



**INSTITUTO POLITÉCNICO
DE BRAGANÇA**

Escola Superior Agrária

**Antecipação da Estação Reprodutiva em Ovelhas da Raça
Churra Galega Bragançana.
Inseminação Artificial**

Sofia Mónica Fernandes

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção
do Grau de Mestre em Tecnologias Animais*

Orientada por:

**Ramiro Valentim
Teresa Montenegro**

**Bragança
2008**

Dedicatória

Aos meus pais por tudo o que representam

Agradecimentos

Agradeço às pessoas que directa ou indirectamente prestaram a sua colaboração, que me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao Professor Doutor Ramiro Valentim, como Orientador Científico, por toda amizade, paciência, colaboração e auxílio, não só referente ao delineamento experimental deste trabalho, mas também na concretização da sua componente prática, bem como ao seu importante contributo científico, sem o qual não teria sido possível a execução do mesmo.

À Professora Doutora Teresa Montenegro, como Co-Orientadora Científica deste trabalho, por todo o seu auxílio, nomeadamente na realização da componente prática desta tese.

A todos os professores da ESAB, que me acompanharam ao longo do curso, pelos conhecimentos que me transmitiram, contribuindo assim para a minha formação escolar.

A todas as pessoas que trabalham na Quinta de Santa Apolónia e que contribuíram para a execução deste trabalho, nomeadamente o Sr. Luís Paulos por toda a sua boa vontade, disponibilidade, paciência e amizade.

A todos os meus Amigos, que sempre me acompanharam ao longo destes 7 anos em Bragança, por todos os bons momentos que passamos juntos e por nunca me deixarem desistir.

Finalizando os agradecimentos, e porque os últimos são sempre os primeiros, dirijo um especial obrigado aos meus pais, pois sem eles não conseguiria atingir esta importante etapa da minha vida.

A todos o meu sincero Obrigada!

Resumo

Este ensaio foi realizado com o intuito de comparar a eficácia de dois tratamentos hormonais distintos na antecipação da estação reprodutiva – progestagénios + eCG (Grupo Controlo) vs. melatonina + progestagénios + eCG (Grupo Melatonina) –, em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Por outro lado, procurou-se avaliar a aplicabilidade da técnica de inseminação artificial (IA) cervical às ovelhas desta raça.

A rentabilidade das explorações ovinas é fortemente condicionada pela sazonalidade reprodutiva. Conhecer os mecanismos fisiológicos subjacentes a esta mesma sazonalidade reprodutiva e saber manipular os factores hormonais e/ou comportamentais capazes de contrapor os seus efeitos negativos é algo particularmente importante. Por outro lado, a escolha da técnica da inseminação artificial, com o intuito de melhorar a gestão produtiva e reprodutiva dos efectivos, deve ter em conta os objectivos a alcançar e a realidade técnica de cada exploração.

Na componente experimental deste trabalho foram utilizadas todas as ovelhas do rebanho ovino da ESAB, ou seja, um total de 69 ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. No início do mês de Março, 36 destas ovelhas receberam um implante subcutâneo de melatonina (18 mg). Sessenta e cinco dias depois, todas as ovelhas (n = 36) foram tratadas com esponjas vaginais, impregnadas com Acetato de Fluorogestona (20 mg). Doze dias mais tarde, aquando da remoção das esponjas vaginais, as ovelhas foram injectadas, intramuscularmente, com 500 UI de Gonadotropina Coriónica equina. Posteriormente, 20 ovelhas (10 – Grupo Controlo vs. 10 – Grupo Melatonina) foram sujeitas a inseminação artificial cervical. As restantes 49 ovelhas foram beneficiadas por monta natural. Todas as ovelhas foram sujeitas a diagnóstico de gestação, por ultrasonografia, 45 dias depois da realização da inseminação artificial.

Nos finais do Inverno, 89,7% das ovelhas Churras Bragançanas estudadas estavam em anestro sazonal. O tratamento com melatonina exógena determinou, relativamente ao tratamento clássico com progestagénios, um aumento das percentagens de ovelhas que manifestaram cio e que ovularam. Setenta e seis por cento das ovelhas cobertas por monta natural e 55,0% das inseminadas artificialmente ficaram gestantes.

Abstract

The main aim of this study was to assess the efficiency of two hormonal treatments – progestagens + eCG *vs.* melatonin + progestagens + eCG – to anticipate the breeding season in a group of Churra Galega Bragançana ewes. Cervical artificial insemination (AI) effectiveness was also evaluated.

By the end of the winter, 89.7% of Churra Galega Bragançana ewes were in seasonal anoestrous. Melatonin treatment induced higher rates of ovulation and ewes in estrus than traditional progestagens treatment. Natural mounting determined a fertility rate of 76.0% while cervical AI originated a fertility rate of 55.0%.

Índice Geral

I Introdução	1
II Revisão Bibliográfica	3
1 Fisiologia Reprodutiva da Ovelha	3
1.1 Ciclo Éstrico	3
1.1.1 Endocrinologia do Ciclo Éstrico	3
2 Sazonalidade Reprodutiva	5
3 Controlo da Actividade Ovária	7
3.1 Sincronização de Cios	7
3.1.1 Utilização de Progestagénios.....	7
3.1.2 Utilização de Prostaglandinas F _{2α}	9
3.1.3 Utilização de Progestagénios e de PGF _{2α}	10
3.2 Indução da Ovulação	10
3.3 Melatonina	12
4 Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes	14
4.1 Vantagens e Inconvenientes da Inseminação Artificial.....	14
4.2 Técnicas de IA	18
4.2.1 Inseminação Cervical	19
4.3 Momento Óptimo para a Inseminação.....	20
III Procedimento Experimental	22
1 Material e Métodos	22
1.1 Animais.....	22
1.2 Avaliação da Ciclicidade Inicial das Ovelhas	22
1.3 Pesagem e Determinação da Condição Corporal	23
1.4 Tratamentos Aplicados	23

1.5 Detecção dos Cios	23
1.6 Diagnóstico de Gestação	24
1.7 Análise Estatística	24
2 Resultados e Discussão.....	24
2.1 Cios.....	25
2.2 Diagnóstico de Gestação	25
3 Conclusões.....	27
IV Referências Bibliográficas	28

Índice de Quadros

QUADRO I – Valores máximos e mínimos da idade, do peso e da condição corporal das ovelhas estudadas	24
QUADRO II – Percentagem de ovelhas que apresentaram cio, tendo em conta o tratamento e o tipo de beneficiação aplicado.....	25
QUADRO III – Percentagem de ovelhas gestantes, tendo em conta o tratamento e o tipo de beneficiação aplicado.....	26

I Introdução

A ovinicultura é uma das actividades pecuárias com maior tradição e representatividade no nosso País. O sistema de exploração tradicional, em regime extensivo, tem vindo a ser, nos últimos anos, gradualmente substituído por um regime mais moderno, com recurso à suplementação alimentar em épocas de carência e à utilização de pastagens melhoradas. A utilização de raças autóctones, melhor adaptadas ao meio ambiente local, com capacidades produtivas e reprodutivas superiores às das raças exóticas, nas condições edafo-climáticas locais, constitui, frequentemente, uma importante actividade de subsistência para as populações rurais que as exploram (Bettencourt, 1999).

