

Fertilidade de éguas inseminadas no corpo ou no ápice do corno uterino com diferentes concentrações espermáticas

[Fertility of mares inseminated in the uterine corpus or tip with different sperm concentrations]

I.L.G.S. Xavier¹, J.M. Silva Filho^{2*}, M.S. Palhares², G.R. Carvalho³, A.M. Borges², R. Rossi⁴

¹Médico veterinário autônomo

²Escola de Veterinária - UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 – Belo Horizonte, MG

³Departamento de Zootecnia - UFV – Viçosa, MG

⁴Aluna de pós-graduação - EV-UFMG – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Foram utilizados 72 ciclos estrais de 37 éguas mestiças, com idade variando de quatro a 20 anos, distribuídas ao acaso em dois grupos experimentais (G_I e G_{II}) para estudar o efeito do local de deposição do sêmen no sistema genital sobre a fertilidade. As inseminações no ápice do corno uterino (G_{II}) foram realizadas por via intravaginal profunda, utilizando-se a pipeta de inseminação IVI pipette (75cm), contendo 1/5 (3mL) da dose inseminante utilizada para o corpo do útero (15mL- G_I). As éguas foram rufiadas diariamente e inseminadas às segundas, quartas e sextas-feiras, a partir de um folículo de 3,0 a 3,5cm de diâmetro, com sêmen fresco diluído em diluidor de leite desnatado-glicose. Apenas um garanhão de 20 anos e de fertilidade conhecida foi utilizado. As taxas de concepção/ciclo para as inseminações realizadas no corpo (42,9%-15/35) e ápice do corno uterino (45,9%-17/37) com concentrações médias de 489 e 102 milhões de espermatozoides móveis, respectivamente, não foram diferentes ($P>0,05$).

Palavras-chave: égua, fertilidade, sêmen fresco, inseminação artificial

ABSTRACT

Seventy-two estral cycles of 37 mares, aging from four to 20-year-old, were randomly distributed in two experimental groups (G_I and G_{II}). The aim of the study was to evaluate the effect of the semen deposition placed in the female genital system on the fertility. The inseminations in uterine horn tip (G_{II}) were carried out by deep intravaginal way, using the pipette of insemination IVI pipette (75cm), containing 1/5 (3mL) of the inseminant dose of that utilized in uterine body or horn (15mL- G_I). The mares were daily teased and inseminated on Mondays, Wednesdays, and Fridays, starting from a follicle from 3.0 to 3.5cm diameter, with fresh semen diluted in skim milk glucose extender. Only one 20 year-old stallion with well-known fertility was utilized. The conception rates/cycles for inseminations carried out in the uterine body (42,9%-15/35) and in the uterine horn tip (45,9%-17/37) utilizing average concentrations of 489 and 102 million of mobile spermatozoa, respectively, did not present difference ($P>0.05$).

Keywords: mare, fertility, fresh semen, artificial insemination

INTRODUÇÃO

Várias linhas de pesquisa em equinos têm gerado tecnologias capazes de reduzir o volume e a

concentração da dose inseminante, por meio de mudanças do local de deposição do sêmen, permitindo a deposição dos espermatozoides próximos ao local da fecundação. Dessa forma, muitas técnicas e protocolos já foram descritos, incluindo a inseminação uterina profunda com

Recebido em 14 de junho de 2008

Aceito em 15 de dezembro de 2008

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: monteiro@vet.ufmg.br

Apoio: FAPEMIG

pipeta flexível guiada por via transretal ou ultrassom (Buchanan et al., 2000), a inseminação intratubárica (Carnevale et al., 2001) e a inseminação histeroscópica com deposição do sêmen na papila uterina (Lindsey et al., 2002).

O emprego dessas técnicas de alto custo – o que dificulta a sua aplicabilidade – tem resultado em taxas de prenhez bastante variáveis. A deposição do sêmen no ápice do corno com a não exposição natural às secreções do lúmen uterino em tempo adequado, possivelmente, rompa algumas barreiras fisiológicas que poderiam contribuir para as taxas de prenhez ainda comercialmente inviáveis. Espera-se que a evolução dessas tecnologias seja benéfica para a eficiência do sêmen congelado e resulte em aumento potencial na fertilidade de garanhões idosos ou com subfertilidade adquirida e para a exploração do sêmen sexado (Morris e Allen, 2002). Mesmo assim, as grandes variações existentes entre animais e ejaculados dentro de um mesmo indivíduo constituem sério obstáculo para o avanço das técnicas de inseminação na espécie equina.

