PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Fatores que influenciam na fertilidade do sêmen equino congelado

Rodrigo Arruda de Oliveira¹

¹Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Departamento de Reprodução Animal, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Instituto Central de Ciências, Ala Sul, Asa Norte, CEP 70910-900, Brasília/DF, Brasil. E-mail: rodrigoarruda@unb.br

Resumo

Na equinocultura mundial é cada vez maior a utilização do sêmen congelado, devido a recente liberação do seu uso por grande parte das associações de criadores. Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa, e isto dificulta a sua utilização em larga escala. A inseminação artificial com sêmen congelado é um procedimento prático e de fácil realização, desde que se tenha conhecimento técnico para tal procedimento. É mais prático do que o deslocamento da égua até o local que encontra o garanhão e nem está sujeita ao atraso e/ou extravio da dose de sêmen refrigerada que foi enviada por meio terrestre ou aéreo. Objetivou-se com essa revisão abordar os principais pontos relacionados ao manejo e sucesso da inseminação artificial com sêmen equino criopreservados.

Palavras-chave: Criopreservação; égua; espermatozoide; garanhão; inseminação artificial

Factors that influence on equine's frozen semen fertility

Abstract

In World's equine breed the use of frozen semen is increasing, due to the recent release of its use by most breeders associations. However, the fertility of frozen semen is still low, and this hampers their widespread use. Artificial insemination with frozen semen is a practical procedure and easy to implement, since the person has technical knowledge to do this procedure. It is more practical than the displacement of the mare to the location that the stallion is and it is not subject to delay and/or loss of the dose of chilled semen sent by land or air. The objective of this review was to approach the main points related to the management and success of artificial insemination with equine frozen semen.

Keywords: Artificial insemination; cryopreservation; mare; spermatozoa; stallion

Introdução

Várias biotécnicas como a inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização *in vitro* tem sido aplicadas em programas de reprodução assistida de várias espécies, visando à obtenção de melhores índices de fertilidade de indivíduos portadores de subfertilidade de origem não hereditária e também maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial genético.

A crescente aplicação do sêmen congelado nos criatórios de equino é notório, fato este que tem impulsionado as pesquisas voltadas a solucionar os problemas relativos ao uso do sêmen congelado. O principal fator limitante à utilização rotineira de sêmen congelado em equinos está relacionado à própria espécie, onde uma grande porcentagem dos garanhões apresentam características de sêmen pós-descongelamento (motilidade, integridade celular) inadequadas para uso.

Outra observação relevante é o fato de que, mesmo apresentando sêmen com motilidade pós-descongelamento dentro dos padrões adequados, muitas vezes os resultados de fertilidade são baixos. Por outro lado, em algumas situações, sêmen com motilidade intermediária apresenta bons índices de prenhez. Certamente doses de sêmen com características seminais abaixo do razoável, ou seja, motilidade progressiva inferior a 30% e um alto percentual de células lesadas, apresentam índices de fertilidade frustrantes. Tem sido observada uma variação de 10 a 70% nos índices de fertilidade por ciclo, para sêmen congelado de diferentes garanhões.

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado é um procedimento prático e de fácil realização, desde que se tenha conhecimento técnico para tal procedimento. É mais prático do que o deslocamento da égua até o local que encontra o garanhão e nem está sujeita ao atraso e/ou extravio da dose de sêmen refrigerada que foi enviada por meio terrestre ou aéreo.

A égua fica alojada na propriedade ou central e pode ser examinada regularmente e no momento apropriado, após acompanhamento da dinâmica folicular por meio de ultrassonografia transretal e palpação retal, a ovulação é induzida com fármacos e o sêmen é depositado no ápice do corno uterino, *ipsilateralis* ao folículo dominante, o mais próximo possível da ovulação.

Objetivou-se com essa revisão abordar os principais pontos relacionados ao manejo e sucesso da inseminação artificial com sêmen equino criopreservados.

Principais fatores

Em um programa de IA com sêmen congelado alguns fatores apresentam importância:

Momento da inseminação

Para maximizar a fertilidade, a maioria das fêmeas mamíferas estabelece um reservatório espermático no istmo, logo após cobertura. THOMAS et al.

