

## Influência do intervalo entre a inseminação artificial com sêmen diluído resfriado e transportado e a ovulação sobre a fertilidade de éguas

(Effects of AI-ovulation intervals on fertility of inseminated mares with diluted, cooling and transported semen)

J.M. Silva Filho<sup>1</sup>, G.R. Valle<sup>2</sup>, H.M. Saturnino<sup>1</sup>, M.S. Palhares<sup>1</sup>, H.N. Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escola de Veterinária da UFMG

Caixa Postal 567 – CEP 30161-970 – Belo Horizonte – MG

<sup>2</sup>Aluno de pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia da FMVZ da UNESP, Botucatu – SP

<sup>4</sup>Médico Veterinário – Regimento de Cavalaria – PMMG

### RESUMO

Estudou-se o efeito do intervalo inseminação/ovulação (T1 = 24 horas pré-ovulação; T2 = 48 horas pré-ovulação; T3 = 48 horas pré-ovulação e no dia da ovulação; T4 = 72 horas pré-ovulação e no dia da ovulação), em decorrência da frequência de inseminações utilizadas (segundas, quartas e sextas-feiras), sobre a fertilidade de 147 ciclos de éguas inseminadas com sêmen de apenas um garanhão, diluído em diluidor de leite desnatado-glicose, na concentração de  $400 \times 10^6$  espermatozoides móveis/dose inseminante de 15ml, resfriado a 14°C/3,6 horas e transportado em "container" modelo Celle modificado. O intervalo IA/ovulação não afetou ( $P>0,05$ ) a fertilidade, independentemente da característica estudada. A sobrevivência espermática de 60 horas viabilizou inseminações às segundas, quartas e sextas-feiras, sem prejuízo da fertilidade do sêmen.

Palavras-Chave: Equino, intervalo inseminação/ovulação, taxa de concepção

### ABSTRACT

One hundred forty seven cycles of mares were allocated in a completely randomized experiment, with different number of replications and divided in four treatments (T1 = 24 hours preovulation; T2 = 48 hours preovulation; T3 = 48 hours preovulation and in the same day of ovulation; T4 = 72 hours preovulation and in the same day of ovulation), in order to study the effect of AI/ovulation interval on mare fertility. The mares were inseminated three times for week (monday, wednesday and friday), with semen of only one stallion diluted in extender skim milk-glucose, using a volume of 15ml, with  $400 \times 10^6$  sptz viable, cooled at 14°C/3.6 hours, and transported in modified container Celle. Conception rates were not different according to the treatments. So, observed spermatoc survival for 60 hours showed the practicability of the inseminations on monday, wednesday and friday.

Keywords: Equine, insemination/ovulation interval, conception rate

---

Recebido para publicação em 23 de abril de 1998

Fonte Financiadora: FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – CAG 188095

Apoio: Regimento de Cavalaria Alferes Tiradentes – PMMG

Colaboradores: L.G.P. Magnago<sup>2</sup>, L.R. Vianna<sup>4</sup>

## INTRODUÇÃO

A frequência de cobrições ou inseminações é um dos aspectos mais importantes do manejo reprodutivo de eqüinos, embora tenha merecido reduzida consideração da literatura. Ela depende, fundamentalmente, da individualidade do garanhão e do tipo de sêmen utilizado. Na individualidade do garanhão há que se salientar a importância da motilidade progressiva, morfologia espermática, tempo exigido para a capacitação, concentração da dose inseminante e duração da capacidade fecundante no sistema genital da égua. Igualmente importantes para o sucesso da concepção são o acompanhamento sistemático do desenvolvimento folicular, a determinação do momento da ovulação, a duração da viabilidade do óvulo no sistema genital da égua bem como a qualidade do ambiente uterino (Silva Filho, 1994). Além disso, Pickett et al. (1987) citam que muitas das variáveis que influenciam a fertilidade podem estar inter-relacionadas, por exemplo, se a frequência de inseminações for aumentada, o número de espermatozoides por dose inseminante poderia ser reduzido. Entretanto, a fertilidade depende da viabilidade do espermatozoide no sistema genital da égua e do ambiente uterino. Se a viabilidade diminui, a frequência e, provavelmente, o número de espermatozoides/inseminação devem ser aumentados. Por outro lado, quando os espermatozoides forem viáveis durante um período mais longo no sistema genital, menor frequência e concentração espermáticas poderiam ser toleradas.

