



Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos

Strategies to improve reproductive efficiency in equine embryo transfer programs

Marco Antonio Alvarenga¹, Eriky Akio Oliveira Tongu

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

¹Correspondência: malvarenga@fmvz.unesp.br

Resumo

A transferência de embrião (TE) é uma importante biotecnologia aplicada a reprodução equina sendo comercialmente utilizada no Brasil desde a década de 80. Devido ao seu grande sucesso, o avanço em busca de melhorias para programas TE vem se tornando cada vez mais importante, procurando solucionar as principais causas de infertilidade em éguas, assim como melhorar a utilização de éguas idosas e subfêrteis. O presente artigo procura abordar os principais problemas relacionados a TE em equinos, assim como buscar estratégias que visem solucionar ou minimizar fatores que interferem na eficiência reprodutiva.

Palavras chave: éguas idosas, transferência de embriões, equinos.

Abstract

Embryo transfer (ET) is an important biotechnology applied to equine reproduction, and is commercially used in Brazil since the 1980's. Due its great success, the search for improvements in TE programs is mostly important for finding the main causes of infertility in mares, as well as improving the use of older and sub fertile mares. This article aims to address the main problems related to ET in equine, as well as to seek strategies to solve or minimize factors that interfere in reproductive efficiency.

Key words: old mare, embryo transfer, horses.

Introdução

O interesse nos últimos anos pelo uso da Transferência de Embriões (TE) tem crescido na indústria do cavalo. Ultimamente, quase a totalidade das associações de criadores de cavalo reconhecem os benefícios da técnica, permitindo o seu uso. No Brasil, o uso da técnica foi iniciado pelo Médico Veterinário João Junqueira Fleury comercialmente em 1986 (Lira et al., 2009).

Existe uma grande variedade de raças que utilizam a técnica, sendo as mais atuantes: Mangalarga Marchador, Campolina, Quarto de Milha e Mangalarga Paulista (Alvarenga e Losinno, 2006). Existem no Brasil cerca de 30 centros de TE em equinos, parte deles prestador de serviços para terceiros e o restante para uso exclusivo em animais de um único proprietário. Na raça Quarto de Milha e nas raças de Hipismo as TEs são tradicionalmente realizadas em centrais de reprodução. Já em outras raças como Mangalarga, as TEs são realizadas em sua maioria em estruturas montadas no próprio Haras do criador (Alvarenga e Losinno, 2006).

Atualmente o Brasil lidera a produção de embriões equinos respondendo por cerca de 50% dos embriões transferidos no mundo, produzindo anualmente cerca de 25.000 embriões transferidos (Losinno e Urosevic, 2015).

A TE, assim como qualquer outra biotecnologia reprodutiva, apresenta algumas limitações. As principais dizem respeito à eficiência do programa que é comprometida principalmente por três fatores: dificuldade na indução de superovulação de éguas; elevado percentual de doadoras idosas e éguas com problemas e manipulação inadequada do sêmen. Estes fatores associados ou isolados fazem com que a eficiência de programas de TE nesta espécie sejam baixas, sendo necessários 2 a 3 ciclos para se obter uma gestação (Squires et al., 2003; Alvarenga et al., 2008; Squires e Hon 2009; Jacob et al., 2010). Desta forma, os custos para a produção de um potro proveniente de TE são elevados.

O presente artigo procura abordar os principais problemas relacionados a TE em equinos, assim como estratégias que procuram solucionar ou minimizar fatores que interferem na eficiência reprodutiva.

Protocolos de superovulação em éguas

O principal obstáculo relacionado a superovulação de éguas está relacionada a refratariedade da égua aos preparados hormonal à base de hormônio folículo estimulante (FSH) suíno disponíveis comercialmente, sendo necessário o uso de FSH homólogo para se obter resposta ovariana ao tratamento. Desta forma, o extrato



de pituitária equina (EPE) e o FSH equino purificado e mais recentemente o FSH recombinante são os preparados indicados para induzir-se superovulação na fêmea equina (Alvarenga et al., 2008). Os protocolos superovulatórios tem se mostrado eficientes em induzir múltiplas ovulações (4 a 5 ovulações/égua), contudo a recuperação embrionária tem sido baixa, com uma média de 30% embriões/ovulação (Alvarenga, et al., 2008).