(1994) demonstraram que as células espermáticas ligadas ao epitélio do oviduto são altamente móveis, com motilidade e longevidade prolongada e melhor morfologia que as não ligadas. Os espermatozoides (sptz) permanecem ligados até ocorrer a capacitação, sendo liberadas sub-populações de espermatozoides em intervalos regulares de tempo. Sabe-se que existem diferenças entre garanhões na habilidade dos sptz formarem reservatórios no istmo da égua, com garanhões subférteis mostrando menor capacidade que os férteis (ELLINGTON et al., 1999), devido a isso, a necessidade de se inseminar o mais próximo possível do momento da ovulação com o objetivo de aumentar os índices de fertilidade da maior parte dos garanhões (MILLER, 2008).

O fato de éguas engravidarem após uma única cobertura por monta natural, mesmo que a ovulação tenha ocorrido 6 dias pós-cobertura leva a hipótese que o ejaculado do garanhão não é homogêneo. Há uma população maior formada por sub-populações menores que são liberadas do oviduto em vários momentos, disponibilizando sptz para fertilizar o ócito recém-ovulado a qualquer momento. Entretanto essas sub-populações diminuem em número após a colonização inicial do oviduto pelos sptz selecionados (SAMPER, 2001).

Os espermatozoides, danificados durante o processo de congelamento/descongelamento, reduzem a habilidade de se ligar às células do oviduto, portanto fazem apenas um pequeno reservatório no trato reprodutivo da égua (DOBRINSKI et al., 1995). A criopreservação ainda inclui alterações nas membranas, osmolaridade e nos níveis de cálcio intra e extracelular no espermatozoide. O influxo de cálcio é um pré-requisito necessário para que ocorra a reação acrossomal. No sêmen fresco a ligação com as células do oviduto retarda esse influxo. Entretanto quando o espermatozoide do garanhão é congelado/descongelado o nível de cálcio intracelular é maior que naqueles que não foram congelados (DOBRINSKI et al., 1997).

As alterações físicas da membrana durante o congelamento e o aumento nos níveis intracelulares de cálcio talvez sejam os responsáveis pela redução na heterogenicidade da população espermática submetida ao congelamento.

As mudanças resultantes do processo de congelamento/descongelamento parecem ter um impacto significativo no número de sptz capazes de se ligarem ao epitélio do oviduto, reduzindo a longevidade no trato reprodutivo feminino e provavelmente atrasando o momento de chegada ao oviduto (SAMPER, 2001).

Essa redução no número de sptz ligados ao oviduto e curta longevidade poderia explicar porque a maior parte dos laboratórios de congelamento de sêmen recomenda a inseminação o mais próximo possível do momento da ovulação para aumentar a fertilidade (SAMPER & MORRIS, 1998).

Agentes indutores da ovulação devem ser utilizados quando se insemina com sêmen congelado, na tentativa de maximizar a utilização do sêmen diminuindo o número de doses/ciclo, que resulta na redução do intervalo entre a inseminação e a ovulação. Alguns dos hormônios utilizados para indução da ovulação são a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e a deslorelina, análogo do GnRH (SAMPER, 2001).

Rotineiramente, 1000 a 2500 UI de hCG são administradas de forma intravenosa quando a égua manifesta cio e apresenta folículo entre 30-35mm de diâmetro (folículo dominante) com ovulação ocorrendo em média 36-48h (BARBACINI et al., 2000), com intervalo entre 12-72h. Devido a esse extenso intervalo, as éguas são examinadas por palpação retal e ultrassonografia transretal a cada 6-8h após a indução, realizando a inseminações o mais próximo possível da ovulação (SAMPER, 2001). De acordo com BARBACINI et al (2000) 91% das 559 éguas utilizadas, ovularam até 48h após a utilização de 2000UI de hCG, sendo que 75% ovularam entre 25 e 48h.

Dose inseminante

Não existe um padrão para dose inseminante quando se utiliza sêmen congelado. A motilidade progressiva pós-descongelamento varia significativamente entre garanhões, e frequentemente, entre ejaculados. Cada laboratório geralmente tem um método de congelamento, como um número de sptz/palheta, como também o número de palhetas/dose inseminante. Com o intuito de uniformizar esses dados a Federação Mundial de criadores de cavalos

de esporte estabeleceu um padrão mínimo para sêmen congelado que deve ser distribuída entre os países membros, sendo que a dose inseminante deve conter uma concentração mínima de 250×10^6 de sptz com movimento progressivo (smp), com motilidade progressiva pós-descongelamento $\geq 35\%$ (MILLER, 2008).

