

Evaluación de la inseminación artificial profunda con dosis bajas de semen refrigerado en yeguas de silla Argentina y Criollo Argentina

Evaluation of artificial deep insemination with low dose of cooled semen in Silla Argentina and Creole Argentina mares

Nathalia Malagón¹, M. Sc.; Mario Pino¹, M. Sc.; Jair Pérez², Ph. D.; Mauricio Bonilla³, MVZ; Germán A. Bulla⁴, Esp.

Resumen

Con el propósito de evaluar la efectividad de la inseminación artificial profunda con catéter flexible guiado vía transrectal, empleando dosis bajas de semen refrigerado de 100 y 200 millones de espermatozoides, se diseñó un estudio experimental con 44 yeguas del Criadero Caballar Mancilla, perteneciente a la Escuela de Carabineros y Seguridad Rural, ubicado en el municipio de Facatativá. Las edades oscilaron entre 3 y 15 años, y se distribuyeron en cuatro grupos de 11 yeguas cada uno. Dos grupos de yeguas menores de 10 años (grupos A y B) y dos grupos mayores de 10 años (grupos C y D). Los grupos A y C fueron inseminados con 100 millones de espermatozoides refrigerados, mientras que a los grupos B y D se aplicó una dosis de 200 millones de espermatozoides refrigerados. La técnica de inseminación artificial profunda se realizó depositando la dosis de espermatozoides indicada en la unión útero-tubárica, ipsilateral al folículo preovulatorio. Para el análisis de los resultados, se utilizó la prueba chi-cuadrado X^2 . Se concluye que la mejor tasa de concepción fue de 82 %, y se obtuvo en el grupo B; igualmente, se observó que la técnica de inseminación artificial profunda no afectó la tasa de gestación. Se recomienda inseminar con dosis de 200 millones y explorar en otros estudios el uso de semen congelado y dosis inferiores.

Palabras clave: Inseminación artificial profunda, seminal, espermatozoides refrigerados, dosis mínima.

Abstract

In order to evaluate the efficacy of artificial insemination with a flexible catheter guided transrectally in mares and using low doses (100 and 200 millions) of refrigerated sperm, we designed an experimental study with 44 mares from the Mancilla Equine Breeding farm, belonging to the School of Carabineers and Rural Safety, located in the Municipality of Facatativá. Mare's ages ranged from 3 to 15 years, and were divided in four groups of eleven mares each one. Two groups of mares (A and B) under 10 year-old and two groups of mares (C and D) over 10 years-old were inseminated with 100 million refrigerated sperm (Groups A and C), while groups B and D were inseminated with 200 million refrigerated sperm. The deep artificial insemination technique was performed by inoculating the indicated sperm dose at the utero-tubal connection, where the pre-ovulatory follicle is usually located. The data were analyzed by using a Chi-square test (X^2). The best conception rate was 82% and was obtained in group B. It is concluded that the deep insemination technique does not affect the pregnancy rate and it is also recommended to use doses of 200 million of refrigerated sperm and to explore in future studies, the effectiveness of frozen sperm and lower doses.

Keywords: deep artificial insemination, stallion, cooled sperm, minimum dose.

¹ Fundación Universitaria de la Orinoquia Colombiana, carrera 11 # 9-78, Paz de Ariporo, Casanare.

² Universidad de La Salle, carrera 7A # 172-85, Bogotá.

³ Director Remonta Veterinaria, Criadero Caballar Mancilla, Policía Nacional, kilómetro 3, antigua vía La Vega.

⁴ Director Escuela de Carabineros de Colombia, Policía Nacional, kilómetro 2, antigua vía La Vega.

Cómo citar este artículo: Malagón N, Pino M, Pérez J, Bonilla M, Bulla G. Evaluación de la inseminación artificial profunda con dosis bajas de semen refrigerado en yeguas de silla Argentina y Criollo Argentina en condiciones del trópico alto. Revista Colombiana de Ciencia Animal 2013, 6: 93-99

Autor de correspondencia a doctora Nathalia Malagón M, Fundación Universitaria de la Orinoquia Colombiana, carrera 11 # 9-78, Paz de Ariporo, Casanare. Tel. xxxx. Correo electrónico: mvznathalia@hotmail.com

Copyright © 2013. Revista Colombiana de Ciencia Animal, Universidad del Tolima.