Alguns garanhões, após o auge do desempenho esportivo, chegam à senilidade com menor produção espermática diária, embora ainda haja grande demanda por doses de seu sêmen destinadas a programas reprodutivos. A criopreservação do sêmen fora da estação de monta poderia proporcionar doses inseminantes adicionais para uso durante o auge da estação de monta, quando maior quantidade de doses são solicitadas. Lamentavelmente, nem todos os garanhões produzem sêmen com boa congelabilidade, tornando a criopreservação inviável. Assim, a inseminação com baixa concentração espermática no ápice do corno uterino poderia solucionar, parcialmente, tal problema, por maximizar o número de doses produzidas por ejaculado (Weems e Byers, 2004).

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do local de deposição do sêmen sobre a fertilidade de éguas, utilizando diferentes concentrações e volumes inseminantes, de forma a potencializar o número de doses produzidas por ejaculado de um garanhão de 20 anos de idade, com sêmen de baixa qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 72 ciclos estrais de 37 éguas mestiças, com idades de quatro a 20 anos, pertencentes a diferentes ordens de parto e duas categorias reprodutivas (éguas solteiras e potras). As éguas de faixa etária semelhante foram agrupadas e, em seguida, distribuídas ao acaso, por meio de sorteio, em dois grupos experimentais (I e II). As faixas etárias dos grupos I e II foram de $11,09 \pm 5,07$ e de $11,62 \pm 4,76$ anos, respectivamente, utilizando-se 35 e 37 ciclos, na mesma ordem de citação anterior. O tratamento I constituiu-se da inseminação convencional no corpo do útero com volume de 15mL de sêmen; no tratamento II, o sêmen foi depositado no ápice do corno uterino, com volume de 3mL, ipsilateral ao folículo dominante, por meio de pipeta flexível guiada via retal, correspondendo, dessa forma, a 1/5 da dose inseminante do tratamento I. Todas as éguas foram inseminadas em dias fixos, às segundas, quartas e sextas-feiras, de acordo com o manejo reprodutivo proposto por Silva Filho et al. (1993), utilizando sêmen fresco diluído em diluidor de leite desnatado-glicose, de apenas um garanhão.

De acordo com o proposto por Valle (1997), algumas características foram classificadas em: parâmetros de controle e parâmetros envolvendo resultados. Os parâmetros de controle referem-se aos que prestam informações sobre a homogeneidade dos tratamentos, sendo eles: número de ciclos, idade, número de ciclos/égua, número de IA/ciclo, volume de sêmen, volume de diluidor e tempo da colheita/IA. Os parâmetros de resultados, como o próprio nome os define, são os que prestam informações sobre os resultados reprodutivos obtidos a partir dos tratamentos efetuados, sendo eles: número de IA/ciclo positivo, número de IA/ciclo negativo, concentração espermática, número de ciclos/concepção, número de ciclos/égua gestante, taxa de concepção/ciclo, taxa de concepção total e eficiência de prenhez.

Visando obter maior eficiência na detecção de diferenças entre os grupos experimentais, análises de variância foram utilizadas para avaliar os resultados de fertilidade. Por se tratar de uma variável qualitativa, realizou-se a conversão dos dados em quantitativos, segundo

proposta de Voss et al. (1975). Por esse método, atribuíram-se pontos a cada ciclo inseminado, da seguinte forma: dez pontos para a concepção no primeiro ciclo; oito para concepção no segundo ciclo; seis para o terceiro ciclo; quatro para o quarto ciclo e zero para os ciclos em que não houve concepção. Dessa forma, obteve-se um valor numérico médio para cada grupo experimental, denominado de eficiência de prenhez.

As seguintes características foram avaliadas quanto ao efeito do local de deposição do sêmen sobre a fertilidade de éguas: taxa de concepção ao primeiro ciclo, taxa de concepção/ciclo após cinco ciclos, taxa de concepção total, eficiência de prenhez, número de ciclos/concepção, número de ciclos/égua gestante, número de IA/ciclo, número de IA/ ciclo positivo e número de IA/ciclo negativo.

Como doador de sêmen, utilizou-se um garanhão da raça Brasileiro de Hipismo com 20 anos de idade e de alto valor genético. Antes do início da estação de monta, o animal foi submetido a exame andrológico, sendo feitas inspeção e palpação da genitália externa, bem como avaliação do comportamento sexual e das características físicas do sêmen.