O efeito da concentração espermática na fertilidade do sêmen equino congelado foi avaliado por LEIPOLD et al. (1998), ao inseminarem 63 éguas com doses de 320×10^6 e 800×10^6 de smp no percentual de prenhez e chegaram a conclusão que o aumento de espermatozóides na dose não aumentava o índice de gestação.

Em um levantamento realizado por SAMPER & MORRIS (1998) com um questionário respondido por 10 países, entre eles o Brasil, com 12 questões, uma delas se referia a qual concentração espermática utilizada por dose. Seis pesquisadores relataram a dose de 250, 1 com 300 e 1 com 400×10^6 smp.

Com o objetivo de estabelecer o número ideal de espermatozoides com movimento progressivo pós-descongelamento para inseminação METCALF (2005) utilizou 312 ciclos de 90 éguas e um total de 46 garanhões. As éguas foram divididas em grupos, sendo inseminadas com <200 , 200-400, 400-600, 600-800 e $>800 \times 10^6$ smp, com índice de prenhez/estação de 54, 70, 60, 88 e 56%, respectivamente. Apenas a concentração 600-800 apresentou diferença ($P < 0,02$). Segundo a autora, o declínio na concepção quando as éguas foram inseminadas com doses >800 milhões de sptz com movimento progressivo pode ser devido ao alto número de stpz e escasso plasma seminal, causando severa resposta inflamatória no útero dessas éguas.

Métodos de inseminação

O procedimento padrão para IA na espécie equina é depositar o sêmen no corpo do útero. Pesquisadores têm avaliado como técnicas de IA intra-uterina podem aumentar as taxas de prenhez de garanhões sub-férteis ou com a utilização de baixa dose inseminante. RIGBY et al (2000) relataram que a deposição do sêmen na junção útero-tubárica aumenta o número de

espermatozoides no oviduto *ipsilateralis* (77%), quando comparado com os stpz depositados no corpo do útero (53%), aumentando a probabilidade de fecundação.

Inseminação por desvio de pipeta guiada por palpação retal

É uma técnica relativamente de baixo custo, que utiliza material descartável, prática e fácil para o técnico experiente. O procedimento requer uma pipeta flexível que é direcionada pela cérvix, que a partir deste ponto é posicionada no ápice do corno uterino por palpação retal. Após a confirmação da localização da pipeta o sêmen é depositado próximo a junção útero-tubárica. Uma desvantagem desta técnica é a possível lesão ao endométrio causada por um técnico inexperiente (MILLER, 2008).

Inseminação endoscópica

A IA com a utilização de um aparelho de endoscopia é mais dispendiosa e demorada do que com desvio de pipeta, sendo mais indicada quando se trabalha com um volume baixo de sêmen (<0,5mL). O procedimento requer tranquilização do animal possibilitando inflar parte do útero para facilitar a visualização. A sonda é direcionada para o ápice do corno uterino correspondente ao folículo pré-ovulatório e o sêmen depositado na papila tubárica (MORRIS et al., 2000).

Resultados obtidos com técnicas de IA intra-uterinas

Avaliando a recuperação embrionária de 265 doadoras (664 ciclos) SAMPER et al. (2005) não observaram diferença para éguas inseminadas no ápice do corno uterino *ipsilateralis* ao folículo dominante com desvio de pipeta (46%/473) em comparação com as inseminações endoscópicas (50%/191). Entretanto de acordo com SIEME et al. (2004) deve se considerar a idade e o histórico reprodutivo da égua para decisão do método de IA com sêmen congelado, pois ao avaliarem o efeito de diferentes técnicas de IA e doses na

fertilidade de éguas sadias e com problemas reprodutivas, chegaram a conclusão que éguas com patologias, tiveram índices de prenhez significativamente reduzidos quando inseminadas com endoscópio (33%) comparado com IA convencional no corpo do útero (84%).