Apesar dos ovinos serem considerados como reprodutores de “dias curtos” (Yeates, 1949; citado por Bettencourt, 1999), em Portugal, devido a condicionamentos de mercado, a maioria dos produtores utiliza, preferencialmente, como época de cobrição a Primavera-Verão. Embora uma percentagem significativa de ovelhas se encontre acíclica nesta época do ano (Bettencourt, 1988; citado por Bettencourt, 1999), a sazonalidade das ovelhas autóctones não é tão marcada como a das ovelhas originárias de outros países, localizados a latitudes mais elevadas. A aplicação de técnicas, como o “efeito macho” (Bettencourt, 1988; Correia *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 1997; Matos *et al.*, 1997; Correia *et al.*, 1998; Correia *et al.*, 1999; Correia *et al.*, 2007) ou o uso de tratamentos hormonais (Azevedo *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2003), permite contrariar muito satisfatoriamente a sazonalidade das nossas ovelhas e alcançar boas taxas de fertilidade aparente. Do ponto de vista produtivo, a utilização desta época de cobrição assume particular importância, tendo em vista, para além da obtenção de borregos no período do Natal, a produção de leite destinada à elaboração de queijo, cujo fabrico artesanal se restringe, fundamentalmente, aos meses de Outono e de Inverno. A época de cobrição de Outono é, geralmente, utilizada para o efectivo de substituição e para as fêmeas que não ficaram gestantes na Primavera.

Segundo Hafez *et al.* (2004), a inseminação artificial (IA) é a técnica reprodutiva singular mais importante no Melhoramento Genético Animal, já que com o sêmen de alguns reprodutores seleccionados é possível beneficiar milhares de fêmeas por ano. A documentação mais antiga, relativa ao uso da IA, data de 1780, quando um fisiologista italiano Spallanzani conseguiu, através da aplicação desta técnica, o nascimento de

alguns cachorros. Porém, só a partir de 1900, na Rússia, foram desenvolvidos estudos sistemáticos sobre a sua utilização em animais domesticados.

A IA perfila-se, efectivamente, como uma técnica reprodutiva indispensável, quer em programas de melhoramento genético (Foulley *et al.*, 1990; citados por Bettencourt, 1999), quer em programas de conservação *in situ* ou *ex situ* de espécies em riscos de extinção (Schulte-Coerne, 1992; citado por Bettencourt, 1999). Em Portugal, a IA em ovinos tem sido, até agora, usada apenas a título experimental e nalgumas explorações pontuais, contrastando com o que sucede noutros países, como por exemplo, em França, onde a maior parte dos efectivos são beneficiados com recurso a esta técnica (Perret *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Novos avanços, relativos à ultrapassagem do canal cervical e à melhor preservação do sémen recolhido, facilitarão, seguramente, uma maior vulgarização desta técnica em todo o mundo. Por outro lado, o contínuo desenvolvimento das técnicas MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*) e de reprodução assistida – FIV (fertilização *in vitro*), transferência nuclear, criopreservação de oócitos e de embriões e de transferência de embriões – desempenhará igualmente um papel importante na aplicabilidade destes programas.

Nos pequenos ruminantes, a IA só faz sentido se estiver associada a outra técnica reprodutiva – o controlo da actividade ovárica. Este pode ser conseguido com recurso à utilização de hormonas, a tratamentos luminosos e/ou a factores sociais (“efeito macho” e/ou “efeito fêmea”). Nos ovinos, as hormonas mais utilizadas no controlo da actividade ovárica são os progestagénios e as prostaglandinas $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). As gonadotropinas coriónicas – eCG (equina) e hCG (humana) – são usadas, dependendo da dose empregue, para garantirem a ovulação ou promoverem superovulações.

Nos ovinos, existem várias técnicas de IA: vaginal, cervical, transcervical e intra-uterina. Todas elas apresentam vantagens e desvantagens. Eventualmente, as mais repetíveis resultam em menores taxas de fertilidade e implicam a utilização de maiores doses seminais.

II Revisão Bibliográfica

1 Fisiologia Reprodutiva da Ovelha

1.1 Ciclo Éstrico

O ciclo éstrico é o intervalo de tempo que medeia entre o início de um cio e o do ciclo seguinte (Bearden e Fuquay, 1984; citados por Bettencourt, 1999). Na espécie ovina tem uma duração média de 16 a 17 dias (Hafez 1987; citado por Bettencourt, 1999) e divide-se em duas grandes fases: folicular (2 a 3 dias) e lútea (13 a 14 dias) (Karsch, 1984a; citado por Bettencourt, 1999). A fase folicular caracteriza-se pelo predomínio da acção dos folículos (estrogénios) e a fase lútea da acção do corpo lúteo (progesterona).

O cio ocorre no final da fase folicular e a sua duração varia entre 12-50 horas (Hafez, 1987; citado por Bettencourt, 1999). A ovulação ocorre no final do estro (24-30 horas após o seu início) (Hafez, 1987; citado por Bettencourt, 1999). A duração do cio varia com a raça, a idade, a localização geográfica e a ocorrência ou não de contacto com os machos. Nos ovinos, o único indicador seguro de cio é o reflexo de imobilidade, ou seja, a fêmea permanece quieta enquanto é montada pelo macho. Assim, na detecção do cio podem ser usados machos inteiros aventalados ou vasectomizados, munidos de arnês marcador (Bettencourt, 1999).

1.1.1 Endocrinologia do Ciclo Éstrico

O controlo do ciclo éstrico envolve uma sequência de alterações hormonais reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, que interactiva com o útero (Bearden e Fuquay, 1984; citados por Bettencourt, 1999). De acordo com os modelos elaborados por Karsch *et al.* (1984) e O'Callaghan *et al.* (1987), as secreções hipotalâmicas são controladas por estímulos externos – fotoperíodo, alimentação, condições climatéricas, factores sociais, entre outros – e estímulos internos – estado de saúde, secreção hormonal, entre outros. O sistema nervoso central (SNC) desempenha um papel fundamental no controlo da secreção de GnRH (*Gonadotrophin Releasing Hormone*) e, conseqüentemente, da ovulação, via terminações nervosas da eminência mediana. A secreção deste factor de libertação estimula a secreção das gonadotropinas – FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) e LH (*Luteinizing Hormone*) – a partir da hipófise anterior. Estas gonadotropinas são sintetizadas e armazenadas nas células basófilas da adenohipófise (Hutchinson, 1979; citado por Bettencourt, 1999), sendo posteriormente

libertadas, por exocitose, em resposta à estimulação promovida pela GnRH (Fawcett *et al.*, 1969; citados por Bettencourt, 1999).

Os estrogénios e a progesterona são as principais hormonas esteróides produzidas pelos ovários, pelo que assumem um papel fundamental na regulação do ciclo éstrico (Haresign *et al.*, 1983; citados por Bettencourt, 1999).

