



## AGENTES ANTIMICROBIANOS NO DILUENTE DE SÊMEN EQUÍNO E SEUS EFEITOS NA MOTILIDADE, NA MEMBRANA ACROSSÔMICA E NAS TAXAS DE PRENHEZ\*

ANTIMICROBIAL AGENTS IN EQUINE SEMEN EXTENDER AND ITS EFFECT ON SEMEN  
CHARACTERISTICS AND ON PREGNANCY RATES

MAGDA JOCHIMS VIEIRA<sup>1</sup>, ANA LUIZA GELPI MATTOS<sup>2</sup>, EDUARDO MALSCHITZKY<sup>1</sup>,  
PETRA GARBADE<sup>3</sup>, RICARDO MACEDO GREGORY<sup>3</sup> & RODRIGO COSTA MATTOS<sup>3</sup>

### RESUMO

Para diminuir a contaminação bacteriana do sêmen é prática corrente a adição de antimicrobianos aos diluentes. O experimento objetivou verificar o efeito de antimicrobianos ao diluente de sêmen através da avaliação da motilidade progressiva e total, do percentual de integridade da membrana plasmática e da fertilidade de éguas inseminadas. As amostras (Cinquenta e nove ejaculados de seis garanhões) foram diluídas em (a) leite desnatado (LD), (b) leite desnatado + 50 µg/mL de sulfato de gentamicina + 50 UI/mL de penicilina (LDGP) e (c) leite desnatado + 1000 µg/mL de sulfato de ampicilina + 1000 UI/mL de penicilina (LDAP). O sêmen diluído foi resfriado a +4°C e armazenado por até 72 horas previamente ao uso, sendo avaliado em 24, 48 e 72 horas quanto à motilidade e à integridade de membrana (CFDA). Para as inseminações, foram utilizados 11 garanhões e 189 éguas, totalizando 225 ciclos estrais. As éguas foram inseminadas com alíquotas de 500x10<sup>6</sup> espermatozoides com movimento progressivo. Os ejaculados diluídos com LD e LDGP apresentaram os melhores índices de avaliação espermática, diferindo significativamente do LDAP (p<0,05). Não se observaram diferenças significativas (p<0,05) entre os diluentes quanto aos índices de prenhez aos 14 e aos 42 dias. A adição de doses elevadas de antimicrobianos afeta a motilidade e a membrana acrossômica, quando o sêmen é preservado a +4°C por até 72 horas. Entretanto, doses inseminantes com no máximo 500 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e contendo antimicrobianos não afetam os índices de prenhez quando utilizados até uma hora após a coleta.

**Descritores:** agentes antimicrobianos, sêmen equino, fertilidade.

### ABSTRACT

Antimicrobial agents are currently added to semen extenders in order to prevent or minimize bacterial contamination of the female genital tract. The aim of this experiment was to determine the effect of the supplementation of antimicrobial drugs to the equine semen extender on motility, acrosome integrity, and pregnancy rate after artificial insemination of mares. Fifty-nine ejaculates from six stallions were extended in (a) skim milk (LD), (b) skim milk +50 µg/mL gentamicin sulfate and 50 UI/mL penicillin (LDGP), and (c) skim milk +1,000 µg/mL ampicillin sulfate and 1,000 UI/mL penicillin (LDAP). Extended semen were cooled to 4°C and stored for up to 72 hours before insemination, with the evaluation of progressive and total motility, and membrane integrity (CFDA) being conducted at 24, 48 and 72 h. Semen doses from 11 stallions containing 500 x 10<sup>6</sup> sperm cells with progressive motility were used to inseminate 189 mares in 225 reproductive cycles. Higher rates of motility and membrane integrity were observed after semen dilution in LD and LDGP extenders, differing significantly from LDAP (P<0.05). No significant differences were observed between extenders regarding pregnancy rates on Days 14 and 42 after insemination. There was a significant detrimental effect of antimicrobial agents on the sperm motility and acrosome integrity of equine semen refrigerated to 4°C for up to 72 h. However, inseminating doses containing at least 500 x 10<sup>6</sup> sperm/mL, and supplemented with antimicrobial agents, did not affect pregnancy rates when used within one hour following semen collection.