La aplicación de la técnica de inseminación artificial cornual en equinos mejora la eficacia y eficiencia del semental, al permitir servir un número mayor de yeguas, mejora la tasa de gestación y aumenta el número de descendientes por reproductor (Govaere et al., 2007).

La inseminación artificial profunda (IAP) ha permitido maximizar el uso de reproductores de alto valor genético, pues aumenta el número crías deseadas por semental al utilizar dosis menores de semen fresco o semen refrigerado (Mina y Morel, 1999). La inseminación artificial en la unión útero-tubárica en dosis bajas de espermatozoides mejora la eficiencia reproductiva del semental (Alonso et al., 2002), dado que el volumen de semen producido en un eyaculado es optimizado, permitiendo inseminar un mayor número de yeguas, con la probabilidad de incrementar el número de crías por semental por año.

Morris et al. (2000) plantearon que la utilización de la IAP en dosis mínima influye en el mejoramiento de la fertilidad de sementales con baja calidad seminal y reduce el potencial negativo de respuesta posuterina en las yeguas de cría. Cuando se realiza IAP en dosis mínima de semen congelado, los resultados dependen de la calidad del semen, el estado fisiológico del útero y del ovario, el momento de la ovulación y la destreza del inseminador (Samper et al., 2005).

La IAP se ha convertido en la herramienta biotecnológica más implementada en criaderos de caballos de los países desarrollados; su uso está estimado en 80 % de aplicación en el área de la reproducción equina, pues buscan una mayor competitividad, un incremento en la fertilidad y el número de crías, mejorando la calidad genética de los equinos en un menor tiempo (Samper et al., 2006).

Para Nie et al. (2003) la técnica de IAP es más costosa que la técnica de inseminación artificial convencional, pero los beneficios de su utilización son superiores, dado que reduce la presentación de endometritis postservicio que pueden afectar la viabilidad del embrión.

La IAP en caballos en el Brasil ha permitido incrementar y acelerar el mejoramiento genético en la especie; se ha difundido paulatinamente con resultados favorables en diferentes centros de cría equina, permitiendo que se utilicen a los mejores sementales nacionales y extranjeros por medio del transporte de semen refrigerado y pajillas de semen congeladas (Alvarenga et al., 2004).

Este trabajo evalúa la técnica de IAP con catéter guiado vía rectal en dosis bajas de semen refrigerado en yeguas Silla Argentina y Argentina Criollo, alojadas en el Criadero Caballar Mancilla en el municipio de Facatativá, departamento de Cundinamarca, perteneciente a la Escuela de Carabineros y Seguridad Rural de la Policía Nacional de Colombia.

Materiales y métodos

Con el propósito de evaluar la aplicación de la técnica IAP, en dosis de 100 y 200 millones de espermatozoides de semen equino refrigerado en yeguas, se diseñó un experimento con 44 yeguas del genotipo Silla Argentina y Criolla Argentina del Criadero Caballar Mancilla de la Escuela de Carabineros de Facatativá, departamento de Cundinamarca (Colombia). La altitud es de 2673 msnm, humedad relativa entre 60 y 90 % y temperatura promedio de 13 ± 1 °C. La posición geográfica del criadero corresponde a 4°45'25" latitud norte y 74°21'00" longitud oeste.

Las edades de las yeguas oscilaron entre 3 y 15 años y se clasificaron en 2 categorías: yeguas menores de 10 años y yeguas mayores de 10 años. El estudio se dividió en 2 etapas, así: etapa preliminar y etapa experimental. En la etapa preliminar, se realizó una evaluación reproductiva de las yeguas con el fin de determinar su aptitud para la reproducción. Esta evaluación se llevó a cabo durante un periodo de 2 meses con chequeos ecográficos programados cada 8 días. Igualmente, se realizaron evaluaciones físico-clínicas, llevando un registro de los cambios ecográficos, con el fin de tener una historia clínica actualizada de la función reproductiva de las yeguas seleccionadas y prevenir cualquier fuente de variación ajena al diseño experimental propuesto. Basado en estos exámenes, todas las yeguas fueron diagnosticadas como aptas para la reproducción.