A resposta da adenohipófise à acção da GnRH varia em função do estado reprodutivo da ovelha, sendo esta mais elevada na proximidade do pico pré-ovulatório de LH (Reeves *et al.*, 1974; citados por Bettencourt, 1999) ou após tratamento prévio com estradiol (Haresign e Lamming, 1978; citados por Bettencourt, 1999). Pelo contrário, esta resposta é menor após exposição prolongada a progesterona (Jenking *et al.*, 1977; citados por Bettencourt, 1999).

Durante a fase folicular, o estradiol eleva a frequência de libertação de GnRH e, consequentemente, de LH. Gradualmente, aumentam as concentrações sanguíneas de LH (resultantes da elevação gradual da frequência e da amplitude de secreção desta hormona), promotoras do desenvolvimento folicular final e do pico pré-ovulatório de estrogénios (Karsch *et al.*, 1984; Haresign, 1985; citados por Bettencourt, 1999). Imediatamente antes do pico pré-ovulatório de LH, a frequência de libertação de LH é de cerca de 1 pulso cada 1-2 horas (Baird, 1978). O aumento dos níveis circulantes de estradiol, associado aos níveis basais de progesterona, resulta num efeito de retroacção positiva, a nível do eixo hipotálamo-hipofisário, indutor do pico pré-ovulatório de LH (e de FSH) e, subseqüentemente, da ovulação (nas 18-24 horas seguintes) (Downey, 1980; citado por Bettencourt, 1999). Durante a fase lútea os elevados níveis circulantes de progesterona, actuando a nível do hipotálamo, induzem uma diminuição da frequência de libertação de GnRH e, consequentemente, de LH (Karsch *et al.*, 1984; citados por Bettencourt, 1999). Por outro lado, nesta altura, os níveis basais de estrogénios reduzem a capacidade de resposta da hipófise anterior à acção da GnRH, determinando igualmente uma diminuição da síntese de gonadotropinas (Karsch *et al.*, 1984; citados por Bettencourt, 1999). Durante a fase lútea do ciclo éstrico, a frequência de libertação de LH é de 1 pulso cada 3 a 4 horas (Karsch *et al.*, 1984; citados por Bettencourt, 1999). Níveis basais de 0,1-2,0 ng/ml alternam com picos de 5,0-15,0 ng/ml, cada 30-45 minutos (Haresign *et al.*, 1983; citados por Bettencourt, 1999). A reduzida frequência de secreção de LH impede a ocorrência dos estágios finais de desenvolvimento folicular e, subseqüente, a ovulação.

No decurso da fase folicular, a secreção de FSH é inibida, em parte, devido à retroacção negativa exercida pelos estrogénios (Salamonsen *et al.*, 1973; McNeilly *et al.*, 1984; Goodman, 1988; citados por Bettencourt, 1999). A inibina, uma glicoproteína segregada pelos folículos, exerce igualmente uma retroacção negativa sobre a secreção de FSH (Clark, 1984; citado por Bettencourt, 1999). No momento do pico pré-ovulatório de LH, observa-se simultaneamente um pico de FSH (retroacção positiva), registando-se uma segunda elevação desta hormona 18-24 horas mais tarde (Salamonsen *et al.*, 1973; citados por Bettencourt, 1999).

Enquanto o processo de formação do corpo lúteo (CL) é semelhante nas várias espécies, existem diferenças consideráveis no que diz respeito aos mecanismos que promovem a sua manutenção e regressão. Na espécie ovina, o CL está sujeito, simultaneamente, a acções luteotróficas e luteolíticas (McCracken *et al.*, 1971; citados por Bettencourt, 1999). Enquanto a LH e a prolactina (PRL) promovem a manutenção da estrutura e da funcionalidade do corpo lúteo (CL), as $\text{PGF}_{2\alpha}$, de origem uterina, induz a sua luteólise (Denamur *et al.*, 1966; citados por Bettencourt, 1999).

As $\text{PGF}_{2\alpha}$ são produzidas pelo útero, entre o 12-14º dias do ciclo éstrico (McCracken *et al.*, 1971; citados por Bettencourt, 1999). O mecanismo exacto de controlo da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não é ainda totalmente conhecido, embora se saiba que nele estão envolvidos a progesterona e os estrogénios (CL e folículos em crescimento) e a oxitocina (hipotálamo e folículos em crescimento) (Silvia *et al.*, 1991; citados por Bettencourt, 1999). Nos ovinos, a administração de progesterona, durante a fase inicial do desenvolvimento lúteo, resulta na diminuição do tempo de vida do CL, possivelmente devido à produção precoce de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Ottobre *et al.*, 1980; citados por Bettencourt, 1999). O estradiol, actuando a nível do endométrio, eleva a formação de receptores de oxitocina e activa as enzimas necessárias à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Huslig *et al.*, 1979; Dey *et al.*, 1982; Hixon e Flint, 1987; citados por Bettencourt, 1999). Por seu turno, a oxitocina estimula a produção uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Flint *et al.*, 1990; citados por Bettencourt, 1999) e assegura a ocorrência da luteólise.

2 Sazonalidade Reprodutiva

Os ovinos, porque as cobrições têm lugar, maioritariamente, nos meses de Outono (altura do ano em que o fotoperíodo é decrescente) e conseqüentemente os partos ocorrem nos finais do Inverno-inícios da Primavera (Vijil, 1986, Goddard, 1991, Staples *et al.*, 1992, Williams e Helliwell, 1993, Gates *et al.*, 1998, Hileman *et al.*, 1998,

Gerlach e Aurich, 2000, Kaya *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003; citados por Valentim, 2004), dizem-se reprodutores de “dias curtos”. Desta forma, os partos coincidem com a estação do ano em que as condições climáticas e alimentares são mais favoráveis ao crescimento fetal final e à lactação (Malpaux *et al.*, 1988, Lopez Sebastian, 1989, Martin *et al.*, 1990, Lincoln, 1992, Matthews *et al.*, 1993, Thimonier, 1996, Malpaux *et al.*, 2001, Martin *et al.*, 2002, Thiéry *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003; citados por Valentim, 2004). Por outro lado, as crias nascem quando as condições alimentares e de temperatura são mais favoráveis ao seu crescimento pós-natal (Vijil, 1989, Martin *et al.*, 2002, Thiéry *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003; citados por Valentim, 2004).

As ovelhas são animais de ciclo poliéstrico sazonal. Nas regiões temperadas e polares, o fotoperíodo é o principal factor regulador da sazonalidade (Hafez, 1987; citado por Bettencourt, 1999). Assim, todas as raças ovinas originárias de latitudes superiores a 30° (Lincoln, 1992) ou 40° (Chemineau *et al.*, 1992; citados por Bettencourt, 1999), onde a amplitude de variação do fotoperíodo é elevada, apresentam variações sazonais na sua actividade reprodutiva (Ortavant *et al.*, 1985; citados por Bettencourt, 1999).

A estação reprodutiva caracteriza-se pela apresentação de ciclos éstricos “regulares” e a estação de anestro sazonal pela irregularidade destes mesmos ciclos ou pela completa inactividade sexual. A alimentação, o estado nutricional, as condições climáticas, a genética, a idade, o sexo e os factores sociais desempenham igualmente um papel importante na regulação da actividade reprodutiva e na profundidade do anestro sazonal (Sadlier, 1969, Martin *et al.*, 1990, Chemineau, 1992, Pérez *et al.*, 1998 e Martin *et al.*, 2002; citados por Valentim, 2004).