Durante o processo de múltiplas ovulações podem ocorrer alguns distúrbios na captação dos ovócitos para o oviduto em éguas. Em éguas superovuladas com número menor de 3 ovulações, a taxa de recuperação de ovócitos no oviduto foi similar a obtida no grupo de éguas com ovulações espontâneas. Este fato é correlacionado a uma provável obstrução da fossa de ovulação provocada pelo sangramento de ovulações subsequentes (Alvarenga et al., 2008).

Recentemente Nagao et al. (2012), demonstraram que o uso de baixas doses de acetato de deslorelina próximo ao momento da dominância folicular, induzem com eficiência duplas ovulações em éguas da raça brasileira de Hipismo e melhoram as taxas de recuperação embrionária.

Segabinazzi et al. (2015) compararam 2 protocolos, o primeiro sem acompanhamento folicular e o segundo com acompanhamento folicular. No protocolo sem acompanhamento foram utilizadas duas aplicações de PGF_{2α} com intervalo de 14 dias. O tratamento com acetato de deslorrelina se iniciava 48 horas após a segunda aplicação de PGF_{2α}, sem qualquer avaliação do *status* reprodutivo das éguas. Foi então aplicado 125 µg por via intramuscular (IM) de acetato de deslorelina (Sincrorrelin® - Ouro Fino, Brasil) a cada 12 horas. No terceiro e quarto dia de tratamento com acetato de deslorelina as éguas foram avaliadas através de palpação retal e ultrassonografia. Utilizando esse protocolo sem controle folicular 44% das éguas apresentaram duplas ovulações.

Nos animais que a dinâmica folicular foi acompanhada, apresentaram no mínimo um folículo ≥ 28 mm durante estas avaliações, o tratamento com acetato de deslorelina foi continuado até a detecção de dois ou mais folículos ≥ 35 mm ou um ≥ 38 mm e edema endometrial grau 2 (Samper 2008). Quando a ovulação foi induzida utilizando 750 µg de acetato de deslorelina IM e 1650 UI de Gonadotropina Coriônica Humana (hCG, Vetecort® - Hertape Calier, Brasil) por via intravenosa (IV) obtendo 91% de duplas ovulações (Segabinazzi et al., 2015).

Utilização de éguas idosas em programas de TE

Diferente de outros animais domésticos, os equinos são mantidos em reprodução por um período longo de vida. Além disso, não existe uma padronização quanto à classificação das éguas idosas em faixas etárias como: jovens, intermediárias ou idosas, dificultando a comparação entre os experimentos (Bonin et al., 2010)

Carnevale et al. (1993), descreveram uma taxa de fertilização significativamente maior em éguas jovens *versus* éguas idosas no dia 1,5 pós-ovulação (88% em éguas jovens contra 45% em éguas idosas). Quando comparamos a taxa de recuperação embrionária de éguas jovens com éguas idosas, observamos uma menor taxa de recuperação (embriões recuperados/ciclo) em égua idosas, 81,5%, 46,2% respectivamente (Alvarenga e Losinno, 2006).

Segundo Fleury et al. (1998) e (Marinone et al., 2017), pode-se observar um decréscimo maior na recuperação de embriões em éguas a partir dos 15 anos de idade. Éguas senis possuem um maior intervalo interovulatório com fase luteal similar, mas com longa fase folicular comparada às éguas jovens. Esse fato é associado com atraso de 3 dias para emergência do folículo dominante e o crescimento mais lento do folículo ovulatório (Carnevale et al., 1993).

Embriões produzidos por éguas de idade avançada apresentam maior porcentagem de perda embrionária entre dois a cinco dias após a fertilização, demonstrando desenvolvimento embrionário mais lento na tuba uterina. Não são raros os casos em que os embriões chegaram a fase de mórula e migraram para o ambiente uterino em até 8 dias após a ovulação (Carnevale e Ginther, 1992).

Devido a uma maturação ovocitária mais demorada são encontradas melhores taxa de recuperação embrionária em éguas com mais de 15 anos em lavados mais tardios realizados nos dias 8,5-9,5-10 (Losinno e Urosevic 2015). Sabe-se também que éguas idosas apresentam problemas com a maturação folicular que afetam a maturação do ovócito, o que acarreta problemas na capacidade de desenvolvimento do embrião (Samper et al., 2007). Em modelos *in vivo*, foi demonstrado uma relação entre idade cronológica da égua com danos a ovócitos e embriões em estágios iniciais de desenvolvimento (Carnevale e Ginther, 1995). Essas anomalias no ovócito tanto em éguas velha quanto em éguas subfêrteis, podem causar baixas taxas de recuperação embrionária devido a sua qualidade baixa (Marinone et al., 2017)

A análise morfológica através da microscopia de luz e eletrônica de ovócitos de folículos pré-ovulatórios de éguas jovens (3-19 anos) e idosas (>19 anos), demonstrou os ovócitos de éguas idosas possuem um maior número de vesículas no núcleo e no ooplasma, em relação às éguas jovens. Essa vacuolização foi relacionada com o acúmulo de danos causados no ovócito (Carnevale, 2008).