Las yeguas seleccionadas para el trabajo se encontraban en pastoreo continuo, pastando en praderas de raygrass (*Lolium perenne*). Al mismo tiempo, se les complementaba la dieta a base de pasto con dos raciones de concentrado al día, distribuido en 1,5 kg por ración. Adicionalmente, las yeguas fueron suplementadas con sales minerales a voluntad y disponían de agua ad libitum. La sanidad se manejó de acuerdo con el plan de salud preventiva establecido por el médico veterinario a cargo, el cual consistía en un plan de vacunación, según el protocolo del criadero y con las vacunas que exige el Instituto Colombiano Agropecuario, así: adenitis equina, rinoneumonitis equina (HVE-1 y 4), rodococosis, salmonelosis, encefalomielit

equina e influenza equina. Los animales fueron desparasitados cada tres meses y se les realizó baño para el control de ectoparásitos cada 2 meses.

La unidad experimental consistió en 4 grupos (A, B, C y D) con 11 yeguas cada uno. A cada grupo, se le aplicó el protocolo de sincronización del estro que se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de sincronización del estro

Grupo	Día	Hormona*	Dosis	Observaciones
A, B, C y D	0	PGF ₂ α	2 ml/IM	Tratamiento sincronización
	14	PGF ₂ α	2 ml/IM	2ª dosis, tratamiento sincronización
	18	PGF ₂ α	2 ml/IM	Inductor ovulación

* Prostal® Laboratorios Over

El semen para el experimento fue recolectado individualmente de cada uno de los dos sementales de la raza Frisón, aplicando la técnica de colecta de semen con vagina artificial. Los sementales gozaban de un buen estado de salud y fertilidad comprobada. Los parámetros evaluados en el espermograma fueron concentración espermática por hemocitometría empleando la cámara de Neubauer;

motilidad espermática por medio de evaluación de gota de semen puro en una laminilla precalentada a 37 °C, observado con microscopio óptico y comparando la motilidad progresiva con semen diluido; la morfología espermática fue evaluada por medio de extendidos sobre un portaobjeto y teñidos con Giemsa (tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de evaluación seminal

Característica evaluada	Semental 1	Semental 2	D. E.
Volumen eyaculado	100 ml	130 ml	21,23
Concentración	85 *sptz × 10 ⁶	200 *sptz × 10 ⁶	81,32
Espermatozoides por eyaculado (millones)	8.000	12.000	2,83.000
Espermatozoides motiles	75 %	80 %	3,53
Longevidad a temperatura ambiente	35 % vivos después de 4 h	40 % vivos después de 4 h	3,53
Longevidad a temperatura ambiente	10 % vivos después de 8 h	12 % vivos después de 8 h	1,41
pH	6,5	6,5	0,00
Morfología	7 % anormales	5 % anormales	1,41
Cociente entre vivos y muertos	5,0	5,5	0,35

*Sptz: espermatozoides.

El semen se refrigeró mediante el siguiente protocolo:

1. Recolección del eyaculado.
2. Filtración (filtros desechables) para eliminar la porción gelatinosa.
3. Evaluación macroscópica del eyaculado.
4. Evaluación microscópica del eyaculado (movilidad progresiva).
5. Recuento en cámara de Neabauer.
6. Centrifugación del eyaculado.

7. Dilución del semen con el diluyente Kenney modificado.
8. Evaluación microscópica de la movilidad posdilución.
9. Envasado y refrigerado por 8 h.

Una vez que el semen se diluyó, se introdujo en bolsas de colecta, las cuales fueron cerradas herméticamente, evitando la entrada de aire. Posteriormente, fueron introducidas en un recipiente plástico estéril. Con el propósito de preservar la muestra, se refrigeró a 5 °C, mediante una curva de enfriamiento con disminución de temperatura de 0,5 °C por minuto. Se garantizó la temperatura empleando el termo Equitainer. La muestra diluida tenía una concentración de 133 millones de espermatozoides/ml.