Durante a estação de anestro, a percentagem de ovelhas que ovulam é superior à percentagem de ovelhas que apresentam cio (Hulet *et al.*, 1974; Bettencourt, 1988; citados por Bettencourt, 1999). Mais, num estudo realizado na Austrália, com animais de raça Dorset Horn, verificou-se que, no início da estação reprodutiva, a percentagem de ovelhas que ovulam é superior à de ovelhas que manifestaram cio (Hall *et al.*, 1986; citados por Bettencourt, 1999). Exactamente o oposto foi registado no final da estação reprodutiva (Hall *et al.*, 1986; citados por Bettencourt, 1999). Ao que tudo indica, as ovulações “silenciosas” ocorrem devido à ausência prévia de elevados níveis circulantes de progesterona (Hunter *et al.*, 1971; Valentim *et al.*, 2006b), necessários à formação de receptores hormonais de estrogénios no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas e,

consequentemente, indispensáveis à manifestação de sinais detectáveis de cio (Senger, 2004; citado por Valentim *et al.*, 2006b).

3 Controlo da Actividade Ovária

Nas modernas explorações ovinas, o controlo da actividade reprodutiva constitui uma técnica de manejo fundamental, pois permite elevar a sua rentabilidade. Possibilita um melhor planeamento das seguintes actividades:

- Alimentação, conforme as disponibilidades alimentares e o estágio fisiológico das ovelhas (Valentim *et al.*, 2006b).
- Épocas de cobrição e de parição, segundo as variações anuais da procura do mercado e dos recursos de mão-de-obra (Valentim *et al.*, 2006b).
- Maneio sanitário, de acordo com as principais patologias locais, o estágio fisiológico das ovelhas e o momento da venda dos produtos finais (particularmente, de carne e/ou de leite). Deste modo, aumentam-se as taxas de fertilidade e de prolificidade, a produtividade do sistema (número de carcaças/número de ovelhas cobertas) e a obtenção de produtos de maior qualidade e homogeneidade (Valentim *et al.*, 2006b).

A resposta das ovelhas aos tratamentos é muito variável e depende de factores como: a raça, o indivíduo, a idade, a estação do ano, o manejo, o estado de lactação, o estado nutricional, o estado sanitário, o protocolo utilizado, as hormonas administradas, as doses empregues, o sistema de beneficiação adoptado (monta natural ou inseminação artificial), entre outros (Valentim *et al.*, 2006b).

Nos ovinos, o controlo da actividade ovária continua assente na utilização de progestagénios e/ou de PGF_{2α} e de gonadotropinas hipofisárias e/ou coriónicas. Novos métodos, baseados no uso combinado de outras hormonas como a GnRH (hormona gonadotrópica) e os estrogénios e/ou de agonistas da GnRH, continuam envoltos em controvérsia. Os custos e as exigências técnicas adstritas a estes novos métodos determinam que a sua aplicação esteja praticamente restrita a programas MOET (Valentim *et al.*, 2006b).

3.1 Sincronização de cios

3.1.1 Utilização de Progestagénios

Os progestagénios são análogos sintéticos de progesterona, com efeito biológico superior ao da própria molécula natural, e que, por isso mesmo, são administrados em

doses mais reduzidas (Valentim *et al.*, 2006b). Actuam inibindo a acção das gonadotropinas e, conseqüentemente, o normal desenvolvimento folicular e a ovulação, ou seja, mimetizam os efeitos naturais da progesterona que impedem a ovulação e prolongam a fase lútea. Os progestagénios possuem uma semivida curta, já que são rapidamente metabolizados (Valentim *et al.*, 2006b). Assim, terminada a sua administração produz-se um rápido regresso à actividade ovárica (Valentim *et al.*, 2006b). São vários os progestagénios disponíveis no mercado, embora os mais utilizados, em ovinos, sejam o FGA (acetato de fluorogesterona) e o MAP (acetato de medroxiprogesterona) (Valentim *et al.*, 2006b). Comparativamente, o FGA permite um controlo mais preciso da actividade ovárica, particularmente importante quando a beneficiação é assegurada por IA (Valentim *et al.*, 2006b). As esponjas vaginais constituem o veículo mais comum e prático de administração de progestagénios (Valentim *et al.*, 2006b).

Não existe um protocolo único de tratamento com progestagénios. De um modo geral, a duração do tratamento com progestagénios está, de alguma forma, relacionada com a duração natural da fase lútea (Valentim *et al.*, 2006b). Geralmente, propõe-se que os tratamentos com FGA tenham uma duração de 12-15 dias e os com MAP de 10-16 dias (Valentim *et al.*, 2006b). O MAP deve ser administrado em doses próximas dos 60 mg, independentemente das ovelhas se encontrarem na estação reprodutiva ou na de anestro (Valentim *et al.*, 2006b). Quanto ao FGA, é presentemente utilizado na dose única de 20 mg, tanto na estação reprodutiva como na de anestro (Valentim *et al.*, 2006b).

Na estação reprodutiva, a administração prolongada de progestagénios pode afectar negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, determinando uma diminuição da taxa de fertilidade (Valentim *et al.*, 2006b). Para além de condicionar a secreção de GnRH/LH e os mecanismos foliculares e ovulatório, diminuem as manifestações detectáveis de cio e prejudicam a formação de depósitos de espermatozóides no canal cervical e o transporte destes ao longo do aparelho genital feminino (Valentim *et al.*, 2006b). O uso sistemático destas hormonas parece aumentar estes problemas (Valentim *et al.*, 2006b). Tratando-se de hormonas sintéticas são reconhecidas como tal pelo sistema imunitário da fêmea, originando a formação de anticorpos contra os progestagénios (Valentim *et al.*, 2006b).

Na estação de anestro, pelo contrário, recomenda-se a aplicação de um tratamento curto com progestagénios, pois este parece elevar a taxa de fertilidade através dos

efeitos positivos que exerce sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas e, conseqüentemente, sobre a actividade ovárica, as manifestações de cio, o transporte de espermatozóides no aparelho genital feminino e a função lútea (Valentim *et al.*, 2006b).

3.1.2 Utilização de Prostaglandinas F_{2α}

A destruição natural do corpo lúteo, que ocorre no final de cada ciclo éstrico, resulta, fundamentalmente, da acção das PGF_{2α} produzidas no útero (Valentim *et al.*, 2006b). Assim, a administração de PGF_{2α} exógena ou de substâncias análogas sintéticas, sempre que e apenas quando exista um corpo lúteo activo, determina a destruição desta estrutura ovárica, a diminuição dos níveis circulantes de progesterona e o começo de um novo ciclo éstrico (Valentim *et al.*, 2006b). Efectivamente, durante a estação de anestro ou nos períodos de transição entre as estações reprodutiva e de anestro e vice-versa, é absolutamente inapropriado o uso de PGF_{2α} no controlo da actividade ovárica (Valentim *et al.*, 2006b). Nos ovinos, o corpo lúteo só é sensível à acção das PGF_{2α} entre o 4º e o 14º dia do ciclo (Valentim *et al.*, 2006b). A administração destas hormonas a ovelhas recém ovuladas e, conseqüentemente, com um corpo lúteo pouco desenvolvido ou a ovelhas que se encontram no final da fase lútea não produz qualquer efeito luteolítico (Valentim *et al.*, 2006b). Neste sentido, a administração de uma única injeccção de PGF_{2α} não é normalmente suficiente para sincronizar o cio de um grupo de ovelhas. Há que administrar duas injeccções com 9-14 dias de intervalo (Valentim *et al.*, 2006b). Geralmente, recomenda-se a administração de aproximadamente 20 mg de PGF_{2α} ou de 125 µg de cloprostenol/injeccção (Valentim *et al.*, 2006b). Porém, alguns autores sugerem a administração de doses muito diferentes – de 35 a 250 µg de cloprostenol/injeccção (Valentim *et al.*, 2006b).