**Key words:** antimicrobial agents, equine semen, fertility.

\* Artigo originado da Tese de Doutorado do primeiro autor. Pesquisa financiada pela FAPERGS. <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). <sup>2</sup>Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). <sup>3</sup>REPROLAB, Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária (FAVET)-UFRGS.

CORRESPONDÊNCIA: R.C. Mattos [e-mail: remattos@vortex.ufrgs.com.br ; FAX: +55 33167305]. REPROLAB, FAVET-UFRGS. Caixa Postal 15094; C.E.P. 91501-970, Porto Alegre, RS - Brasil.

## INTRODUÇÃO

As bactérias originadas principalmente das criptas do pênis e das pregas do prepúcio estão comumente presentes no ejaculado de garanhões [10,17], sendo responsáveis pela contaminação bacteriana do útero [4,9]. Para reduzir a contaminação bacteriana do sêmen, é prática corrente adicionar agentes antimicrobianos aos diluentes de sêmen [3,7]. Esta redução poderia ser especialmente útil nos casos de éguas susceptíveis à endometrite, pois dessa forma o risco de infecção uterina seria minimizada, com conseqüente aumento das chances de prenhez [13]. Entretanto, alguns desses agentes antimicrobianos causam efeitos negativos na motilidade e na sobrevivência espermática [2,3,8,13,19,21], efeitos estes que podem ser acentuados pela exposição prolongada dos espermatozoides a esses agentes antimicrobianos quando o sêmen é resfriado [8]. O presente experimento objetivou verificar o efeito da adição de agentes antimicrobianos ao diluente de sêmen eqüino, utilizando-se como critérios de avaliação a motilidade progressiva e total e o percentual de integridade de membrana plasmática e a fertilidade de éguas inseminadas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Experimento 1

Foram utilizados 59 ejaculados de 6 garanhões comprovadamente férteis e em atividade sexual, com idades variando entre 6 e 14 anos. Após cada coleta, o sêmen foi avaliado quanto ao aspecto, volume, motilidade, concentração e morfologia espermática, sendo realizado o teste de integridade da membrana plasmática. Três diluentes foram testados: leite em pó desnatado reconstituído com água bidestilada a 10% (270 a 350 mOsm/L) (LD) [13]; leite em pó desnatado acrescido de 50µg/mL de sulfato de gentamicina e 50 UI/mL de penicilina (270 a 300 mOsm/L) (LDGP) [3] e leite em pó desnatado acrescido de 1000µg/mL de sulfato de amicacina e 1000UI/mL de penicilina (280 a 310mOsm/L) (LDAP) [18]. Os diluentes foram preparados com antecedência. O pH foi ajustado entre 6,7 e 7,2, sendo os diluentes mantidos em temperatura

de -20°C, até o momento da coleta. O descongelamento foi feito em banho-maria a +37°C. Para cada ejaculado, determinado volume de sêmen foi adicionado a cada um dos diluentes, de maneira a se alcançar uma concentração final de 25 a 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e uma diluição superior a 1:3. O volume final da amostra ficou entre 7 e 9mL, sendo que o resfriamento das amostras a +4°C foi realizado imediatamente após a primeira avaliação da motilidade, utilizando-se uma curva de resfriamento de 0,3°C/minuto entre as temperaturas críticas de +20°C e +8°C. Nas 24, 48 e 72h posteriores à diluição, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade progressiva e total, e integridade da membrana plasmática através da coloração diacetato 6-carboxifluoresceína (6-CFDA), em microscópio de fluorescência [11].