De uma maneira geral, baseando-se na sobrevivência média do espermatozoide eqüino no sistema genital da égua, têm-se recomendado cobrições ou inseminações artificiais a cada 48 horas até à ovulação. Baseando-se na viabilidade média do ovócito liberado, as inseminações poderiam ser realizadas até 12 horas após a ovulação (Pickett et al., 1987). Para que isso seja possível, o regime de trabalho durante a estação de monta inclui, além dos dias normais, procedimentos de colheita de sêmen e inseminação também nos finais de semana, o que onera, em muito, o sistema de criação.

Neste trabalho, procurou-se estudar a exequibilidade da utilização de inseminações

artificiais em éguas, três vezes por semana, utilizando-se sêmen diluído resfriado e transportado.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho realizado na Zona Metalúrgica do Estado de Minas Gerais, nos municípios de Belo Horizonte e Florestal, eqüidistantes 60km. O período experimental compreendeu duas estações de monta consecutivas (94/95 e 95/96).

Foram utilizados 147 ciclos de 100 éguas mestiças, de 3 a 19 anos de idade, pertencentes a diferentes categorias reprodutivas (éguas solteiras, éguas paridas e potras), distribuídas em quatro grupos experimentais, definidos segundo o intervalo entre a última IA, ou última e penúltima, e a ovulação, conforme se segue: T1 – 24 horas pré-ovulação (24P); T2 – 48 horas pré-ovulação (48P); T3 – 48 horas pré mais uma IA em até 24 horas após a ovulação (48PP); T4 – 72 horas pré mais uma IA em até 24 horas após a ovulação (72PP).

Antes do início de cada uma das estações de monta, todas as éguas solteiras e potras foram submetidas a exame ginecológico, constituído de avaliação da conformação externa e interna do sistema genital, citologia e cultura de conteúdo uterino (exceto as potras), e antibiograma, quando o resultado da respectiva cultura o indicava. A partir dos resultados obtidos, tratamentos médico-cirúrgicos foram realizados.

O controle de crescimento folicular nas éguas foi realizado por palpação retal em dias alternados, até que se detectasse um folículo de 2,0 a 2,5cm de diâmetro em um dos ovários, sendo, a partir daí, realizado diariamente. Ao se detectar um folículo de 3,0 a 3,5cm de diâmetro, iniciavam-se as inseminações artificiais, que terminavam quando detectada a ovulação. As éguas solteiras e potras obedeciam a esse esquema ao início das estações, e as éguas paridas eram palpadadas a partir do quinto dia após o parto. Cerca de metade das éguas trabalhadas eram rufiadas diariamente a partir da detecção do folículo de 2,0 a 2,5 cm de diâmetro, até o dia da ovulação. O controle da gestação era feito por palpações retais aos 17, 21, 25, 30, 35, 40, 45, 60 e 90 dias após a ovulação.

Em ambas as estações foi utilizado o mesmo garanhão da raça Brasileira de Hipismo (7-8 anos de idade) como doador de sêmen, o qual apresentava bom índice de fertilidade, aferida anteriormente (Silva Filho et al., 1993). Em Belo Horizonte, o sêmen era colhido em vagina artificial modelo Hannover, às segundas, quartas e sextas-feiras. Após avaliação da motilidade e do vigor em microscópio óptico e da concentração por contagem em câmara de Neubauer, o sêmen era diluído a 37°C, em diluidor de leite em pó desnatado-glicose (Kenney et al., 1975). As doses inseminantes eram constituídas por 400 milhões de espermatozoides móveis em 15ml de sêmen diluído, as quais eram transportadas em "container" modelo "Celle" modificado, no tempo médio de 3,6 horas e à temperatura final de 14°C, até Florestal, onde se encontravam as éguas.