Vários autores afirmam que, nos ovinos, o uso de PGF_{2α} produz resultados reprodutivos algo pobres e sugerem mesmo a sua não utilização nestes animais (Valentim *et al.*, 2006b). Aparentemente, esta hormona pode não determinar a completa regressão do corpo lúteo, afectar negativamente os mecanismos foliculares e ovulatório e prejudicar o transporte dos espermatozóides ao longo do aparelho genital feminino (Valentim *et al.*, 2006b). Não obstante, outros autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de fertilidade aparente, quando utilizaram PGF_{2α} ou progestagénios no controlo da actividade ovárica (Valentim *et al.*, 2006b).

3.1.3 Utilização de Progestagénios e de PGF_{2α}

Durante a estação reprodutiva, a fim de evitar os efeitos deletérios dos tratamentos prolongados com progestagénios, aconselha-se o uso de um tratamento curto (Valentim *et al.*, 2006b). Normalmente, este tipo de tratamento tem uma duração que varia entre 7-9 dias, embora possa reduzir-se a 4-5 dias sem afectar significativamente a taxa de fertilidade aparente (Valentim *et al.*, 2006b). No final, há que administrar uma injeção de PGF_{2α}, com o objectivo de garantir o controlo da actividade ovárica das ovelhas que ainda possuam um corpo lúteo funcional (Valentim *et al.*, 2006b). Mais recentemente, alguns autores propõem que a administração de PGF_{2α} seja feita antes do tratamento curto com progestagénios (Valentim *et al.*, 2006b). Desta forma, poder-se-ão evitar os efeitos negativos da PGF_{2α} sobre o momento da ovulação (Valentim *et al.*, 2006b).

3.2 Indução da Ovulação

Na estação reprodutiva, após a aplicação de tratamentos de controlo da actividade ovárica, ocorre, normalmente, a libertação de gonadotropinas em doses capazes de promover as manifestações de cio e a ovulação (Valentim *et al.*, 2006b). Contudo, recomenda-se a administração de gonadotropinas exógenas a fim de suportar a actividade ovárica natural, contrariando possíveis efeitos negativos dos progestagénios e/ou da PGF_{2α} sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas e, desta forma, elevar as taxas de fertilidade aparente e/ou de prolificidade (Valentim *et al.*, 2006b). Por seu turno, durante a estação de anestro, a administração de gonadotropinas exógenas é imprescindível ao aumento da percentagem de ovelhas que apresentam cio e/ou das que ovulam (Valentim *et al.*, 2006b).

As gonadotropinas exógenas mais utilizadas são a FSH, a eCG (ou PMSG) e a hCG (Valentim *et al.*, 2006b). A FSH promove o crescimento folicular. Geralmente, é administrada em preparados que contêm uma pequena quantidade de LH (Valentim *et al.*, 2006b). Esta hormona é essencialmente utilizada na indução de superovulações. Normalmente, recomenda-se a sua injeção cada 12 horas, durante 2-4 dias, em doses preferencialmente decrescentes (Valentim *et al.*, 2006b). A última injeção deve ser aplicada 12-24 horas depois de ter terminado o tratamento com progestagénios e/ou PGF_{2α} (Valentim *et al.*, 2006b). A administração de FSH exige que o criador disponha de recursos financeiros e de mão-de-obra não desprezáveis e induz um considerável nível de *stress* nos animais (Valentim *et al.*, 2006b). Por isso mesmo, é essencialmente utilizada em programas MOET.

A eCG possui uma acção FSH + LH. A acção FSH é mais prolongada e a LH menos marcada (Valentim *et al.*, 2006b). A eCG tem uma semivida mais longa do que a FSH e pode ser administrada numa única injeção (Valentim *et al.*, 2006b). Devido à sua maior semivida, a precisão da eCG é inferior à da FSH, resultando em épocas de cobrição e de parição mais prolongadas (Valentim *et al.*, 2006b). A fim de aumentar a sua precisão, podem utilizar-se preparados com substâncias anti-eCG, que deverão ser administrados cerca de 2 dias após a injeção de eCG. A eCG deve ser administrada entre 48 horas antes e o momento exacto do término do tratamento de sincronização ou de indução da actividade ovárica (Valentim *et al.*, 2006b). Normalmente, enquanto doses de 450-600 UI promovem a ovulação, doses próximas das 750 UI induzem superovulações (Valentim *et al.*, 2006b). Doses mais elevadas podem resultar em elevadas perdas embrionárias ou na formação de quistos ováricos (Valentim *et al.*, 2006b). Segundo alguns autores, o uso frequente de eCG pode originar a instalação de um estado refractário a esta mesma hormona, provavelmente devido à formação de anticorpos específicos (Valentim *et al.*, 2006b). Porém, outros autores afirmam que se podem aplicar vários tratamentos com eCG sem que ocorra o estabelecimento do estado refractário ou a formação de anticorpos específicos (Valentim *et al.*, 2006b).

A hCG é uma hormona com acção idêntica à LH. Além de induzir a ovulação de folículos maduros, possui efeitos luteotrópicos (Valentim *et al.*, 2006b). Eventualmente, pode determinar até a ovulação de folículos pequenos, ou seja, de baixa fertilidade (Valentim *et al.*, 2006b). Comparativamente, ainda que a hCG resulte numa pior resposta ovárica e em taxas de fertilidade mais baixas, no final tende a produzir taxas de prolificidade superiores às conseguidas através da administração de eCG (Valentim *et al.*, 2006b). Efectivamente, os efeitos luteotrópicos da LH parecem diminuir as perdas embrionárias (Valentim *et al.*, 2006b). Neste sentido, vários autores sugerem o uso combinado de eCG/hCG, com o intuito de melhor aproveitar os efeitos FSH da eCG (melhorar as taxas ovulatórias) e LH da hCG (melhor sobrevivência embrionária) (Valentim *et al.*, 2006b). Geralmente, utilizam-se doses de hCG próximas das 500 UI na promoção da ovulação (Valentim *et al.*, 2006b).