Se realizó seguimiento ecográfico a las 44 yeguas, y cuando presentaron un folículo preovulatorio de 3,5 cm, se les aplicó la hormona gonodotropina coriónica humana (GCH) en dosis de 2500 UI, IV lento, la cual induce ovulación entre 36-40 horas posaplicación. Una vez transcurridas 30 horas posaplicación, se procedió a realizar la inseminación.

Las yeguas fueron inseminadas al azar, unas con el semen de un reproductor, y otras con el semen del otro reproductor, según el diseño experimental. El posible efecto individual de los reproductores sobre la fertilidad y tasa de gestación se controló utilizando dosis de espermatozoides con las mismas cantidades y con parámetros de calidad seminal similares.

Los grupos A y C (T1), correspondientes a yeguas menores y mayores de 10 años, fueron inseminadas con dosis de 100 millones de espermatozoides refrigerados. Los grupos B y D (T2), correspondientes a yeguas menores y mayores de 10 años, fueron inseminadas con dosis de 200 millones espermatozoides refrigerados. Todas las inseminaciones se hicieron con espermatozoides con movilidad progresiva, semen refrigerado y depositado en la unión útero-tubárica del cuerno ipsilateral al folículo preovulatorio. Para el procedimiento de inseminación, se empleó un catéter flexible de 75 cm de longitud (Minitübe®), que fue colocado por vía transcervical y guiado por manipulación transrectal.

Se practicó una limpieza previa a la inseminación que consistió en lavado del área perineal de la yegua, eliminando los detritos y posibles partículas contaminantes que podían actuar como espermicidas o ser un factor irritante de la zona genital. Luego la zona fue secada verificando la ausencia de materia

fecal; posteriormente, la cola de la yegua fue vendada.

El eyaculado fue filtrado y su evaluación arrojó las siguientes características: 1) volumen: 50 ml; 2) concentración: 350 millones/ml; 3) motilidad progresiva: 50 %. Se calculó el número de espermatozoides en el eyaculado (concentración × volumen), así: 350 millones de espermatozoides/ml × 50 ml = 17.500 millones de espermatozoides. Un único evaluador calculó el número total de espermatozoides con motilidad progresiva (N.º total de espermatozoides × % de motilidad progresiva), así: 17.500 millones de espermatozoides × 50 % = 8.750 millones de espermatozoides móviles. La cantidad de dosis en el eyaculado se obtuvo así: 8.750 millones/200 millones = 43,75 dosis. El volumen de la dosis (VD) para inseminar con 200 millones de espermatozoides refrigerados se obtuvo así: VD = 50 ml/43,75 dosis = 1,5 ml.

Se tomaron 22 dosis que contenían cada una 200 millones de espermatozoides necesarios para la inseminación, y en las siguientes inseminaciones se usó semen de una nueva colecta.

El factor de dilución para aumentar el volumen de la dosis inseminante se calculó así: 350 millones de espermatozoides por ml/50 millones de espermatozoides por ml = 7, correspondiente a 1 parte de semen + 6 partes de diluyente. La dilución de la dosis inseminante se obtuvo así: 1,5 ml + 6 ml = 7,5 ml dosis total inseminante con diluyente.

El diagnóstico de la gestación se realizó por medio de ecografía transrectal a los 15 días después de realizada la inseminación. Se usó la prueba chi-cuadrado para determinar si la tasa de concepción (yeguas con diagnóstico de gestación positivo / yeguas inseminadas) era independiente de la dosis semen usada y de la edad de la yegua.