Em 149 ciclos estrais, inseminando com desvio de pipeta, MILLER (2008) obteve 67 prenhez (45%), semelhantes ao encontrado por LOOMIS & SQUIRES (2005) (51%).

Protocolos de inseminação artificial utilizando sêmen congelado

O primeiro potro nascido da utilização do sêmen congelado foi em 1957 (BARKER & GANDIER, 1957). Desde então avanços significativos foram observados relacionados a essa biotécnica, entretanto os índices de prenhez continuam baixos, e sujeitos a inúmeras variáveis.

A utilização do sêmen congelado criou uma nova dimensão para a criação de equinos por possibilitar a preservação por tempo indeterminado desse material e permitir a distribuição mundial, o que maximiza a utilização de garanhões com mérito genético superior e reduz custos com transporte e doenças. Barreiras geográficas são abolidas, além disso, pode-se utilizar sêmen congelado de garanhões que estão em competição ou se recuperam de patologias que os impedem de cobrir, ou até mesmo de garanhões mortos, além de ser uma forma de seguro (MILLER, 2008).

Em alguns países, como no Brasil, as éguas inseminadas com sêmen congelado são examinadas de 4 a 6 vezes ao dia e inseminadas imediatamente ou até 6h pós-ovulação, levando em consideração que o espermatozóide pós-descongelamento não sobrevive por longos períodos no trato reprodutor feminino. As doses disponibilizadas pelo proprietário do garanhão para cada égua são limitadas, na maior parte das vezes não indicando o número de espermatozoides e nem a qualidade do sêmen das palhetas, visto que não há um acordo internacional que indique o número mínimo de espermatozoides na dose que é vendida por ciclo ou égua/estação reprodutiva (VIDAMENT, 2005).

Na França, devido ao número de palhetas disponíveis ser de 48 égua/estação (seis doses de 400×10^6 espermatozoides totais) as fêmeas são examinadas somente uma vez ao dia, após a detecção de folículo dominante (≥ 35 mm de diâmetro) e inseminadas a cada 24h até detecção da ovulação (VIDAMENT, 2005).

Os protocolos de IA mais utilizados para sêmen congelado são: uma IA pós-ovulação ou múltiplas inseminações. A utilização de uma IA é realizada quando o número de palhetas é limitado ou de alto valor, como sêmen de garanhões falecidos ou importados. Com este método é necessário a utilização de hormônios indutores da ovulação para minimizar o custo e tempo envolvido. No intervalo entre 12 e 24h após a administração de hCG iniciam-se exames regulares da égua (palpação retal e ultrassonografia transretal) de 6 em 6h até a detecção da ovulação, momento de realização da IA (MILLER, 2008).

Está se tornando mais comum mundialmente à utilização de um protocolo com mais de uma dose, que é uma alternativa viável quando várias doses estão disponíveis e há limitações no número de vezes que a égua será examinada. Um mínimo de duas doses por ciclo deve estar disponível. O desenvolvimento folicular é monitorado (palpação e ultrassonografia) uma vez ao dia até a detecção de folículo entre 30-35mm de diâmetro, momento em que a é administrado um indutor de ovulação. As éguas são inseminadas 24h pós-indução e reexaminadas 18h, sendo inseminadas pela segunda vez, mesmo que tenham ovulado. Se não ocorrer à ovulação a égua é reexaminada 12h após a segunda inseminação e não ocorrendo a ovulação é realizada a terceira inseminação. O uso desse protocolo disponibiliza espermatozóides viáveis dentro do útero entre 12h pré-ovulação e 6h pós-ovulação (LOOMIS & SQUIRES, 2005).

Não houve diferença nas taxas de prenhez/ciclo nas éguas inseminadas com uma dose única dentro das 6h pós-ovulação (51,5%) comparada com as inseminadas com várias doses (51,7%) (LOOMIS & SQUIRES, 2005). Entretanto várias inseminações não são recomendadas para éguas velhas (15

anos acima) que são mais susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura (MILLER, 2008).