### Experimento 2

Para as inseminações e avaliação do índice de gestação foram utilizados 225 ciclos estrais de 189 éguas e 11 garanhões com fertilidade comprovada e idade variando entre 6 e 18 anos. As éguas foram divididas em três grupos, de acordo com o *status* reprodutivo: éguas virgens (37 ciclos), falhadas (64 ciclos) e lactantes (124 ciclos), com idade variando entre 4 e 24 anos. As éguas com demonstrações externas de cio foram submetidas a exames do aparelho reprodutor por palpação retal e ultra-sonografia. Estes exames foram realizados com intervalos máximos de 48 horas, avaliando-se, em cada exame, além do crescimento folicular, o grau de edema uterino. As éguas recém-paridas foram examinadas a partir do 5.º dia pós-parto. As inseminações foram realizadas assim que as éguas apresentaram um folículo pré-ovulatório (diâmetro > 40mm), associado à redução do grau de edema uterino. As inseminações eram realizadas em até 1 hora após a coleta do sêmen e repetidas, quando necessário, a cada 48 horas, até a detecção da ovulação, sempre utilizando, para cada ciclo, um único tratamento. Dentro de cada categoria, as éguas foram designadas ao acaso para cada um dos três tratamentos: LD- inseminação artificial com sêmen diluído em leite em pó desnatado; LDGP- inseminação artificial com sêmen diluído em leite em pó desnatado acrescido de 50µg/ml de sulfato de gentamicina e 50UI/mL de penicilina; LDGP- inseminação artificial com sêmen diluído em leite em pó

desnatado acrescido de 1000µg/mL de sulfato de ampicacina e 1000 UI/mL de penicilina.

Os diagnósticos de gestação foram realizados entre o 12.º e 14.º dia após a detecção da ovulação. As éguas diagnosticadas como vazias foram, em alguns casos, utilizadas novamente e assignadas a um novo tratamento. Uma vez constatada a prenhez, eram realizados exames semanais até o 45.º dia de gestação. As gestações gemelares foram reduzidas manualmente até o 16.º dia. Não sendo possível a redução manual, utilizava-se a restrição alimentar, com acompanhamento em dias alternados, até a constatação da redução do número de embriões.

### Análise estatística

Para a análise dos dados, no experimento 1, foi utilizada a técnica de modelos mistos para medidas repetidas do programa estatístico SAS (versão 6.12). Foram considerados como efeitos fixos os diluentes e os tempos de observação (0, 24, 48, 72 horas) e sua interação. A comparação entre médias foi feita pelo procedimento LS MEANS (SAS versão 6.12). O nível de significância adotado foi de 0,05.

No experimento 2, os dados foram analisados pelo método de regressão logística, sendo as taxas de prenhez aos 14 e aos 42 dias e as taxas de morte

embrionária consideradas como variáveis dependentes. Como variáveis independentes foram considerados os tratamentos utilizados para a realização das inseminações artificiais e as categorias das éguas utilizadas no experimento (virgens, falhadas e lactantes). Para a seleção das variáveis a serem testadas no modelo foi utilizado o nível de significância de 0,25 [6]. No modelo final, foram consideradas como significativas as variáveis que apresentaram probabilidade igual ou menor que 0,05. Para a análise dos dados foi utilizado o programa Minitab for Windows, versão 11.1.

## RESULTADOS

Na avaliação da motilidade progressiva (Tabela 1) e total (Tabela 2) do sêmen em diferentes diluentes, observou-se que amostras de sêmen diluídas com LD e com LDGP apresentaram melhor motilidade até as 72 horas de armazenamento. O sêmen diluído em LDAP, na primeira hora de observação, não apresentou diferença significativa na motilidade total em relação aos diluentes LD e LDGP, mas, na avaliação da motilidade progressiva, verificou-se diferença significativa entre eles ( $p < 0,05$ ). Nas demais avaliações (24, 48 e 72 horas), o diluente LDAP diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos diluentes LD, LDGP.