Após o esgotamento das reservas espermáticas extragonádicas como recomendado por Pickett et al. (1987), foram realizadas várias colheitas de sêmen, devidamente submetidas a avaliações físicas e morfológicas. Apesar das colheitas sequenciadas, observou-se a manutenção de grande número de células mortas no ejaculado, além de rápida queda no vigor e na motilidade espermática (aproximadamente 15 minutos) tanto do sêmen fresco como do diluído (1:1), ao serem conservados à temperatura de 37 °C, em banho-maria. Observou-se também grande sensibilidade das células espermáticas ao resfriamento a 5°C, por seis a 12 horas, após diluição no diluidor de mínima contaminação, em *container* proposto por Palhares (1997). Há de se enfatizar uma grande diferença entre os ejaculados, notadamente quando os intervalos de colheitas ultrapassavam 48 horas. A redução dos intervalos (≤ 48 horas) respondeu por melhor resistência espermática no sêmen diluído e mantido a 37°C, em banho-maria.

Verificou-se produção de células móveis suficientes para inseminar, no máximo, oito éguas por ejaculado, dentro do preconizado pela literatura como dose inseminante ideal (400×10^6 espermatozoides móveis por dose inseminante), para inseminações no corpo do útero (Pickett et al., 1987), e observou-se queda sensível da qualidade espermática quando se aumentou o intervalo entre ejaculados. Com esta avaliação, foram propostas colheitas em dias alternados durante a semana (segundas, quartas e sextas-feiras), de acordo com as sugestões de Palhares (1997), Valle (1997), Brandão (2001) e Brandão (2003), além de uma colheita no sábado pela manhã, para manter a qualidade espermática durante a estação de monta. Estabeleceu-se, nesse momento, a dose a ser utilizada no ápice do corno uterino e admitiu-se que essa dose fosse suficiente para promover a concepção em função do quadro espermático apresentado pelo garanhão. Segundo Pace e Sullivan (1975), Demick et al. (1976), Voss et al. (1979) e Pickett et al. (1987), para inseminações no corpo do útero, o desafio seria em torno de 100×10^6 espermatozoides móveis por dose inseminante. Assim, decidiu-se que a concentração para o ápice do corno seria de 1/5 da utilizada no corpo do útero, e, então, estabeleceu-se que, após cada ejaculação, o sêmen seria diluído para um total de 120mL (diluidor mais sêmen) de forma a compor oito doses de 15mL. A dose inseminante no ápice do corno uterino, por representar 1/5 da dose utilizada no corpo do útero, foi fixada em um volume de 3mL.

Pretendeu-se, também, com a redução da dose inseminante para 1/5 da convencional, maximizar o número de doses produzidas por ejaculado, adequando-se as condições do experimento às características seminais de um garanhão senil de alto valor genético, na expectativa de uma boa eficiência reprodutiva.

Durante a estação de monta, o controle folicular diário obedeceu ao sistema métrico proposto por Greenhof e Kenney (1975), e o manejo reprodutivo baseou-se no descrito por Palhares (1987), com adaptações para atender aos objetivos do trabalho. Dessa forma, as éguas foram rufiadas individualmente e palpadas a cada três dias, até o início do cio e/ou da presença de um folículo de 2,0-2,5cm de diâmetro, em um dos ovários; a partir daí, as palpações retais e rufiações tornaram-se diárias até a ovulação.

Quando detectada a presença de folículo dominante com diâmetro de 3,0–3,5cm, as inseminações artificiais ocorreram às segundas, quartas e sextas-feiras, até a ovulação.

As inseminações no corpo do útero (T_1) e no ápice do corno uterino (T_2) foram realizadas por via intravaginal profunda utilizando-se a pipeta de inseminação (modelo Provar¹) e a IVI pipette² (75cm), respectivamente, esta última conduzida com o auxílio da palpação transretal.

Os dados proporcionais, número de ciclos/concepção, taxa de concepção/ciclo e taxa de concepção total, foram submetidos ao teste de qui-quadrado para detecção de diferenças entre os tratamentos (Snedecor e Cochran, 1980).