O “efeito macho” pode igualmente promover a ovulação e as manifestações de cio. Ao que tudo indica, ele eleva rapidamente (nalguns minutos) a secreção de GnRH/LH (Poindron *et al.*, 1980, Chemineau, 1987 e Signoret, 1990). Por seu turno, a secreção de FSH não sofre qualquer alteração imediata (Poindron *et al.*, 1980 e Ortavant *et al.*, 1985). O pico pré-ovulatório de LH surge, em média, 30 horas (6-54 horas) após

a junção do(s) carneiro(s) e das ovelhas (Oldham *et al.*, 1978 e Knight *et al.*, 1978). Segundo Martin *et al.* (1980) (citados por Signoret e Cognié, 1984), produz-se então um aumento da secreção de FSH. De acordo com Signoret e Cognié (1984), cerca de 48 horas depois da introdução do(s) carneiro(s) a maioria das ovelhas ovulam. Alguns autores afirmam que o “efeito macho” pode induzir superovulações.

3.3 Melatonina

Ainda que a melatonina possa actuar a vários níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, a sua acção principal produz-se a nível do sistema nervoso central e relaciona-se com a modificação da frequência de libertação de GnRH/LH e da actividade das gónadas (Valentim *et al.*, 2006a). Esta acção da melatonina é conseguida através de dois mecanismos complementares: modulação directa da secreção de GnRH (esteróide-independente) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos esteróides gonadais (esteróide-dependente) (Valentim *et al.*, 2006a). Durante a estação de anestro sazonal, a actividade ovárica completa das ovelhas desaparece ou é fortemente condicionada pela eficácia deste mecanismo de retroacção negativa, responsável pelo bloqueio da ocorrência do pulso pré-ovulatório de GnRH/LH e, conseqüentemente, da ovulação (Valentim *et al.*, 2006a)

Nos ovinos, a actividade reprodutora sazonal pode ser manipulada através da aplicação de tratamentos luminosos ou da administração de melatonina exógena (Valentim *et al.*, 2006a). A adequada aplicação de tratamentos luminosos é pouco exequível numa exploração ovina comum e é particularmente cara, pois implica a utilização de instalações apropriadas, cuja construção e manutenção são bastante onerosas (Valentim, 2006a). A utilização de implantes subcutâneos de melatonina, ainda que não seja propriamente barata ($\approx 10\text{€}/\text{implante}$), sempre é economicamente mais vantajosa (Valentim *et al.*, 2006a).

Nas ovelhas anéstricas, a administração de melatonina exógena mimetiza os perfis de secreção de melatonina dos “dias curtos”, ou seja, eleva a secreção de GnRH/LH e, conseqüentemente, promove a ovulação, melhora a função lútea e aumenta a taxa de sobrevivência dos embriões (Forcada *et al.*, 2001; citados por Valentim *et al.*, 2006a). Na verdade, possibilita a obtenção de resultados reprodutivos semelhantes aos que ocorrem, naturalmente, em plena estação reprodutiva – altas taxas de fertilidade aparente e de prolificidade (Forcada *et al.*, 2001, Sánchez *et al.*, 2003 e Santander *et al.*, 2003; citados por Valentim *et al.*, 2006a). O uso de implantes subcutâneos de

melatonina é absolutamente desaconselhado em animais impúberes (folhetos da SANOFI *Santé Nutrition Animal*, 1999 e da CEVA *Santé Animal*, 2001; citados por Valentim *et al.*, 2006a).

Nos ovinos, a melatonina exógena pode ser fácil e comodamente administrada, através da colocação de implantes subcutâneos desta hormona, na base posterior das orelhas (Valentim *et al.*, 2006a). Contudo, os resultados reprodutivos obtidos por diferentes investigadores são, por vezes, aparentemente contraditórios, devido a diferenças relacionadas com o animal (património genético, idade, condição corporal, etc.), com o manejo (tamanho dos rebanhos, alimentação, interferência na organização social, estado sanitário, duração do intervalo parto/colocação dos implantes, produção de leite, etc.) e com a metodologia empregue (parâmetros avaliados, momento da aplicação dos implantes, dose administrada, duração do intervalo colocação dos implantes/introdução dos machos ou realização da inseminação artificial, etc.) (Valentim *et al.*, 2006a).

O momento correcto para se proceder à administração de melatonina exógena depende da “história” fotoperiódica do animal (Valentim *et al.*, 2006a). A aplicação de implantes subcutâneos de melatonina, no final da estação reprodutiva/começo da estação de anestro, pode não resultar no “prolongamento” da estação reprodutiva, mas sim na instalação de um estado “fotorrefractário” ao sinal “dias curtos” (Valentim *et al.*, 2006a). Assim, antes de se colocarem implantes subcutâneos de melatonina, há que submeter os animais a um sinal fotoperiódico inibidor – “dias longos” –, de modo a ressensibilizar-se o seu sistema neuroendócrino relativamente ao sinal “dias curtos” (Valentim *et al.*, 2006a). Segundo vários autores, as transições progressivas do fotoperíodo (crescente ou decrescente) parecem promover uma resposta fisiológica mais forte do que a que se regista quando estas transições são abruptas (passagem repentina de um regime luminoso de “dias curtos” para “dias longos” e vice-versa). Sob condições de campo, a ressensibilização do sistema neuroendócrino dos ovinos face ao sinal “dias curtos” tem passado pela sujeição dos animais ao fotoperíodo naturalmente crescente, no período de Inverno/Primavera (Valentim *et al.*, 2006a).

O número de implantes a colocar, por animal, varia em função do sexo e do seu peso corporal (Valentim *et al.*, 2006a). Cada implante subcutâneo de melatonina (18 mg de melatonina) liberta, progressivamente, melatonina em doses semelhantes às segregadas naturalmente durante a noite, por um período de 3-4 meses (folhetos da SANOFI *Santé Nutrition Animal*, 1999 e da CEVA *Santé Animal*, 2001; citados por

Valentim *et al.*, 2006a). Cerca de 30-40 dias após a colocação dos implantes subcutâneos de melatonina, as ovelhas reiniciam a sua actividade ovárica (folhetos da SANOFI *Santé Nutrition Animal*, 1999 e da CEVA *Santé Animal*, 2001; citados por Valentim *et al.*, 2006a), mas esta só se torna semelhante à da estação reprodutiva nos três ciclos ováricos seguintes (2-4 ciclos pós-tratamento), ou seja, até cerca de 70 dias após a colocação dos referidos implantes.

4 Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes

A IA é uma técnica reprodutiva baseada na recolha de sémen e posteriormente deposição no tracto reprodutivo feminino, com o auxílio de instrumentos e sem que haja contacto directo entre macho e fêmea (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999). As primeiras investigações sobre a IA, em ovinos, foram realizadas por Ivanov (1907, 1912), no início do século XX (Gillan *et al.*, 1999 e Salamon e Maxwell, 2000). Após a Primeira Guerra Mundial, novos estudos intensivos foram desenvolvidos por Milovanov e, no início dos anos 30, a IA, com sémen fresco e refrigerado, era usada, em grande escala, em programas de melhoramento animal, por toda a EX-URSS (Gillan *et al.*, 1999 e Salamon e Maxwell, 2000). De entre os vários países da União Europeia, a França é aquele em que a prática da IA, entre os ovinos, se encontra mais difundida (Perret *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Neste país, a IA é assegurada, todo o ano, fundamentalmente pelas associações de criadores. De um modo geral, os técnicos destas associações trabalham com sémen fresco e refrigerado. Em Portugal, a IA de ovinos é muito rara e quase que exclusivamente experimental.