Resultados y discusión

El número total de yeguas gestantes fue de 31 y las yeguas vacías de 13, obteniéndose una tasa de preñez general de 70,45 % (31/44), la cual está dentro de los parámetros reportados por Lindsey et al. (2005), quienes utilizaron espermatozoides sexados que habían sido almacenados a temperatura entre 5 y 15 °C durante 18 h. La dosis de espermatozoides sexados fue de 20.000.000 y fueron administrados por la técnica de IAP guiada vía transrectal, obteniéndose una tasa de preñez al primer ciclo de 72 % (18/25). Igualmente, Buchanan et al. (2000), en un estudio en el cual utilizaron la IAP con catéter flexible guiado por ultrasonido y depositando 50 y 70 millones de

espermatozoides refrigerados, obtuvieron tasas de gestación de 58 y 62 %, respectivamente. Por otro lado, Rigby et al. (2001) reportaron tasas de gestación de 70 % empleando la técnica de IAP con dosis de 150 millones de semen refrigerado. Los resultados de este estudio se consideran satisfactorios, pues se acercan a los rangos reportados por Alvarenga y Leão (2002), quienes obtuvieron 90 % de preñez en yeguas fértiles.

El diagnóstico de gestación al día 15 posterior a la inseminación determinó tasas de gestación mayores de 60 % en todos los grupos, así: grupo A (64 %), grupo B (82 %), grupo C (64 %) y grupo D (73 %). Dado que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de gestación de los grupos A y C correspondiente al tratamiento 1, se sugiere que la edad de la yegua no tiene efecto reconocible en la tasa de gestación cuando se aplica la inseminación artificial profunda en dosis de 100 millones de espermatozoides refrigerados. Las tasas de gestación obtenidas en este trabajo son significativamente superiores a las reportadas por Terttu (2005), quien trabajó la técnica de IAP en dosis 100 millones de espermatozoides y semen congelado y obtuvo una tasa de gestación de 38 %. Sin embargo, se asemejan a los valores obtenidos (76 %) cuando usaron 200 millones de espermatozoides refrigerados (Terttu, 2005).

Las tasas de gestación en los grupos B y D fueron de 82 y 73 %, respectivamente, quedando 2 y 3 yeguas vacías en dichos grupos. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos B y D, soportando nuestra hipótesis que la edad de la yegua no es una fuente de variación que afecte la tasa de gestación cuando se aplica la técnica de IAP. Los resultados de este trabajo están dentro de los parámetros reportados por la literatura internacional y superan los de otros autores, como Sieme et al. (2003, 2004), quienes emplearon la técnica de IAP con semen refrigerado y reportaron tasa de gestación que fluctuaron entre 42,2 y 61 %; los reportados por Squires et al. (2003), quienes obtuvieron tasas de preñez de 56 %; muy similar a lo reportado por McCue et al. (2000), quienes lograron una tasa de gestación de 58 % en yeguas inseminadas con 100 millones de espermatozoides refrigerados depositados en la fimbria del oviducto, y los obtenidos por Peterson et al. (2002), quienes aplicaron la técnica de inseminación artificial intrauterina con dosis de 500 y 200 millones de espermatozoides refrigerados y obtuvieron tasas de gestación de 37 y 45 %, respectivamente. Sin embargo, los resultados son similares cuando se usaron 500 millones de espermatozoides congelados y 400 millones de espermatozoides frescos y refrigerados, donde se obtuvieron tasas de 64 y 77 %,

respectivamente. Dado que las mejores tasas (82 y 73 %) de gestación en este estudio se obtuvieron en dosis de 200 millones de espermatozoides y en forma independiente de la edad de la yegua, se puede concluir de manera preliminar que es viable el uso de la técnica de IAP en dosis de 200 y 100 millones de espermatozoides con semen refrigerado. No obstante, hay reportes que indican que en yeguas mayores de 10 años de edad se obtiene baja fertilidad, la cual, aparentemente, se atribuye a contaminación e infección en el momento de practicar la inseminación (Pinto y Burns, 2004).

Al analizar la relación entre la gestación y la edad de las yeguas mediante la prueba de chi-cuadrado, se encontró que no hubo diferencias estadísticas significativas ($p = 0,186$), y coincide con lo reportado por Pinto et al. (2002), permitiendo inferir que tanto las yeguas menores como las mayores de 10 años se les pueden aplicar la técnica de inseminación artificial con dosis mínima de esperma.