Nos ovócitos de éguas idosas há uma expressiva redução de mitocôndrias em relação às jovens, além de uma maior prevalência de anormalidades estruturais. Os eventos de maturação e mudança na atividade



mitocondrial durante a maturação do ovócito é um elemento relacionado com a baixa qualidade do mesmo nas éguas idosas (Rambags et al., 2014).

Especula-se que em éguas velhas, a produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) durante a fosforilação oxidativa constitutiva causa maiores danos cumulativos sobre a membrana mitocondrial do ovócito. No entanto, essa lesão só se torna aparente quando a demanda de energia pelo ovócito é maior com o avanço da maturação *in vitro*. A redução no número de mitocôndrias e a qualidade de ovócitos maturados de éguas velhas podem ter um efeito negativo sobre a competência do desenvolvimento (Hendriks et al., 2012).

O que podemos fazer para aumentar a recuperação embrionária de éguas velhas e/ou subfêrteis?

Como estratégias para melhorar os índices reprodutivos, é interessante a monitoração minuciosa da fase folicular por ultrassonografia, inseminação na extremidade do corno e a utilização de meios diluidores de sêmen com antibiótico. Destaca-se ainda como ferramentas importantes para melhorar os índices reprodutivos: diminuição do número de inseminações por ciclo, a utilização de sêmen com alta taxa de fertilidade, bem como a utilização de indutores de ovulação (Alvarenga e Losinno, 2006).

A utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) e células-tronco em éguas com cervicite crônica, endometrite e com desequilíbrio de resposta inflamatória pós-cobertura, vêm crescendo como técnicas promissoras (Pavão, 2013). A utilização de PRP no útero após a inseminação artificial é capaz de reduzir a porcentagem de neutrófilos no fluido uterino modulando a resposta inflamatória (Reghini et al., 2016). Quando utilizado no momento da indução da ovulação, a taxa de prenhez de éguas subfêrteis aumentou de 20% para 80% após tratamento com PRP (Metcalf, 2014). Estudo recente demonstraram que a utilização de PRP reduziu a quantidade de células polimorfonucleadas e preveniu o acúmulo de líquido intrauterino, não alterando as quantidades de óxido nítrico após inseminação artificial em éguas com endometrite crônica (Reghini et al., 2016).

As células tronco têm sido utilizadas experimentalmente com sucesso. As células tronco mesenquimais (MSC) são injetadas no útero de éguas com alterações fibróticas do endométrio. Pavão (2013) observou uma redução de 30% de fibrose instalada no útero de éguas tratadas com células tronco. A utilização de MSC no endométrio é um procedimento seguro que leva a uma leve e transitória resposta inflamatória, não tendo ocorrência de nenhuma alteração clínica ou reprodutiva mostrando-se uma promissora ferramenta para o tratamento de fibrose endometrial (Alvarenga et al., 2016a).

Quando éguas deixam de produzir embriões e já foram descartadas outras causas de infertilidade, a obstrução de oviduto é um diagnóstico diferencial importante. Massas gelatinosas podem ocluir o lúmen do tubo uterino e impedir que os espermatozoides cheguem ao local de fertilização ou impedir que os embriões cheguem ao útero. A Prostaglandina E₂ (PGE₂) é secretada pelo embrião equino em formação promovendo a passagem do embrião para o útero. Administração tópica de PGE₂ na superfície do tubo uterino estimula o transporte precoce do embrião para o útero (Ortis et al., 2013).

A utilização de suplementos vem crescendo nos últimos anos, sendo desenvolvidos para melhorar e suprir as diferentes necessidades e carências de cada animal, principalmente com idade avançada. Em éguas senis as concentrações de FSH, LH e P4 são menores quando comparado com éguas jovens. Resende (2014), demonstraram que a suplementação com arginina aumenta as concentrações desses hormônios em éguas senis. O ômega 3 também atua melhorando o equilíbrio hormonal, além de atuar como anti-inflamatório natural em inflamações crônicas, antioxidante e imunestimulante (Lindinger et al., 2017).