Para detecção de diferenças entre os grupos realizou-se análise de variância para fertilidade. Por se tratar de uma característica qualitativa, fez-se a conversão dos dados de fertilidade em quantitativos (Voss et al., 1975), obtendo-se valores numéricos médios para os grupos experimentais, chamados de eficiência de prenhez. As comparações entre as médias foram feitas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Características quantitativas (idade das éguas; volumes médios do sêmen e do diluidor;

tempos da coleta do sêmen ao resfriamento, de resfriamento, da coleta à IA, da rufiação à IA, do crescimento folicular e do intervalo entre a última IA e a ovulação; temperatura final do sêmen; tamanho do folículo à ovulação) foram também submetidas à análise de variância e ao teste SNK para comparação de médias.

Os resultados relativos a número de IA/ciclo, número de IA/ciclo gestante e número de IA/ciclo vazio, por serem descontínuos e de distribuição não normal, foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Caso fossem detectadas diferenças entre os tratamentos, aplicava-se o teste t de Student para ordenação das médias.

Os dados proporcionais (ciclos/concepção, ciclos/égua gestante e taxa de concepção/ciclo) foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado para detecção de diferenças entre os tratamentos.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às taxas de concepção ao primeiro ciclo e concepção/ciclo, são apresentados na Tab.1. Dados relacionados à eficiência de prenhez encontram-se na Tab.2. Em nenhum dos casos detectaram-se diferenças entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1. Número de ciclos por concepção e taxa de concepção em éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado, de acordo com o intervalo IA/ovulação.

Ciclo	24P		48P		48PP		72PP	
	nº ciclos <sup>1</sup>	Taxa <sup>2</sup> concepção	nº ciclos	Taxa concepção	nº ciclos	Taxa concepção	nº ciclos	Taxa concepção
1	30(19)	63,33	20(10)	50,00	39(20)	51,28	10(6)	60,00
2	7(3)	42,86	8(1)	12,50	11(8)	72,73	7(4)	57,14
3	3(1)	33,33	4(2)	50,00	3(2)	66,67	-	-
4	2(0)	0,00	1(0)	0,00	-	-	-	-
5	-	-	-	-	1(0)	0,00	1(0)	0,0
Total	42(23)	54,76	33(13)	39,39	54(30)	55,56	18(10)	55,56

1 - Números entre parênteses referem-se às éguas gestantes

2 - Valores em %.

24P (24h pré-ov.); 48P (48h pré-ov.); 48PP (48h pré- +pós-ov.)

72PP (72h pré- + pós-ov.).

Como os diferentes intervalos IA/ovulação analisados foram decorrentes da frequência das IAs utilizadas às segundas, quartas e sextas-feiras, algumas das características avaliadas na Tab.2 apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos resultantes de variações nesta

frequência, já que as demais condições experimentais foram semelhantes para todos os ciclos.

O período de sobrevivência dos gametas no sistema genital da égua foi motivo de estudos já

na década de 40 (Zivotkov, 1941; Skatkin, 1943; Laing, 1943), quando se observaram melhores resultados com IAs realizadas até 48 horas pré-ovulação, ou no momento de sua ocorrência, em relação às realizadas pós-ovulação. Cheng (1965) relatou resultados adequados de IAs de 36-48 horas pré-ovulação a 6 horas pós-ovulação (58,8 a 100% de concepção total). Esses trabalhos pioneiros, aliados aos resultados de Voss et al. (1979) e Pickett et al. (1987), que não obtiveram diferenças entre IAs diárias ou em dias alternados, embora inferiores, com intervalos maiores que 48 horas (Pickett et al., 1987), definiram um esquema padrão de inseminações a cada 48 horas em equinos. Silva Filho (1994), confirmando a adequabilidade desse esquema,

também não obteve diferença entre IAs realizadas com intervalos de 24 ou 48 horas. O mesmo resultado foi obtido no presente experimento, no qual não se observou diferença ( $P>0,05$ ) entre os grupos 24P e 48P (Tab. 1 e 2).

