: 158-169, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400407002548>, Acesso em: 23/03/2025.

ELEJALDE, B.R. *et al.* Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: its feasibility risks, complications and use in genetic prenatal diagnosis. **American Journal of Medical Genetics**, v. 35, p.188-196, 1990. Disponível em: <https://articles.researchsolutions.com/prospective-study-of-amniocentesis-performed-between-weeks-9-and-16-of-gestation-its-feasibility-risks-complications-and-use-in-early-genetic-prenatal-diagnosis/doi/10.1002/ajmg.1320350210>, Acesso em: 23/04/2025.

FRANCO, V. C. L. **Fertilidade de éguas crioulas após aspiração folicular**. 2006. 41f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/10247>, Acesso em: 07/11/2024.

FRY, R. C.; SIMPSON, T. L.; SQUIRES, T. J. Ultrasonic all y guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, v. 49, p. 1077-1082, 1998. Disponível em: <https://www-sciencedirect-com.ez81.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0093691X98000570?via%3Dihub>, Acesso em: 29/03/2025.

GAETANO, M.; MERLO, B.; LACONO, E.; BELLUZZI, S. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations, **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 299–308, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com /science/article/pii/S0378432005000254>, Acesso em: 12/11/2024.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 143-152, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10645255/>, Acesso em: 23/11/2024.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E. & GWAZDAUSKAS, F. C. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16727548/>, Acesso em: 08/02/2025.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. 2.ed. Cross Plains: *Equiservices*, 378p, 1986.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2.ed. Cross Plains: *Equiservices*, 642p, 1992.

GOLBUS, M.S.; LOUGHMAN, W.D.; EPSTEIN, C.J.; HALBASCH, G.; STEPHENS, J.D.; HALL, B.D. Prenatal diagnosis in 3.000 amniocenteses. **New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 157-163, 1979. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/153471/>, Acesso em: 06/11/2024.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ª Ed. Monole, São Paulo, 513 p., 2004.



KAMIMURA, S.; NISHIYAMA, L. N.; OOKUTSU, I. S.; GOTO, K.; HAMANAL, K. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis, **Theriogenology**, v.47,(8), p.1563-9, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728098/>, Acessado em: 02/11/2024.

LUNN, P.; VAGNONI, K.E.; GINTHER, O.J. The equine immune response to endometrial cups. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 34, p 203-216. 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037897000442>, Acessado em 02/02/2025.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F. & KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, p. 543-550, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00003691>, Acesso em: 03/11/2024.

MILUNSKY, A. **Sex chromosome and X-linked disorders**, In: Milunsky A. Genetic disorders and the fetus. Plenum Press, Nova York, p. 157-208, 1979. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-3438-5_6, Acesso : 02/03/2025.

NAZARETH, H. R. S.; PINTO JR, W.; ANDRADE, J. A. D. Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. Primeira experiência brasileira. **Revista Brasileira de Genética**, v. 4, n.3, p. 459-470, 1981. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/items/19d4b99c-16f4-482c-a3d9-30875e0a38e9/full>, Acesso em: 04/04/2025.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAIEM, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction, Jokioinemi Finlândia. **Theriogenology**, v 44 , n. 5: 619-627, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16727760/>, acesso em: 12/11/2024.

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Fetal Sex determination**, Current therapy in equine reproduction, Published Elsevier, p. 343-356, 2007.

SHARP, D.C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 679-689, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10844234/>, Acesso em: 03/11/2024.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G. & WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v. 50, p. 89-100, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10734477/>, Acesso em: 27/04/2025.

SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G. A.; MODL, J.; WOLF, E. & BREM, G. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in non lactating cows from different breeds. **J. Vet. Med. A.**, v. 46, p. 33-37, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0442.1999.00177.x>, Acesso em: 27/04/2025.

STOUT, T.A.E.; ALLEN, W.R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.121: 771-775, 2001. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/downloadpdf/view/journals/rep/121/5/771.pdf>, Acesso em: 10/02/2025.

STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 43, p. 705-712, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16727661/>, Acesso em: 13/11/2024.



VIANA, J.H.M.; NASCIMENTO, A.A.; PINHEIRO, N.L.; FERREIRA, A.M.; CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; JÚNIOR, A.P.M. Caracterização de sequelas subseqüentes à punção folicular em bovinos, **Pesq. Vet. Bras**, v. 23(3), p. 119-124, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/mMmLGMD7HGNYKWHdkkbDZVp/>, Acesso em: 11/12/2024.

VOS, P. L. A. M.; LOOS, F. A. M.; PIETERSE, M. C.; BEVERS, M. M.; TAVERNE, M. A. M. & DIELEMAN, S.J. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 829-840, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16727437/>, Acesso em: 06/08/2024.

WOODING, F.B.P.; MORGAN, G.; FOWDEN, A.L.; ALLEN, W.R. A Structural and Immunological Study of Chorionic Gonadotrophin Production by Equine Trophoblast Girdle and Cup Cells. **Placenta**, v. 22, p. 749-767, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11597196/>, Acesso em: 03/11/2024.