Em equinos pode ser observado uma melhora de 20% para 51% as taxas de recuperação de embriões utilizando ômega 3 (Hembrooke 2008). Estudo recente com novilhas demonstraram que a utilização de ômega 3 auxilia no desencadeamento da ciclicidade em animais pré-púberes (Moreira et al., 2016). Utilizando ratos como modelo experimental evidenciou que o ômega 3 ajuda a preparar o endométrio, favorecendo um ambiente mais adequado para implantação do embrião (Sarsmaz et al., 2016).

Além dessas considerações queremos destacar a importância do cuidado no manejo de éguas velhas doadoras de embrião. Investido em climatização de ambientes, rações e água de altíssima qualidade, tudo isso para ter animais mais fortes, mais adaptados e em condições de conforto nas regiões onde são criados. São necessárias alimentações de fácil mastigação e trituração e evitar competição devido a uma grande quantidade de animais por piquete. Medidas ambientais simples deverão ser tomadas para evitar o estresse calórico como propiciar sombra nos piquetes. Se não houver disponibilidade de sombra natural, recomenda-se providenciar estruturas de sombreamento artificial (tela sombrite) para os animais (Dittrich et al., 2010).

Uso de receptoras não ciclantes

O uso da progesterona em éguas receptoras de embriões em anestro ou transicionais no início e final da estação de monta tem se tornado frequente no Brasil. Este protocolo é importante pois, as éguas doadoras



começam a ciclar mais precocemente do que as receptoras no início da estação de monta bem como deixam de ciclar mais tardiamente no final da estação. Nos últimos anos, o ingresso no mercado de novos veículos biodegradáveis de liberação lenta controlada associados a progesterona que mantêm os níveis plasmáticos por até 14 dias, com uma única aplicação injetável, permite um melhor manejo deste recurso (Greco et al., 2016).

Rocha Filho et al. (2004) e Testa et al. (2005) avaliaram dois programas de transferência de embriões no Brasil, os índices de prenhez e a perda embrionária precoce em éguas receptoras não ciclantes (anestro ou transicionais) tratadas uma vez por semana com progesterona de longa ação (P4 LA). Não foi observada diferença significativa entre o grupo não ciclante e ciclante demonstrando que este tratamento é seguro na manutenção de gestação, permitindo a obtenção de altos índices de taxa de prenhez após a transferência de embriões. Neste protocolo, as éguas em anestro são tratadas inicialmente por 3 dias consecutivos a partir do dia da ovulação da doadora com estrógeno (2,5 mg de benzoato de estradiol por dia). Sendo iniciado o tratamento com progesterona de longa duração um dia após a última aplicação de estrógeno. O tratamento com progesterona é continuado semanalmente até os 120 dias de gestação da receptora. Deve-se estabelecer o dia da progesterona no programa (exemplo: quarta feira), para que ocorra a supervisão dos tratamentos, pois a falha em uma aplicação certamente levará a perda da gestação.

Mais recentemente, Greco et al. (2016) demonstraram que a utilização de receptoras cíclicas tratadas com progesterona (1,5g P4 LA300) em diferentes fases do ciclo estral podem ser utilizadas com taxas satisfatórias de gestação. Ressalta-se que ao iniciar o protocolo com cíclicas em diestro entre o dia 5 e 14 pós ovulação a utilização de prostaglandina se faz necessária no início do protocolo para eliminar o CL presente, quebrando o ciclo normal da égua.

Manipulação adequada do sêmen e estratégias para melhorar qualidade do sêmen

Podemos apontar como sendo os principais erros cometidos com o uso de sêmen refrigerado no Brasil: não respeito às regras básicas para processamento (dose, relação diluente: Sêmen); utilização de sistemas de transporte inadequados (temperatura inadequada, não segurança contra estresse calórico ambiental); não respeito a limitações do próprio ganhão (qualidade do sêmen, resistência ao transporte, regime de coletas); momento e frequência das IA inadequados (Alvarenga e Losinno 2006; Varner 2016).