A literatura mais recente tem demonstrado que a sobrevivência espermática pode ser maior. Palmer (1984) obteve resultados semelhantes entre IAs realizadas de 48-72 horas pré-ovulação e intervalos menores e Woods et al. (1990) obtiveram fecundação com IAs realizadas dentro de sete dias pré-ovulação, embora os melhores resultados fossem encontrados em até 72 horas pré-ovulação.

Tabela 2. Eficiência de prenhez e características reprodutivas em éguas inseminadas com sêmen diluído, resfriado e transportado, de acordo com o intervalo IA/ovulação.

Característica	Tratamentos			
	24P	48P	48PP	72PP
Nº de ciclos	42	33	54	18
Idade (ano)	10,79±4,92	10,33±4,21	10,33±4,62	12,17±4,03
Nº IA/ciclo	2,10±0,69	2,42±2,39	3,07±1,52	2,56±0,78
Nº IA/ciclo gestante	2,09±0,52ab	1,85±1,14a	3,00±1,39c	2,40±0,52bc
Nº IA/ciclo vazio	2,11±0,88a	2,80±2,90a	3,17±1,69b	2,63±0,92ab
Nº ciclos/concepção	1,83	2,54	1,80	1,80
Eficiência de prenhez	5,24	3,64	5,11	5,11
Volume de sêmen (ml)	3,45±1,06b	4,20±1,76a	3,94±1,81ab	3,68±1,34ab
Volume de diluidor (ml)	11,53±1,10a	10,82±1,78b	11,12±1,64ab	11,32±1,34ab
Tempo coleta/resfriamento (min)	49,03±11,26ab	51,59±13,16a	47,10±12,48ab	45,00±9,58b
Tempo de resfriamento (min)	235,89±50,01	215,58±57,43	227,47±54,86	222,53±44,20
Temp. do sêmen (°C)	13,94±1,65	14,01±2,59	13,68±1,81	13,51±1,60
Tempo rufiação/IA (min)	43,17±18,63a	32,72±17,42b	33,99±15,78b	35,64±15,85b
Tempo coleta/IA (min)	314,18±57,78a	288,40±67,24b	294,58±61,96b	290,91±49,05b
Folículo à ovulação (cm)	3,86±0,52	3,81±0,60	3,75±0,46	3,59±0,36
Folículo 2,75 à ovulação (dias)	4,78±1,51	7,00±4,50	5,52±4,04	5,57±2,57

Valores seguidos por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P<0,05$ )

24P (24h pré-ov.); 48P (48h pré-ov.); 48PP (48h pré- + pós-ov.); 72PP (72h pré- + pós-ov.)

Quanto às IAs pós-ovulação, Pickett et al. (1987) e Woods et al. (1990) consideraram-nas viáveis dentro de 12 horas da sua ocorrência, quando os resultados foram semelhantes aos de IAs pré-ovulação. No entanto, Katila et al. (1988) obtiveram fecundação em até 18-24 horas pós-ovulação, embora os resultados fossem melhores em até 12-18 horas após a sua ocorrência. Segundo Hunter (1990), a partir de 12 horas após a liberação do ovócito, torna-se significativo um processo de degeneração nuclear que leva ao pareamento imperfeito dos cromossomos no processo de mitose do zigoto, levando à morte do embrião. Ocorre, também, disfunção dos grânulos corticais que possibilitam a polispermia e conseqüente morte do embrião poliplóide.

Assim, no experimento de Katila et al. (1988), em que a taxa de concepção total foi de 46%, após IAs de zero a 27 horas pós-ovulação, houve uma queda para 29%, devido às perdas embrionárias.

A viabilidade do ovócito liberado é maior na espécie eqüina, se comparada à de outros mamíferos (8-10 horas). Essa maior longevidade deve-se ao fato de que alguns ovócitos, quando liberados, podem ainda estar imaturos, no estágio de ovócito I, ou na fase intermediária entre os estádios I e II da meiose, terminando sua maturação no oviduto. Essa situação peculiar na égua parece se dar pela inexistência de um incisivo pico pré-ovulatório de gonadotropinas.

ao contrário do que ocorre nos bovinos, ovinos e suínos (Hunter, 1990).