Para comparação das médias da idade da égua, número de IA/ciclo, número de IA/ciclo positivo, número de IA/ciclo negativo, eficiência de prenhez, volume de sêmen, volume de diluidor, concentração espermática e tempo de colheita/IA, usou-se o teste Student-Newman-Keuls (SNK) ou o teste t quando se compararam apenas duas médias. Para o processamento das análises, utilizou-se o programa SÁS/1990.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações espermáticas médias trabalhadas foram de $489,68 \times 10^6$ e $102,88 \times 10^6$ espermatozoides móveis no corpo e ápice do corno uterino, respectivamente. As taxas de concepção/ciclo e concepção total não sofreram influência ($P > 0,05$) do local de deposição do sêmen (Tab. 1 e 2).

O local de deposição do sêmen não exerceu efeito ($P > 0,05$) sobre a fertilidade das éguas, resultando em taxa de concepção/ciclo de 45,9% (17/37) e 42,9% (15/35) para inseminações realizadas no ápice do corno uterino e corpo do útero, respectivamente. As taxas de concepção totais obtidas foram de 85,0% (17/20) e 83,3% (15/18), na mesma ordem anterior ($P > 0,05$).

Resultados semelhantes, quanto às taxas de concepção/ciclo, foram observados por Weems e Byers (2004) – 44%, 48/117 –, ao utilizarem inseminações histeroscópicas com sêmen fresco e concentrações que variaram de 87 a 271×10^6 espermatozoides móveis. Quando concentrações menores que 150×10^6 , entre 150 e 250×10^6 , e

maiores que 250×10^6 espermatozoides móveis foram utilizadas, as taxas de concepção/ciclo foram de 50% (27/54), 41% (48/117) e 50% (2/4), respectivamente, e não diferiram ($P > 0,05$) da taxa de concepção encontrada para inseminações no corpo do útero (33% - 59/158) com dose inseminante de 500×10^6 espermatozoides móveis. Assim, esses autores concluíram que o local de deposição do sêmen não influenciou a fertilidade das éguas.

Buchanan et al. (2000) observaram diferenças nas taxas de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco no ápice do corno uterino com pipeta flexível ($P < 0,05$), em relação às inseminadas no corpo do útero. A taxa de fertilidade para as primeiras foi de 57% (12/21), com dose de 25×10^6 espermatozoides, enquanto as inseminações com 500×10^6 espermatozoides móveis no corpo do útero resultaram em 90% de fertilidade (18/20). Também Lindsey et al. (2002) e Sieme et al. (2004) afirmaram que, se a dose inseminante tiver entre 50 e 100×10^6 espermatozoides móveis, é improvável que as técnicas de inseminação que utilizam baixas doses inseminantes resultem em taxas de concepção maiores que as obtidas com inseminações no corpo do útero. No presente estudo, as doses inseminantes no ápice do corno uterino foram de $102,88 \times 10^6$ espermatozoides móveis, com variação de $57,48 \times 10^6$ a $146,52 \times 10^6$ espermatozoides móveis, o que, de certa forma, justifica a significância dos resultados ($P > 0,05$) entre as duas técnicas de inseminação estudadas (Tab. 2).

Morris et al. (2000) e Rigby et al. (2000), ao utilizarem sêmen a fresco com doses de 5×10^6 espermatozoides móveis e inseminação por histeroscopia, obtiveram taxas de concepção/ciclo de 75% (7/10) e 62% (13/21), respectivamente. Apesar da extrema redução das concentrações usadas por esses pesquisadores, as taxas de concepção foram maiores que as obtidas neste estudo (45,9% - 17/37). Lyle e Ferrer (2005) consideraram que, se doses inseminantes menores que 5×10^6 espermatozoides forem utilizadas, melhores resultados serão obtidos com inseminação por histeroscopia, se comparados aos resultados de inseminação que utilizam pipeta com deposição do sêmen no ápice do corno uterino. Tal afirmativa não foi confirmada por Brinsko et al. (2003), ao comparar inseminações histeroscópicas com as que utilizaram pipetas e doses inseminantes de 5×10^6 espermatozoides móveis. Observaram fertilidade de 67% (12/18) e 56% (10/18), respectivamente, que não diferiram entre si ($P > 0,05$).