Diferentes experimentos foram realizados ao longo dos últimos 10 anos e pouco se evoluiu quanto a possibilidade de preservar a fertilidade das células espermáticas de equinos por um período de tempo superior a 24 horas de refrigeração (Neuhauser et al., 2017; Gibb Aitken 2016). Certamente alguns reprodutores apresentam sua fertilidade preservada por até 48 horas de armazenamento, pois similar ao sêmen congelado existem ganhões mais e menos resistentes ao processo de refrigeração (Alvarenga, et al., 2016b). É importante enfatizar que as inseminações devem ser realizadas em um período de tempo máximo de 24 horas antes das ovulações.

Ganhões com baixa resistência a refrigeração, a retirada do plasma seminal é sempre benéfica. Contudo para cavalos que refrigeram bem a centrifugação não traz nenhum benefício (Ramires et al., 2013).

Para a obtenção de bons índices de fertilidade, o sêmen depois de processado deve ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim. Recipientes estes que obedeçam às curvas de refrigeração já determinadas como adequadas. A temperatura de refrigeração ideal é de 5°C, contudo para determinados ganhões temperaturas próximas de 15°C preservam melhor a motilidade espermática e fertilidade (Aurich 2005).

Perante o exposto, são indicadas como estratégias para melhorar a eficiência da IA com sêmen resfriado para ganhões sensíveis ao processo de refrigeração:

- Determinar o melhor regime de coleta semanal para cada ganhão;
- Determinar o melhor diluente;
- Determinar a temperatura ideal de transporte (5 x 15°C),
- Determinar o tempo máximo para transporte;
- Utilizar sistemas de transportes que mantenham temperaturas estáveis mesmo com aumento da temperatura ambiente;
- Inseminar o mais próximo possível das ovulações;
- Remoção do plasma seminal através da centrifugação.

Referências

Alvarenga MA, Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L, Landim- Alvarenga FC. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. *J Equine Vet Sci*, v.42, p.12-18, 2016a.



- Alvarenga MA, Papa FO, Ramires Neto C.** Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Vet Clin North Am Equine Prac*, v.32, p.521-530, 2016b.
- Alvarenga MA, Carmo MT, FC Landim-Alvarenga.** Superovulation in mare: limitations and perspectives. *Pferdeheilkunde, Pferdeheik*, p.88-91, 2008.
- Alvarenga MA, Losinno L.** Fatores críticos em programas de transferência de embrião em equinos no Brasil e Argentina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.39-49, 2006.
- Aurich C.** Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.65-75, 2005.
- Bonin BF, Dell'Aqua Júnior JA, Fioratti EG, Alvarenga MA.** Efeito do tratamento com extrato de pituitária equina na resposta ovariana e eficiência reprodutiva de éguas idosas em programa de transferência de embriões. *Veterinária e Zootecnia*, v.17, p.94-103, 2010.
- Carnevale EM.** The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*, v.69, p.23-30, 2008.
- Carnevale EM, Ginther OJ.** Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol Reprod Monogr*, v.1, p.209-214, 1995.
- Carnevale EM, Bergfelt DR, Ginther OJ.** Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Anim Reprod Sci*, v.31, p.287-299, 1993.
- Carnevale EM, Ginther OJ.** Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, v.37, p.1101-1115, 1992.
- Dittrich JR, Melo HA, Afonso AMCF, Dittrich RL.** Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.130-137, 2010.
- Fleury JJ.** O dia da colheita na taxa de recuperação de embriões em equinos em uma central de transferência de embriões comercial. *Arq Fac Ve. UFRGS*, v.26, p.268, 1999.
- Gibb Z, Aitken RJ.** Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *J Equine Vet Sci*, v.43, p.S29-S36, 2016.
- Greco GM, Fioratti EG, Segabinazzi LG, Dell'Aqua Jr JA, Crespilho AM, Castro-Chaves MMB, Alvarenga MA.** Novel Long-Acting Progesterone Protocols Used to Successfully Synchronize Donor and Recipient Mares With Satisfactory Pregnancy and Pregnancy Loss Rates. *J Equine Vet Sci*, v.39, p.58-61, 2016.
- Hembrooke T.** Feeding the Mare for Fertility and Reproduction. *Informativo Técnico Platinum Performance*, 2008.
- Hendriks WK, Roelen BAJ, Stout TAE.** Effect of maternal age on the initiation of mitochondrial replication in equine embryos. *J Equine Vet Sci*, v.32, p. 398-399, 2012.
- Jacob JCF, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL.** Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. *Anim Reprod Sci*, v.121, p.305-306, 2010
- Lindinger MI, MacNicol JM, Karrow N, Pearson W.** Effects of a Novel Dietary Supplement on Indices of Muscle Injury and Articular GAG Release in Horses. *J Equine Vet Sci*, v.48, p.52-60, 2017.
- Lira RA, Peixoto GCX, AR Silva.** Transferência De Embrião Em Equinos : Revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, p.132-40, 2009.
- Losinno L, Urosevic IM.** Equine embryo transfer . Technical and practical considerations for application on horse production programs. *Proceedings...19th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction (ICBAR)*. Novi Sad, Serbia, p.23-30, 2015.
- Marinone AI, Mucci N, Kaiser G, Losinno L, Armendano J, Rodriguez EM, Mutto A, Redolatti C, Cantatore S, Herrera MF, Herrera JM, Fumuso E.** Reproductive Characteristics in Old and Young Subfertile Mares: Are They Really Different?. *J Equine Vet Sci*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.02.012>.
- Metcalfe ES.** The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). *J Equine Vet Sci*, v.34, p.128, 2014
- Moreira F, Cheuiche ZMG, Rizzoto G, Santos MQ, Schuch MS, Flach MJ, Gasperin BG, Bianchi I, Lucia T Jr.** Metabolic and reproductive parameters in prepubertal gilts after omega-3 supplementation in the diet. *Anim Reprod Sci*, v.170, p.178-183, 2016.
- Nagao JF, Neves Neto JR, Papa FO, Alvarenga MA, Freitas-Dell'Aqua CP, Dell'Aqua JA.** Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. *Anim Reprod Sci*, v.136,p.69-73, 2012.
- Neuhauser S, Säcker J, Handle J.** Effects of the Addition of Autologous Seminal Plasma to Highly Concentrated Stallion Semen After 48 Hours of Cooled Storage. *J Equine Vet Sci*, v.49, p.25-30, 2017.
- Ortis HA, Foss RR, McCue PM, Bradecamp EA, Ferris RA, Hendrickson DA.** Application of PGE2 to the Uterine Tube Surface Enhances Fertility in Selected Subfertile Mares. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.896-900, 2013.
- Pavão GDA.** Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa. 2013.66f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, 2013.
- Rambags BP, van Boxtel DC, Tharasanit T, Lenstra JA, Colenbrander B, Stout TA.** Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. *Theriogenology*,