La efectividad que se obtiene con la técnica de IAP con semen refrigerado en dosis mínima de 100 y 200 millones de espermatozoides equinos demuestra que tiene una tasa de preñez parecida con la tasa de preñez obtenida por monta directa o inseminación cornual y en dosis mayores de 500 millones de espermatozoides, lo cual indica que es una técnica útil en la cual se obtienen grandes beneficios para la vida reproductiva del semental con relación a la cantidad de yeguas que puede cubrir por eyaculado, mejorando su desempeño reproductivo, el progreso genético en la especie y disminuyendo los riesgos de lesiones del semental en la monta directa.

Al analizar la relación entre la gestación y la dosis inseminante, se encontraron diferencias significativas ($p = 0,043$) entre los grupos de yeguas inseminadas en dosis de 100 millones y 200 millones de espermatozoides refrigerados motiles. El mejor resultado se observó en la dosis de 200 millones de espermatozoides motiles refrigerados donde se obtuvo una tasa de gestación de 77,5 % contra la tasa de gestación de 64,63 %, obtenida en la dosis de 100 millones de espermatozoides. Este resultado coincide con los obtenidos por Morris et al. (2000) donde inseminaron yeguas en dosis de 10, 5, 1, 0,5, 0,1 y $0,0001 \times 10^6$ espermatozoides motiles, y obtuvieron tasas de gestación de 60, 75, 64, 29, 22 y 10 %, respectivamente, concluyendo que la dosis de 10×10^6 espermatozoides con motilidad progresiva depositados en la papila útero-tubal se acerca al límite de una fertilización exitosa.

La relación de los grupos de yeguas menores y mayores de 10 años con la dosis de espermatozoides refrigerados se presenta en la figura 1. Los mejores

resultados se presentaron en las yeguas menores de 10 años inseminadas con 200 millones de espermatozoides refrigerados motiles.

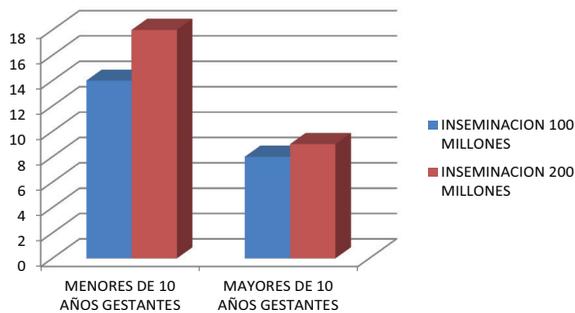


Figura 1. Relación entre edad de gestación y dosis inseminante.

La prueba de chi-cuadrado también demostró la independencia entre la edad de las yeguas y la dosis de espermatozoides refrigerados ($p = 0,069$). Estos resultados coinciden con lo hallado por Lindsey et al. (2002), quienes no encontraron diferencias entre las tasas de preñez (78 y 100 %) en yeguas inseminadas en la unión útero- tubárica con 30 y 120 ml de semen equino, con una concentración de 50 millones/ml de espermatozoides refrigerados en yeguas de diferentes edades.

Conclusiones

La IAP con catéter flexible guiado vía transrectal en yeguas de las razas Silla Argentina y Criollo Argentino con semen equino refrigerado, aplicando dosis mínimas de 100 y 200 millones de espermatozoides refrigerados, es una técnica válida para las condiciones propias de Colombia. Este estudio también concluye que la edad de la yegua no afecta la tasa de gestación cuando se practica la IAP con semen refrigerado en dosis mínimas de 100 y 200 millones de espermatozoides. Los mejores resultados se apreciaron en dosis de 200 millones de semen refrigerados guiados con catéter flexible vía transrectal depositados en la unión útero-tubárica.

Recomendaciones

Se recomienda la IAP en yeguas Silla Argentina y Argentina Criollas en dosis de 200 millones de espermatozoides motiles guiados con catéter flexible de 75 cm vía transrectal. También se recomienda abordar en futuros estudios otras fuentes de variación, como la época del año, la edad del semental y el genotipo de las yeguas y su condición corporal. Surge la necesidad de evaluar esta técnica

con el eyaculado de sementales con pobre calidad de semen.