¹Pipeta para inseminação artificial de éguas- Provar®

²IVI Pipette- Minitub®

Tabela 1. Taxa de concepção de éguas mestiças, inseminadas com sêmen fresco diluído, segundo o local de deposição e o ciclo reprodutivo

Ciclo	Corpo do útero ¹		Ápice do corno ¹		Total	
	Nº de ciclos	Taxa de concepção (%)	Nº de ciclos	Taxa de concepção (%)	Nº de ciclos	Taxa de concepção(%)
1	18 (9)	50,00	20 (10)	50,00	38 (19)	50,00
2	08 (3)	37,50	10 (4)	40,00	18 (7)	38,89
3	06 (2)	33,33	05 (3)	60,00	11 (5)	45,45
4	03 (1)	33,33	02 (0)	0,00	05 (1)	20,00
5	01 (0)	0,00	01 (1)	100,00	02 (1)	50,00
Total	35 (15)	42,86	37 (17)	45,95	72 (32)	44,44

Números entre parênteses referem-se às éguas que ficaram gestantes a cada ciclo.

¹Concentração espermática no corpo e ápice do corno: 489,68x10⁶ SPTZ e 102,88x10⁶ SPTZ, respectivamente; volume de sêmen no corpo e ápice do corno: 15mL e 3mL, respectivamente.

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos de éguas mestiças, inseminadas com sêmen fresco diluído, segundo o local de deposição

Parâmetro reprodutivo	Corpo do útero ¹		Ápice do corno ¹		Total	
	n	Média± desvio-padrão	n	Média± desvio-padrão	N	Média± desvio-padrão
Nº de IA/ciclo positivo	15	2,80±1,47	17	2,47±1,01	32	2,63±1,24
Nº de IA/ciclo negativo	20	2,20±1,01	20	2,05 ±1,19	40	2,13±1,09
Nº de ciclos/concepção	35/15	2,33	37/17	2,18	72/32	2,25
Nº de ciclos/égua gestante	15	1,67±0,98	17	1,71±1,11	32	1,69±1,03
Taxa de concepção total	-	83,33% (15/18)	-	85,00% (17/20)	-	84,21% (32/38)
Eficiência de prenhez	35	3,71±4,53	37	3,95±4,58	72	3,83±4,53

Valores seguidos por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste t (P<0,05).

¹Concentração espermática no corpo e ápice do corno: 489,68x10⁶ SPTZ e 102,88x10⁶ SPTZ, respectivamente; volume de sêmen no corpo e ápice do corno: 15mL e 3mL, respectivamente

Os parâmetros de controle experimental indicaram homogeneidade entre os tratamentos (P>0,05), para idade das éguas, número de IA/ciclo, intervalo IA/ovulação e intervalo coleta/IA. As diferenças (P<0,05) encontradas entre concentração espermática, volume de

sêmen e diluidor já eram esperadas, em virtude de as diluições terem sido padronizadas com a metodologia adotada. Assim, resultaram, em volume de dose inseminante no ápice do corno uterino, cinco vezes menor (3mL) que a do corpo do útero (15mL) (Tab. 3).

Tabela 3. Parâmetros de controle de éguas mestiças, inseminadas com sêmen fresco diluído, segundo o local de deposição

Parâmetro de controle	Corpo do útero ¹		Ápice do corno ¹		Total	
	n	Média± desvio-padrão	N	Média± desvio-padrão	N	Média± desvio-padrão
Idade	35	11,09±5,07	37	11,62±4,76	72	11,36±4,89
Nº de IA/ciclo	35	2,46±1,25	37	2,24±1,12	72	2,35±1,18
Volume do sêmen (mL)	86	3,40±0,95 ^a	83	0,70±0,25 ^b	169	2,08±1,52
Volume do diluidor(mL)	86	11,60±0,95 ^a	83	2,30±0,25 ^b	169	7,03±4,72
Intervalo colheita /IA (seg)	82	27,52±14,35	78	23,60±11,93	160	25,61±13,33

Valores seguidos por letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste t (P<0,05).

¹Concentração espermática no corpo e ápice do corno: 489,68x10⁶ SPTZ e 102,88x10⁶ SPTZ, respectivamente; volume de sêmen no corpo e ápice do corno: 15mL e 3mL, respectivamente

Segundo Weems e Byers (2004), as baixas doses inseminantes utilizadas por meio da histeroscopia não aumentaram as taxas de fertilidade, embora maximizassem o número de doses produzidas/ejaculado por um garanhão de 24 anos. O mesmo foi observado no presente estudo, quando se trabalhou com garanhão de 20 anos. Dessa forma, pode-se indicar a inseminação no ápice do corno uterino com pipeta flexível na tentativa de reduzir custos e aumentar a aplicabilidade do uso de baixas doses inseminantes. Ainda, garanhões com baixa produção espermática diária, cujas células espermáticas não resistem aos processos de criopreservação, podem se beneficiar com a maximização das doses inseminantes, sem que haja desgaste adicional. Finalmente, observa-se que baixas concentrações espermáticas, quando utilizadas adequadamente (ápice do corno), proporcionam taxas de fertilidade semelhantes às obtidas pelos métodos convencionais de inseminação.