v.81, p.959-965, 2014.

Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua Jr.JA, Papa FO, Alvarenga MA. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.40-43, 2013

Reghini MF, Ramires Neto C, Segabinazzi LG, Castro Chaves MM, Dell'Aqua CP, Bussiere MC, Dell'Aqua JA Jr, Papa FO, Alvarenga MA. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*, v.86, p.516-522. 2016.

Resende HL. Comparação da perfusão vascular folicular , luteal , uterina e perfil hormonal plasmático entre éguas jovens e idosas suplementadas ou não com L-arginina comparação da perfusão vascular folicular , entre éguas. Dissertação (Mestrado). 118f. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2014.

Rocha Filho AN, Pessôa MA, Gioso MM, Alvarenga MA. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Anim Reprod*, v.1, p.91-95, 2004.

Samper JC. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, v.70, p.445-447, 2008.

Samper JC, Pycock JF, McKinnon AO. Current therapy in equine reproduction. Sant Louis: Saunders Elsevier, p.319-334, 2007.

Sarsmaz K, Goker A, Micili SC, Ergur BU, Kuscuk NK. Immunohistochemical and ultrastructural analysis of the effect of omega-3 on embryonic implantation in an experimental mouse model. *Taiwan J Obstet Gynecol*, v.55, p.351-356, 2016.

Segabinazzi LG, Steigleder LF, Kaipper R, Rodrigues TS, Aragão O, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de acetato de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, v.11, p.1488-1494, 2015.

Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v.59, p.151-170, 2003.

Squires EL, Hon ACT. Changes in Equine Reproduction: Have They Been Good or Bad for the Horse Industry?. *J Equine Vet Sci*, v.29, p.268-273, 2009.

Testa AC, Carmo MT, Alvarenga MA. Early embryonic death in anovulatory recipients mares supplemented with long acting progesterone. *Acta Sci Vet*, v.33, p.335, 2005.

Varner DD. Strategies for Processing Semen from Subfertile Stallions for Cooled Transport. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.32, p.547-560, 2016.