4.1 Vantagens e Inconvenientes da Inseminação Artificial

As principais vantagens da IA são:

- Estende os limites geográficos e temporais da cobrição natural.
- Aumenta o rigor dos registos reprodutivos.
- Contribui fortemente para o melhoramento genético dos efectivos.
- Viabiliza a aplicação de programas de conservação do património genético.
- Eleva o controlo de doenças sexualmente transmissíveis.
- Melhora o controlo das actividades reprodutiva e produtiva dos efectivos, o que comporta claras vantagens económicas.

- Facilita o manejo dos efectivos, aumentando a segurança física dos criadores. Por outro lado, porque possibilita a criação de lotes, permite a implementação de técnicas de manejo tão simples como o *flushing*, o *steaming up* e a assistência a partos, as quais têm igualmente importantes repercussões económicas.
- Maior economia. Com o sémen de um só macho pode inseminar-se um grande número de fêmeas, logo o número de machos que é necessário existir na exploração reduz-se significativamente.
- Permite o desenvolvimento de novas tecnologias reprodutivas e genicas.

Quando devidamente realizada, as desvantagens da IA são reduzidas:

- Existência de pessoal qualificado na exploração, capaz de implantar programas de indução/sincronização da actividade ovárica, de detecção de cios, de recolha de sémen, de tecnologia seminal e de IA propriamente dita.
- Proceder a uma atempada detecção das fêmeas em cio e à restrição dos seus movimentos, o que nem sempre é fácil, particularmente, nas explorações que funcionam em regime extensivo.

A dissociação espacial, entre o local de produção dos gâmetas masculinos e o local de deposição dos mesmos no genital feminino, é um dos factores com maior interesse na IA, permitindo uma maior disseminação de material genético superior (Hafez, 1987; citado por Bettencourt, 1999). A manutenção dos machos reprodutores, separados das fêmeas, em instalações próprias, dá mais garantias, às organizações competentes, relativamente à sua origem (ascendência, valor genético, aptidões individuais, estado sanitário, etc.), bem como possibilita uma melhor gestão reprodutiva dos mesmos (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Por outro lado, facilita o transporte de material genético, nomeadamente, entre países que não permitem a entrada de animais vivos (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999). A conservação prolongada de sémen, de animais de elevado valor genético, facilita o seu uso após a morte do dador (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999).

A aplicação desta técnica garante a existência de registos mais seguros, aumentando a precisão de selecção e a eliminação de caracteres indesejáveis (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999).

A IA desempenha um papel importante em várias fases da execução de um programa de melhoramento genético (Foulley *et al.*, 1990; citados por Bettencourt, 1999). Na realidade, o recurso à IA permite a avaliação de reprodutores, facilitando a criação de ligações genéticas entre diferentes explorações (Foulley *et al.*, 1984; citados por Bettencourt, 1999) e permite o uso simplificado do teste de descendência, em diferentes condições ambientais e de manejo (Hafez, 1987; citado por Bettencourt, 1999). O sêmen de um mesmo carneiro pode ser utilizado em várias explorações, aumentando a sua descendência e facilitando a identificação da importância de alguns parâmetros ambientais e de manejo. Determina um progresso genético mais rápido das raças, com maior ganho genético, na medida em que facilita a existência de acasalamentos perfeitamente dirigidos, mais eficazes do que os que resultam de cobrição natural. Eleva a precisão da avaliação das diferentes metodologias estatísticas presentemente utilizadas no melhoramento genético (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

O papel da IA, em programas de conservação genética, *in situ* ou *ex situ*, de raças em vias de extinção, é fundamental (Schulte-Coerne, 1992; citado por Bettencourt, 1999), pois facilita o controlo do número e do tamanho das famílias (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Torna mais fácil e eficiente a aplicação de sistemas de cobrição rotativa (Chevalet e Rochambeau, 1979; citados por Bettencourt, 1999), após divisão da população, segundo uma matriz de parentescos, independentemente da separação física das explorações (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Se utilizada correctamente, permite ainda controlar os riscos de consanguinidade, particularmente quando há trocas de material genético entre efectivos de pequena dimensão.

Em termos de eficácia produtiva, esta técnica comporta também várias vantagens. Facilita a identificação de machos inférteis. Permite a utilização de machos incapacitados (por lesões ou por idade) e a redução do número de machos presentes na exploração. Presentemente, um carneiro adulto pode produzir mais de 550 doses de sêmen por ano (valor médio = 386 doses/ano) (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Na Primavera, a aplicação da IA é particularmente importante, pois nessa altura do ano a libido dos machos é menor e a quantidade e a qualidade do sêmen produzido são inferiores (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

A utilização da IA diminui os riscos sanitários, pois o estado de saúde dos machos reprodutores é monitorizado regularmente, não existe contacto directo macho/fêmeas e só é usado o sémen de reprodutores comprovadamente sãos.

O controlo da actividade reprodutiva (ovulações e manifestações de cio), inerente à aplicação da técnica de IA, facilita o manejo geral dos efectivos e resulta num aumento da eficiência produtiva (Boichard *et al.*, 1984; Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Permite um melhor ajustamento entre a produção e as necessidades de mercado (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Faculta uma escolha mais precisa das épocas de cobrição e de parição. Facilita a criação de lotes de animais mais uniformes (destinados a venda) e/ou na mesma fase do ciclo produtivo. Permite ainda a programação mais precisa da utilização da mão-de-obra. Todas estas vantagens produtivas têm, obviamente, importantes repercussões económicas.

O desenvolvimento e a aplicação da IA facilitam a utilização de outras técnicas reprodutivas (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999). Por outro lado, possibilitam a implementação de trabalhos experimentais, desenhados com o objectivo de identificar genes com importância económica (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

Os principais inconvenientes da inseminação artificial estão associados à necessidade de se proceder ao controlo da actividade reprodutiva das fêmeas, o que encarece obrigatoriamente a sua aplicação. Do ponto de vista genético, a utilização intensiva e indiscriminada de IA pode conduzir à diminuição da variabilidade genética, associada a um aumento da taxa de consanguinidade (Evans e Maxwell, 1987; Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

A imprecisão dos emparelhamentos, devido a hipotéticos erros de decisão e/ou de identificação do sémen, a utilização de um macho reprodutor incorrectamente valorizado e a disseminação de doenças não identificadas, são outros factores a ter em conta.

Nos ovinos, a IA deve resultar, no mínimo, numa taxa de fertilidade aparente (indicador mais preciso do sucesso da sua aplicação) de 50% (Perret *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Caso contrário, a sua utilização torna-se economicamente inviável (Perret *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

4.2 Técnicas de IA

Tal como já foi anteriormente referido, um dos maiores obstáculos à difusão da técnica de IA, entre os ovinos, relaciona-se com a impossibilidade de ultrapassar, naturalmente, o canal cervical, de forma a depositar o sémen no corpo ou nos cornos uterinos. Na verdade, o local onde é deixado o sémen denomina a técnica de IA utilizada: vaginal, cervical, transcervical e intra-uterina.