**Tabela 1.** Porcentuais de motilidade progressiva (média ± desvio padrão) de sêmen equino submetido a resfriamento a + 4°C nos diferentes tempos e tratamentos.

Diluyente	Tempo(h)			
	0	24	48	72
LD	54,8 <sup>a</sup> ± 6,8	33,8 <sup>a</sup> ± 12,1	20,8 <sup>a</sup> ± 11,3	11,6 <sup>a</sup> ± 8,4
LDGP	55,0 <sup>a</sup> ± 7,6	32,7 <sup>a</sup> ± 11,1	18,7 <sup>a</sup> ± 10,1	10,1 <sup>a</sup> ± 7,2
LDAP	51,3 <sup>b</sup> ± 8,3	24,4 <sup>b</sup> ± 11,2	8,6 <sup>b</sup> ± 7,3	2,8 <sup>b</sup> ± 3,9

(letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas,  $p < 0,005$ ).

LD (leite desnatado); LDGP (leite desnatado + sulfato de gentamicina + penicilina); LDAP (leite desnatado + sulfato de ampicacina + penicilina)

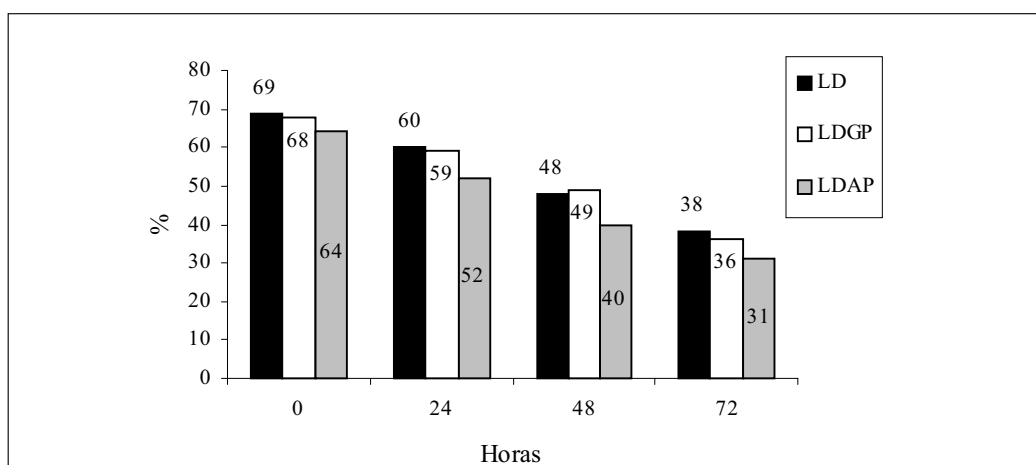
**Tabela 2.** Porcentuais de motilidade total (média  $\pm$  desvio padrão) de sêmen eqüino resfriado a + 4°C nos diferentes tempos e tratamentos.

Diluyente	Tempo(h)			
	0	24	48	72
LD	77,1 <sup>a</sup> $\pm$ 5,1	56,8 <sup>a</sup> $\pm$ 14,3	37,7 <sup>a</sup> $\pm$ 17,3	24,1 <sup>a</sup> $\pm$ 13,9
LDGP	77,7 <sup>a</sup> $\pm$ 4,	56,0 <sup>a</sup> $\pm$ 13,2	39,0 <sup>a</sup> $\pm$ 14,6	25,5 <sup>a</sup> $\pm$ 12,4
LDAP	73,9 <sup>a</sup> $\pm$ 5,2	39,7 <sup>b</sup> $\pm$ 16,4	16,8 <sup>b</sup> $\pm$ 9,6	8,1 <sup>b</sup> $\pm$ 5,6

(letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas,  $p < 0,005$ ).