Conflicto de interés

Los autores expresan no tener conflicto de interés financiero o algún otro.

Referencias

- Alonso A., Pinto M., Gambarotta M., Miragaya M., 2002. Obtención de preñeces en equinos por primo-inseminación utilizando semen congelado-descongelado a dosis mínima. Revista de Bioestadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina 39, 26-29.
- Alvarenga M., Leão K., 2002. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by Percoll gradient. Theriogenology 58, 651- 653.
- Alvarenga M., Trinqué C., Lima M., Onoe E., Fonseca H., 2004. The use of hysteroscopy for the application of stallion frozen semen in commercial programmes. Havemeyer Foundation. Monograph Series No 12-Transporting Gametes and Embryos, 81- 82.
- Buchanan B., Seidel G.E., McCue P.M., Schenk J.L., Herickhoff L., Squires E., 2000. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. Theriogenology 53, 1333 -1344.
- Govaere M., Hoogewijs C., Schauwer D., Vlieghe S., Duchateau L., Kruijff A., 2007. Effect of artificial insemination protocol and sperm dose on pregnancy results in mares. Theriogenology 68, 505-505.
- Lindsey A., Schenk J., Graham J., 2002. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. Equine Veterinary Journal 34, 121-127.
- Lindsey A., Varner S., Bruemmer J., Squires E., 2005. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 °C or 15 °C prior to flow-cytometric sorting. Animal Reproduction Science 85, 125-130.
- McCue P., Fleury J., Denniston D., Graham J.K., Squires E., 2000. Oviductal insemination of mares. Journal Reproduction Fertilization Supply 56, 499-502.
- Mina C., Morel D., 1999. Advantages and disadvantages of Artificial Insemination. Equine Artificial Insemination. pp. 2-8. Wallingford: CABI Publishing.
- Morris L., Hunter R., Allen W., 2000. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. Journal Reproduction Fertility 18, 95-100.
- Nie K., Johnson J., Wenzel J., 2003. Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex filtration, Percoll separation or absolute number. Animal Reproduction Science 79, 103-109.
- Peterson M., Wessel E., Scott M., Liu I., Ball B., 2002. Embryo recovery rate in mares after deep intrauterine insemination with low number of cryopreserved equine spermatozoa. Theriogenology 58, 663-665.
- Pinto M., Alonso A., Gambarotta M., Miragaya M., 2002. Obtención de preñeces en equinos por primo-inseminación utilizando semen congelado-descongelado a dosis mínima. Revista de Bioestadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina 39, 26-29.
- Pinto M., Burns P., 2004. Effects of long acting estradiol 17 vs. ECP on serum concentrations of estradiol 17 in mares. In Press Proceed. World Equine Embryo Transfer Meetings, Rio de Janeiro, Brasil.

- Rigby S., Lindsey A., Brinsko S., 2001. Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or rectally-guided utero-tubal insemination with low sperm numbers. Proc. 3rd International Symposium on Stallion Reproduction, 49.
- Samper J.C., Sánchez R., Gómez I., Leite B., 2005. Artificial insemination with frozen semen: Pregnancy rates after rectally guided or endoscopic deposition in: 51th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners AAEP. Seattle WA Ithaca. USA 125, 30 - 45.
- Samper J.C., Sanchez R., Gómez I., Leite, B., 2006. Artificial Insemination with Frozen Semen: Pregnancy Rates After Rectally Guided or Endoscopic Deposition. AAEP Proceeding 51, 20-35.
- Sieme H., Schäfer T., Stout T., 2003. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. *Theriogenology* 60, 1153 - 1164.
- Sieme H., Bonk A., Hamann H., Klug E., Katila T., 2004. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology* 62, 15-28
- Squires E., Barbacini S., Necchi D., Reger H., Bruemmer J., 2003. Simplified Strategy for Insemination of Mares with Frozen Semen. 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, Louisiana, USA.
- Terttu K., 2005. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. *Animal Reproduction Science* 89, 31–38.