Torna-se importante salientar que, para cada garanhão, dever-se-ia determinar a dose inseminante mínima, comercialmente viável, em virtude da individualidade inerente a cada garanhão e à viabilidade espermática no sistema genital feminino (Katila, 2005).

CONCLUSÕES

O local de deposição do sêmen não exerceu efeito sobre a fertilidade, e a concentração média de 100×10^6 espermatozoides móveis por dose inseminante pode ser utilizada nas inseminações com sêmen fresco diluído no ápice do corno uterino sem que haja redução da taxa de fertilidade, maximizando, assim, o número de éguas inseminadas por ejaculado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO, F.Z. Efeito da concentração espermática e do intervalo entre as duas últimas inseminações sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído. 2001. 94f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BRANDÃO, F.Z.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. et al. Efeito da concentração espermática e do número de inseminações artificiais sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.61-67, 2003.

BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; LINDSEY, A.L. et al. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transretally-guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology*, v.59, p.1001-1009, 2003.

BUCHANAN, B.R.; SEIDEL Jr., G.E.; McCUE, P.M. et al. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1333-1344, 2000.

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

DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKET, B.W. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoa numbers on equine fertility. *J. Anim. Sci.*, v.43, p.633-637, 1976.

GREENHOFF, G.H.; KENNEY, R.M. Evaluation of reproductive status of nonpregnant mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.167, p.449-458, 1975.

LINDSEY, A.C.; SCHENK, J.L.; GRAHAN, J.K. et al. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, v.34, p.121-127, 2002.

LYLE, S.K.; FERRER, M.S. Low-dose insemination - Why, when and how. *Theriogenology*, v.64, p.572-579, 2005.

MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. An overview of low dose insemination in the mare. *Reprod. Domest. Anim.*, v.37, p.206-210, 2002.

MORRIS, L.H.A.; HUNTER, R.H.F.; ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.118, suppl., p.95-100, 2000.

PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J. Reprod. Fertil.*, v.23, suppl., p.115-121, 1975.

PALHARES, M.S. Influência de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado: I - Características termodinâmicas e funcionais, II - Desempenho reprodutivo de éguas inseminadas. 1997. 245f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PALHARES, M.S. Fertilidade e controle. *Cavalo Marchador*, v.1, p.9-10, 1987.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. *Procedures of collections, evaluation and utilization of*

stallion semen for artificial insemination. Fort Collins: Colorado University, 1987. 125p.

RIGBY, S.; DERCZO, S.; BRINSKO, S. et al. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.46, p.332-334, 2000.

SIEME, H.; BONK, A.; HAMANN, H. et al. Effect of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, v.62, p.915-928, 2004.

SILVA FILHO, J.M.; SATURNINO, H.M.; PALHARES, M.S. et al. Efeito do intervalo entre as duas últimas inseminações e da concentração espermática sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen a fresco diluído. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., 1993, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1993. p.264.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. Statistical methods. Ames: Iowa Universty, 1980. 505p.

VALLE, G.R. Efeito da rufiação e manipulação do sistema genital e transporte de sêmen, em container “celle” modificado, na avaliação da técnica de inseminação artificial de equinos. 1997. 349f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VOSS, J.L.; WALLACE, R.A.; SQUIRES, E.L. et al. Effects of synchronization and frequency of insemination on fertility. *J. Reprod. Fertil.*, v.27, suppl., p.257-261, 1979.

VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; BACK, D.G. et al. Effect of rectal palpation on pregnancy rate of nonlactating, normally cycling mares. *J. Anim. Sci.*, v.41, p.829-834, 1975.

WEEMS, J.C.; BYERS, W. How to incorporate low-dose hysteroscopic insemination in an on-farm fresh semen program. In: CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. 50., 2004, Lexington. *Anais eletrônicos...* Lexington. Disponível em: <<http://www.avis.org/proccedings/AAEP/2004/weems/chapter.asp?LA=1>>. Acessado em: 30 ago. 2005.