LD (leite desnatado); LDGP (leite desnatado + sulfato de gentamicina + penicilina); LDAP (leite desnatado + sulfato de amicacina + penicilina)

Na Figura 1, observa-se que as amostras de sêmen diluídas em LD e LDGP apresentaram maior integridade de membrana até as 72 horas, não ocorrendo diferença significativa entre elas ( $p > 0,05$ ). Já, utilizando o diluyente LDAP, houve porcentuais significativamente mais baixos de integridade de membrana, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos demais diluyentes até as 72 horas de observação.



**Figura 1.** Porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra com os diferentes diluyentes e tempos de armazenamento. LD (leite desnatado); LDGP (leite desnatado + sulfato de gentamicina + penicilina); LDAP (leite desnatado + sulfato de amicacina + penicilina).

Analisando-se os índices de fertilidade por ciclo obtidos com o sêmen fresco diluído, independentemente dos tratamentos utilizados, verificou-se que não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as distintas categorias de éguas. O índices foram de 70% para éguas virgens, de 63 % para falhadas e de 69% para lactantes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Taxas de prenhez aos 14 dias em éguas virgens, falhadas e lactantes submetidas a diferentes tratamentos.

Tratamentos	Virgens			Falhadas			Lactantes		
	Total	n	%	Total	n	%	Total	n	%
LD	13	7	54	24	13	54	52	33	63
LDGP	12	10	83	21	14	67	41	29	71
LDAP	12	9	75	19	13	68	31	24	77
<b>TOTAL</b>	37	26 <sup>a</sup>	70	64	40 <sup>a</sup>	63	124	86 <sup>a</sup>	69

(p>0,05) letras iguais na mesma linha representam ausência de diferenças significativas

LD (leite desnatado); LDGP (leite desnatado + sulfato de gentamicina + penicilina); LDAP (leite desnatado + sulfato de ampicacina + penicilina)

Da mesma forma, os índices de fertilidade destas éguas inseminadas com amostras de sêmen diluídas em diluente LD, LDGP e LDAP não diferiram significativamente (p<0,05)(Tabela 4).

**Tabela 4.** Taxas de prenhez e morte embrionária aos 14 dias e aos 42 dias em 225 ciclos de éguas submetidas a diferentes tratamentos.

Diluentes	Total	14 dias		42 dias		M.E. %
		Prenhez		Prenhez		
		n	%	n	%	
LD	89	53 <sup>a</sup>	60	44 <sup>a</sup>	49	17 <sup>a</sup>
LDGP	74	53 <sup>a</sup>	72	45 <sup>a</sup>	61	15 <sup>a</sup>
LDAP	62	46 <sup>a</sup>	74	35 <sup>a</sup>	56	24 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	225	152	68	124	55	56

(p>0,05) letras iguais na mesma linha representam ausência de diferenças significativas

LD (leite desnatado); LDGP (leite desnatado + sulfato de gentamicina + penicilina); LDAP (leite desnatado + sulfato de ampicacina + penicilina)

O histórico de endometrite e de endometrite persistente pós-cobertura influenciaram desfavoravelmente os índices de prenhez de éguas falhadas (p=0,001 e p= 0,041, respectivamente). No entanto, estes não foram influenciados pela presença dos antimicrobianos no diluente (p>0,143).

O histórico de morte embrionária e a presença de líquido após a ovulação influenciaram desfavoravelmente os índices de prenhez de éguas no cio do potro (p=0,037 e p=0,008, respectivamente). No entanto, não houve influência da presença de antimicrobianos nos diluentes utilizados quanto aos parâmetros avaliados (p>0,086).

## DISCUSSÃO

A adição de agentes antimicrobianos ao sêmen não influenciou a motilidade e a integridade de membrana logo após a diluição. No entanto, observa-se, a partir da 24.º hora de armazenamento, uma queda significativa de motilidade e um aumento dos danos a membrana plasmática nos espermatozoides diluídos em LDAP, quando comparado aos diluentes LD e LDGP. Os danos observados nos espermatozoides ao se utilizar LDAP devem-se, provavelmente, aos efeitos nocivos dos agentes antimicrobianos ou das dosagens utilizadas, promovendo um envelhecimento espermático precoce,

bem como ao longo tempo de exposição aos agentes [8], contrariando observação anterior. [20].