Ginther (1983) observou, a partir da introdução de um garanhão em um grupo de 20 éguas, menor ocorrência de cópulas no período de 24 horas pré a 24 horas pós-ovulação, em relação a éguas em cio fora dessa faixa. O significado dessa observação na natureza é obscuro. No entanto, a necessidade de longa sobrevivência espermática no sistema genital feminino da égua fica patente, bem como a existência de um reservatório espermático essencial, apesar de ainda não claramente definido nessa espécie (Polge, 1987; Bader, 1982; Boyle et al., 1987; Hunter, 1990).

Assim, a associação de IAs pré e pós-ovulação em menor frequência de IA pode ser viável, como o foi neste experimento, em que não se observaram diferenças de fertilidade ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais (Tab. 1 e 2).

A associação de IAs pré e pós-ovulação proporciona maior segurança em relação à viabilidade espermática no momento da ovulação. Em situações em que a qualidade espermática não permita sua viabilidade por 48-72 horas até a ovulação, a IA pós-ovulação poderia suprir a deficiência espermática.

Comparando IAs 24 horas pré com IAs 24-48 horas pré mais uma 0-12 horas pós-ovulação, Heiskanen et al. (1994) obtiveram melhor resultado com o segundo grupo. No entanto, o intervalo de até 12 horas para a IA após a ovulação garantiu a fecundação, eliminando a necessidade de maior sobrevivência espermática.

No presente experimento, como o controle folicular era realizado a cada 24 horas, as ovulações podem ter ocorrido de zero a 24 horas após o último controle folicular em que a ovulação não foi detectada. Portanto, não se pode afirmar que, no caso do grupo 72PP, a fecundação tenha sido realizada por um espermatozóide que apresentou 72 horas de sobrevivência espermática, ou que um oriundo da dose inseminante aplicada pós-ovulação, tenha fecundado um ovócito de até 24 horas. De acordo com a viabilidade do ovócito de cerca de 12 horas (Pickett et al., 1987; Hunter, 1990; Woods et al., 1990), considera-se que a viabilidade espermática, obtida neste

experimento, tenha sido de, pelo menos, 60 horas, já que o tratamento 72PP foi semelhante ( $P>0,05$ ) aos demais (Tab. 1 e 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Silva Filho et al. (1993), que embora utilizassem sêmen fresco diluído, não obtiveram diferença, como neste trabalho, entre os grupos 48PP e 72PP.

Laing (1943) afirma que para o sêmen estocado a sobrevivência no trato genital feminino foi menor. No entanto, as condições de estocagem a que o sêmen foi submetido, por 24 horas, não foram definidas. Já Aliev (1981), trabalhando com sêmen congelado, não observou diferença quanto às taxas de concepção total entre intervalos de 2 à 48 horas entre IAs, exceção apenas para o pior resultado com sêmen peletizado, entre os intervalos de 37-48 horas e de 13-24 horas, quando houve superioridade do último tratamento. Da mesma forma, Palmer (1984) não obteve diferença dentro da faixa de IAs realizadas 48-72 horas pré-ovulação a 12-24 horas pós-ovulação, ao utilizar sêmen resfriado. Lima (1995) não obteve diferença entre os grupos de 48 pré, 24 pré e 48 pré mais uma IA até 24 horas pós-ovulação.

De maneira geral, os resultados dos autores acima citados demonstraram viabilidade espermática, para o sêmen resfriado ou congelado, semelhante à do sêmen fresco, o mesmo ocorrendo quanto aos resultados aqui apresentados (Tab. 1 e 2).

Quando se comparam os resultados obtidos por Silva Filho et al. (1993) com os do presente experimento, ambos nos grupos 48PP e 72PP, observa-se que apenas os resultados relativos às taxas de concepção ao primeiro ciclo foram numericamente inferiores neste experimento (66,67 vs 51,28 e 65,52% vs 60,00%, respectivamente para 48PP e 72PP). Em relação às taxas de concepção/ciclo (52,00 vs 55,56 e 57,78% vs 55,56%, na mesma ordem) e eficiência de prenhez (4,88 vs 5,11 e 5,29 vs 5,11, na mesma ordem), os resultados foram semelhantes entre os experimentos, reafirmando a manutenção da capacidade fecundante do sêmen resfriado e fresco no trato genital da égua (Tab. 1 e 2). A elevada viabilidade espermática aqui obtida é um indicativo de que as condições de resfriamento e transporte do sêmen foram adequadas, não causando lesões significativas nos espermatozoides.