Vários protocolos para IA foram estudados, com resultados controversos, vantagens e desvantagens. SQUIRES et al. (2003) compararam dois protocolos relatando índice de prenhez similar quando as éguas foram inseminadas duas vezes, 0h e 24h pós-indução hCG (examinadas uma vez ao dia) ou uma IA pós-ovulação (examinadas 3 a 6 vezes ao dia). SIEME et al. (2003) estudaram o efeito de uma ou múltiplas inseminações quando se utiliza sêmen congelado e concluíram que: 1) Alto índice de fertilidade poderia ser obtido se as éguas fossem inseminadas no intervalo de 12h pré até 6h pós-ovulação; 2) múltiplas inseminações aumentam a probabilidade de se inseminar durante esse intervalo; 3) a escolha entre um ou outro protocolo (1 IA, exames seriados contra múltipla IA, exame a cada 24h) dependeria do equilíbrio entre o custo do sêmen/dose contra o custo das inseminações e médico veterinário.

Realizando 4 inseminações com dose total de 100×10^6 espermatozoides/cada, em 24h, sendo a última 5h antes da ovulação, e CLÉMENT et al. (2005) obtiveram taxas de prenhez menores que quando comparado com única IA de 400×10^6 12h pré-ovulação. Os autores relataram que o resultado inferior para múltiplas inseminações pode ter sido pelo alto número de intervenções no útero durante 24h, que pode ter resultado em uma maior reação inflamatória. Outra explicação pode ser mecânica, com perda de sptz devido às contrações uterinas após cada IA e perdas na pipeta, resultando em reduzido número de espermatozoides.

Em teste de fertilidade, REGER et al. (2003) relataram que de 34 éguas inseminadas 26 engravidaram (76%) após duas inseminações comparando com 15/21 (71%) das inseminadas uma vez 6h pós-ovulação. Também não observaram diferenças na recuperação embrionária de éguas inseminadas uma vez com 800×10^6 sptz totais (60%) e as inseminadas duas vezes 24 e 40h após a indução da ovulação com dose de 400×10^6 (55%).

Taxas de prenhez/ciclo e por estação semelhantes foram encontradas por LOOMIS (2001), para éguas inseminadas com sêmen congelado (51 e 75%) e resfriado (59 e 74%), demonstrando que a seleção criteriosa de garanhões e éguas, resulta em aumento nos índices de prenhez, enquanto SIEME et al. (2003) encontrou resultados superiores para éguas IA com sêmen resfriado (53%) em comparação com sêmen congelado (44%).

Pesquisas com baixas doses tanto com a utilização de endoscópio quanto por pipeta flexível foram realizadas com sêmen fresco e congelado (MORRIS et al., 2000; MORRIS, 2004; SAMPER et al., 2005). Infelizmente algumas são inconclusivas, devido: 1) comparação entre grupos confundida com vários outros fatores; 2) número de ciclos ou garanhões insuficientes; 3) técnica de congelamento inespecífica ou inválida (SIEME et al., 2004).

Utilizando sêmen congelado de 55 garanhões BARBACINI et al. (1999) inseminaram 293 éguas (576 ciclos) com dose de 200×10^6 smp. Monitoraram atividade folicular a cada 24h, até a detecção do folículo dominante e induziam a ovulação com hCG. As inseminações foram realizadas 12h após a administração do hormônio (225 ciclos) ou 6h pós-ovulação (351 ciclos). O índice de prenhez por ciclo foi de 38% e por estação 75%. Observaram que a taxa de gestação por idade foi inferior nas éguas com mais de 16 anos (39%) quando comparado com fêmeas entre 10 e 16 (82%) e entre 3 e 9 anos (85%). O índice de prenhez por ciclo de acordo com o protocolo de IA foi de 39% para éguas IA pré-ovulação e 37% para éguas IA pós.

Taxas de prenhez menores quando se utilizou 50×10^6 de espermatozóides totais depositados no corpo do útero 12h pré-ovulação (26%) ou no ápice do corno uterino *ipsilateralis* ao folículo pré-ovulatório por desvio de pipeta (25%), comparado com um dose de 400×10^6 sptz totais no corpo do útero (46%) foram encontradas por CLÉMENT et al. (2005). SIEME et al. (2004) não encontraram diferença na taxa de prenhez quando utilizaram dose de 100×10^6 de espermatozóides totais depositados no corpo do útero (43%), no ápice do corno uterino por desvio de pipeta (45%) ou por inseminação endoscópica (46%) comparado com uma dose de 800×10^6 de sptz totais

depositados no corpo do útero (43%), em todos os casos as inseminações foram realizadas 6h pré-ovulação.