O índices de prenhez nas três categorias de éguas foram superiores as descritas na literatura em éguas de diferentes *status* reprodutivos [5,12]. Da mesma forma, os índices de fertilidade destas éguas inseminadas com amostras de sêmen diluídas em LD, LDGP e LDAP não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ) entre si, confirmando os resultados obtidos de motilidade e de integridade de membrana plasmática logo após a diluição.

Apesar do intervalo inseminação-ovulação ter sido de no máximo 48 horas, era esperado que as perdas de motilidade e da integridade da membrana plasmática, encontradas *in vitro* no sêmen diluído em LDAP, se expressassem nos índices de fertilidade, o que não ocorreu. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores [16,22], que não encontraram diferenças nas taxas de prenhez de inseminações realizadas com sêmen fresco, em intervalos de 24, 48 ou 72 horas anteriores à ovulação.

Uma das hipóteses para a ausência de variação significativa nos índices de fertilidade seria o alto percentual de espermatozoides viáveis presentes na dose inseminante (60 a 80 %), com um número suficiente de espermatozoides com motilidade progressiva ( $500 \times 10^6/\text{mL}$ ), o que possibilitou bons índices de prenhez, mesmo que as ovulações ocorressem num período de até 48 horas após a inseminação. Mesmo sabendo que a capacidade de fertilização encontrava-se reduzida devido, parcialmente, a uma diminuição da motilidade e acarretando um aumento da mortalidade embrionária [1], as éguas que levassem mais tempo para ovular ainda poderiam ter um número suficiente de espermatozoides viáveis, com boas chances de fertilização. Isto, provavelmente, se deva ao fato de as alterações físico-químicas apresentadas pelo espermatozoide no interior do útero e das trompas serem menores que aquelas ocorridas quando estes são armazenados a baixas temperaturas. Da mesma forma, a utilização da inseminação artificial, em vez da monta natural, deve ter contribuído para a ausência de diferenças de taxas de prenhez obtidas com os diferentes diluentes. A utilização da inseminação permite alcançar melhores índices de prenhez que a

monta natural, devido a uma menor reação inflamatória do endométrio, melhorando, conseqüentemente, as condições uterinas para receber o conceito [14,15].

A adição de agentes antimicrobianos não melhorou os índices de prenhez de éguas falhadas que apresentavam histórico de endometrite e de endometrite persistente pós-cobertura, nem de éguas no cio do potro com líquido após a ovulação, não havendo influência dos agentes antimicrobianos na dose inseminante sobre o controle bacteriano e a limpeza uterina.

## CONCLUSÕES

A adição de doses elevadas de antimicrobianos ao diluente de sêmen equino afeta a motilidade e membrana acrossômica, quando o sêmen é preservado a  $+4^\circ\text{C}$  por até 72 horas.

Não foi possível detectar efeito da adição de antimicrobianos ao diluente leite desnatado, sobre os índices de prenhez de éguas virgens, vazias e lactantes, quando o sêmen foi utilizado até uma hora após a coleta contendo uma dose inseminante no mínimo de  $500 \times 10^6/\text{mL}$  de espermatozoides com motilidade progressiva.

## AGRADECIMENTO

À FAPERGS, pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- 1 Amann R.P. & Graham J.K. 1993. Spermatozoal function. In: Mckinnon A.O. & Voss J.L.(Eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp. 715-745.
- 2 Back D.G., Pickett B.W., Voss, J.L. & Seidel J.L. 1975. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. *Journal of Animal Science*. 41:137-143.
- 3 Clément F., Vindament M. & Guérin B. 1995. Microbial contamination of stallion semen. *Biology of Reproduction*. 1: 779-786.
- 4 Dimmock W.W. 1939. Equine breeding hygiene. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 94: 469-478.