Finalmente, neste trabalho, confirma-se a proposição de Silva Filho et al. (1993) de que, a fim de se evitarem IAs aos sábados e domingos, poder-se-ia fixá-las nas segundas, quartas e sextas-feiras, sem prejuízo de fertilidade.

### CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com sêmen resfriado/transportado, a utilização de inseminações artificiais às segundas, quartas e sextas-feiras é viável. Entretanto, a implantação do sistema dependerá da qualidade do sêmen quanto à sobrevivência espermática, em virtude da grande variabilidade dessa característica entre garanhões. Sua implantação poderá ser uma forma de redução de custos, como mão-de-obra e insumos. Além disso, possibilitará melhor gerenciamento das atividades da propriedade ], pela fixação dos dias destinados à coleta de sêmen e inseminação artificial, redução do trabalho no final de semana e melhor programação das atividades semanais do haras e do técnico, em um programa de inseminação artificial, sem prejuízo da fertilidade do rebanho.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALJIEV, A.I. The effect of ovariotropin on reproductive function of mares, and the optimum time of insemination with frozen-thawed semen. *Mosk. Vet. Akad. Anim. Breed. Abstr.* v.49, 1981. (Abstracts, 6815).
- BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n.32, p.59-64, 1982.
- BOYLE, M.S., CRAN, D.G., ALLEN, W.R. et al. Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n.35, p.79-86, 1987.
- CHENG, P.L. The application of some investigations of reproductive physiology in horse breeding practice in China. *Anim. Breed. Abstr.*, v.33, 1965. (Abstracts, 58)
- GINTHER, O.J. Sexual behavior following introduction of a stallion into a group of mares. *Theriogenology*, v.19, p.877-886, 1983.
- HEISKANEN, M.L., HUHTINEN, M., PIRHONEN, A. et al. Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for approximately 40 hours. *Acta Vet. Scan.*, v.35, p.257-262, 1994.
- HUNTER, R.H.F. Gamete lifespans in the mare's genital tract. *Equine Vet. J.*, v.22, p.378-379, 1990.
- KATILA, T., KOSKINEN, E., KUNTSI, H. et al. Fertility after postovulatory inseminations in mares. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11, 1988, Dublin: University College Dublin, 1988. v.2. (Abstracts 96).
- LAING, J.A. Observations on the survival of stored spermatozoa in the genital tract of the mare. *Anim. Breed. Abstr.*, v.11, p.150, 1943.
- LIMA, M.C.C. *Sêmen eqüino: efeito da diluição, resfriamento a 20°C e transporte sobre a fertilidade*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1995. 121p. (Dissertação, Mestrado).
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10, 1984, Urbana *Proceedings...* Urbana: University of Illinois, 1984. v.3. (Abstracts, 377).
- PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L., MCKINNON, A.O. *Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination*. Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987. 125p.
- POLGE, C. Fertilization in the pig and horse. *J. Reprod. Fertil.*, v.54, p.461-470, 1978.
- SILVA FILHO, J.M. *Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de éguas*. Viçosa: Faculdade de Zootecnia da UFV, 1994. 497p. (Tese, Doutorado).
- 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 fresco, diluído. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1993, Belo Horizonte. *Anais: Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 1993. p.264.
- SKATKIN, P.N. Systems of mating and artificial insemination of horses. *Anim. Breed. Abstr.*, v.11, p.86, 1943.
- 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.
- VOSS, J.L., WALLACE, R.A., SQUIRES, E.L. et al. Effects of synchronization and frequency of insemination on fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n.27, p.257-261, 1979.
- WOODS, J., BERGFELDT, D.R., GINTHER, O.J. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. *Equine Vet. J.*, v.22, p.410-415, 1990.
- ZIVOTIKOV, H.I. The efficacy of mating and insemination of mares during or after ovulation. *Anim. Breed. Abstr.*, v.9, p.303, 1941.