Considerações finais

O diluente centrifugação/congelamento, crioprotetor, sistema de armazenamento, ou método de congelamento não interferem de forma fundamental na fertilidade do sêmen congelado, sendo mais influenciada pela dose da inseminação e momento da cobertura.

A comparação entre trabalhos é extremamente difícil, pois com raras exceções se encontram trabalhos na literatura com a mesma metodologia de congelamento ou de inseminação e o número de animais utilizados na maioria dos casos é insuficiente para se estabelecer diferenças significativas.

Com a crescente procura desta biotécnica pelos produtores, é cada vez maior a necessidade de protocolos de congelamento e inseminação que proporcionem taxas de fertilidade superiores, para que a credibilidade desta técnica e sua utilização tornem-se rotineiras nos criatórios.

Referências

1. BARBACINI, S.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994-1997 period. **Equine Veterinary Education**, v.11, p.109-112, 1999.
2. BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in a equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v.2, p.404-410, 2000.
3. BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epidymal spermatozoa. **Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.21, p.47-51, 1957.
4. CLÉMENT, F.; DUCHAMP, G.; LARRY, J.L.; VIDAMENT, M. Effects of frequency of insemination, number of spermatozoa and insemination site on fertility of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.208-211, 2005.
5. DOBRINSKI, I.; THOMAS, P.G.A.; BALL, B.A. Cryopreservation reduces the ability of equine sperm to attach to oviductal epithelial cells and zonapellucida. **Journal of Andrology**, v.16, p.536-542, 1995.
6. DOBRINSKI, I.; SMITH, T.T.; SUAREZ, S.S.; BALL, B.A. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. **Biology of Reproduction**, v.56, p.861-869, 1997.

7. ELLINGTON, J.E.; SAMPER, J.C.; JONES, A.E.; OLIVER, S.A.; BURNETT, K.M.; WRIGHT, R.W. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) cells or their secretory products. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.51-65, 1999.
8. LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, E.L.; SQUIRES, E.L.; McCUE, P.M.; BRINSKO, S.P.; VANDERWALL, D.K. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. **Theriogenology**, v.49, p.1537-1543, 1998.
9. LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.191-200, 2001.
10. LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v.64, p.480-491, 2005.
11. METCALF, E. Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.297-299, 2005.
12. MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.
13. 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. **Journal of Reproductive and Fertility**, v.118, p.95-100, 2000.
14. MORRIS, L.H.A. Low dose insemination in the mare: an update. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.625-632, 2004.
15. REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L.; MACLELLAN, L.J.; BARBACINI, S. Effects of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. **Equine Veterinary Education**, v.15, p.130-136, 2003.
16. RIGBY, S.; DERCOZO, B.S.; BRINSKO, S.; BLANCHARD, T.; TAYLOR, T.; FORREST, D.W.; VARNER, D. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In: ANNUAL AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS CONVENTION, 46., 2000, San Antonio. **Anais...Lexington: AAEP**, 2000. p.332-334.
17. SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methodology for stallion semen cryopreservation: an international survey. **Theriogenology**, v.49, p.895-904, 1998.
18. SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.219-228, 2001.
19. SAMPER, J.C.; SANCHEZ, R.; GOMEZ, I.; LEITE, B. Artificial insemination with frozen semen: Pregnancy rates after rectally guided or endoscopic deposition. In: ANNUAL AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS CONVENTION, 51., 2005, Seattle. **Anais...Lexington: AAEP**, 2005.
20. SIEME, H.; SCHAFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v.60, p.1153-1164, 2003.
21. SIEME, H.; BONK, A.; HAMMANN, H.; KLUG, E.; KATILA, T. Effects 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.
22. SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: ANNUAL AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS CONVENTION, 49., New Orleans. **Anais....Lexington: AAEP**, 2003.
23. THOMAS, P.G.A.; BALL, B.A.; MILLER, P.G.; BRINSKO, S.P.; SOUTHWOOD, L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. **Biology of Reproduction**, v.51, p.303-309, 1994.

24. VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.115-136, 2005.