- 5 **Ginther O.J. 1992.** *Reproductive biology of the mare: Basics and Applied Aspects*. 2nd edn. Cross Plains: Equiservices Publishing, 642 p.
- 6 **Hosmer D.W. & Lemeshow S. 1989.** *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons, 307p.
- 7 **Hughes J.P. & Loy R.G. 1970.** Artificial insemination in the equine. A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. *Cornell Veterinarian*. 60: 463-475.
- 8 **Jasko D.J., Bedford S.J., Cook N.L., Mumford E.L., Squires E.L. & Pickett B.W. 1993.** Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 40: 885-893.
- 9 **Kenney R.M., Bergman R.V., Cooper W.L. & Morse G.W. 1975.** Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: *21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - Appendix I: Broodmare Problems and Management Panel* (Boston, U.S.A.). pp. 327-336.
- 10 **Kenney R.M., Hurtgen J., Pierson R., Witherspoon D. & Simons J. 1983.** The Society Manual for Fertility Evaluation of the Stallion. In: *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology* (Nashville, U.S.A.). pp.155-161.
- 11 **Kneissl S. 1993.** Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluss der Samen-entnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. 97p. Hannover, Deutschland. Inaugural dissertation - Doctor Medicinæ Veterinariae. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 12 **Malschitzky E. 1998.** Efeito de diferentes tratamentos pós cobertura na fertilidade de éguas Puro Sangue de Corrida. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 13 **Mattos R. 1995.** Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. 144f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 14 **Mattos R.C., Cavalheiro E.P., Mattos R. & Gregory R.M. 1996.** Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco em éguas árabes. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 24: 57-64.
- 15 **Mattos R.C., Meirelles L.S., Malschitzky E., Castilho L.F.F., Neves A.P., Mattos A.L.G., Vieira M.J., Keller A., Hött A.C. & Gregoty R.M. 1999.** Oxitocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse. *Pferdeheilkunde*. 15:584-587.
- 16 **Palmer E. 1984.** L'insémination artificielle des juments: bilan de 5 années de recherche et d'utilisation pratique. In: Jarrige R. & Martin - Rosset W. (Eds). *Le Cheval. Reproduction, Sélection, Alimentation Exploitation*. Paris: INRA, pp.133-147.
- 17 **Tischner M. & Kosiniak K. 1986.** Bacteriological contamination of stallion semen collected by open artificial vaginas. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 55:90-94.
- 18 **Varner D.D., McInthosh D.W., Forrest T.L., Blanchard T.L. & Johnson N, L. 1992.** Potassium penicillin G, amikacin sulfate, or a combination in seminal extender for stallions: Effects on spermatozoal motility. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal reproduction* (The Hague, The Netherlands). pp.1496-1501.
- 19 **Varner D.D., Scanland C.M.; Thompson J.A ; Brumbaugh, Blanchard T.L., Carlton C.M. & Johnson L. 1996.** Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Symposium on Stallion Semen: Production, Evaluation and Preservation*. (Amersfoort, The Netherlands). pp. 23-24.
- 20 **Varner D.D., Scanlan C.M., Thompson J.A., Brumbaugh G.W., Blanchard T.L., Carlton C.M. & Johnson L. 1998.** Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 50: 559-573.
- 21 **Varner D.D., Shumacher J., Blanchard T.L. & Johnson L. 1991.** Breeding soundness examination. In: Varner D. D., Shumacher J., Blanchard T.L. & Johnson L. (Eds). *Diseases and management of the breeding stallions*. American Veterinary Publication, pp. 97-116.
- 22 **Woods J., Bergfelt D.R & Ginther O.J. 1990.** Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss in mares. *Equine Veterinary Journal*. 22: 410.