A inseminação vaginal é frequentemente designada por “tiro no escuro” e consiste na deposição do sémen na vagina, o mais profundamente possível, sem, no entanto, ter a preocupação de o fazer próximo da entrada do canal cervical (Mylne *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). É, normalmente, realizada com sémen fresco diluído. Um programa de IA, assente na inseminação vaginal, se bem conduzido, poderá resultar em taxas de fertilidade aparente de 60%, com sémen fresco diluído, e de até 40%, com sémen congelado (Buckrell *et al.*, 1991; citados por Bettencourt, 1999). Porém, para se alcançarem estas taxas há que utilizar um elevado número de espermatozóides, frequentemente superior a 500 milhões de células espermáticas viáveis/dose de inseminação (Buckrell *et al.*, 1991; citados por Bettencourt, 1999).

A inseminação transcervical é uma técnica de IA não cirúrgica, em que os espermatozóides são depositados no útero, via vagina e canal cervical (Hill *et al.*, 1998 e Salamon e Maxwell, 2000). É uma técnica fácil de ensinar, mesmo a pessoas inexperientes. Um dos métodos transcervicais de inseminação (porventura, o mais conhecido) é o GUELPH. Ele permite a ultrapassagem completa do canal cervical em 80-90% das ovelhas (Buckrell *et al.*, 1992). Porém, vários são os autores franceses e australianos que não conseguiram obter resultados tão bons (Eppleston *et al.*, 1994). Na verdade, os resultados da inseminação transcervical são muito variáveis, pois dependem de múltiplos factores: características individuais de cada fêmea, momento da inseminação, processamento do sémen, local de deposição do sémen, dose de inseminação, número de inseminações/ciclo éstrico, equipamento utilizado, perícia do inseminador, entre outros.

A inseminação intra-uterina é uma técnica de IA que consiste na deposição directa de sémen no corpo do útero (Eppleston *et al.*, 1994) ou nos cornos uterinos (Killeen e Caffery, 1982 e Eppleston *et al.*, 1994), via laparoscopia (Keisler, 1991; Mylne *et al.*, 1997, Hill *et al.*, 1998 e Salamon e Maxwell, 2000). Embora seja uma intervenção cirúrgica, que requer material sofisticado e mão-de-obra especializada (custos mais elevados), possibilita a obtenção de taxas de fertilidade aparente bastante satisfatórias -

até 75%, com sémen congelado (Buckrell *et al.*, 1991). Um inseminador experiente consegue inseminar, rapidamente, um elevado número de ovelhas normais (Hill *et al.*, 1998; citados por Bettencourt, 1999). Porém, o uso sistemático desta técnica pode resultar na formação de aderências uterinas e, conseqüentemente, numa rápida diminuição da sua aplicabilidade.

Na inseminação intra-uterina, as taxas de fertilidade aparente são mais elevadas quando o sémen é depositado nos dois cornos uterinos do que quando o é em apenas um deles (Findlater, 1991; citado por Bettencourt, 1999).

4.2.1 Inseminação Cervical

Na IA cervical, o sémen é depositado dentro do canal cervical, o mais profundamente possível (Mylne *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). A IA cervical com sémen fresco é a técnica mais utilizada, uma vez que é fácil e rápida de aplicar, comporta custos relativamente baixos e permite a obtenção de resultados reprodutivos satisfatórios (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999). Em França, 99% das IA realizadas são efectuadas por via cervical, com taxas de fertilidade aparente média de 65%, com sémen fresco (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

As baixas taxas de fertilidade aparente obtidas com sémen congelado, após inseminação cervical, limitaram, durante muito tempo, a utilização do sémen congelado em ovinos. O aumento da concentração de espermatozóides, resultante de uma menor diluição, realizada antes da congelação, ou da reconcentração das doses seminais, após descongelação, por centrifugação ou filtração, permite melhorar as taxas de fertilidade aparente (Evans e Maxwell, 1987, Salamon e Maxwell, 1995b; citados por Bettencourt, 1999). Outra opção é a inseminação dupla, que, no entanto, apresenta resultados muito díspares. Alguns autores referem uma melhoria significativa na prolificidade, após inseminação dupla, quando o número de espermatozóides depositados é o dobro do de uma inseminação única (Salamon e Maxwell, 1995b; citados por Bettencourt, 1999). Porém, as taxas de prolificidade revelaram-se similares quando o número total de espermatozóides administrados é o mesmo, na inseminação única e na dupla, dentro do intervalo de tempo óptimo de 12 a 24 horas pós-deteccção do cio (Salamon, 1977; citado por Bettencourt, 1999).

A taxa de fertilidade aparente, conseguida após inseminação cervical, com sémen congelado, é normalmente baixa (Salamon e Maxwell, 2000). Este problema pode ser

resolvido aumentando a profundidade de deposição do sémen, embora continue a ser difícil conseguir uma penetração capaz de proporcionar elevadas taxas de fertilidade aparente (Salamon e Maxwell, 2000). De acordo com Salamon e Maxwell (1995b) (citados por Bettencourt, 1999), a taxa de fertilidade aparente pode ser predita segundo a profundidade da inseminação, através da seguinte fórmula – $F = 30 + 12,5 p$ (onde F representa taxa de fertilidade aparente e p a profundidade da inseminação).

A utilização de oxitocina, de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou de choques eléctricos, a fim de facilitar o transporte dos espermatozóides ao longo do canal cervical (através da estimulação das contracções uterinas), não resultou num aumento significativo da taxa de fertilidade aparente. No mesmo sentido, o uso de relaxina ou de cocaína, com o objectivo de se conseguir uma inseminação cervical mais profunda, não se traduziu em melhores resultados reprodutivos (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999).

As inseminações cervicais profundas permitem uma diminuição significativa do número de espermatozóides presentes em cada dose seminal – 20-40 milhões de células espermáticas viáveis (Salamon e Maxwell, 1995b; citados por Bettencourt, 1999).

4.3 Momento Óptimo para a Inseminação

Qualquer que seja a técnica considerada, a determinação exacta do momento da ovulação é crucial para o sucesso da inseminação, já que o óvulo tem uma duração de vida fértil muito curta (12 a 24 horas) (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999). É importante que os espermatozóides alcancem a ampola imediatamente antes dos oócitos viáveis aí chegarem. Neste sentido, o aproveitamento de um cio natural, o método de sincronização/indução de cios empregue, a técnica de inseminação utilizada e o tipo de sémen aplicado (fresco ou conservado), afectam significativamente a escolha do momento óptimo para a IA (Mylnes *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

A inseminação de ovelhas, em cio natural, deve ser feita 12-18 horas após o início do cio. Nestas ovelhas, a concentração de espermatozóides presentes na ampola é máxima 12-24 horas após a inseminação cervical (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999).

Em programas de IA, com recurso à sincronização da actividade ovárica, a detecção dos cios não é indispensável, realizando-se a IA em tempo fixo (pós-término do tratamento). Assim, a inseminação cervical deverá ser feita 48-60 horas após a remoção das esponjas vaginais (Buckrell *et al.*, 1991; citados por Bettencourt, 1999). Contudo, a maioria dos autores sugere, como momento óptimo para a inseminação, as

55 horas, quando a inseminação é única, e as 48 e as 60 horas, quando a inseminação é dupla (Buckrell *et al.*, 1991; citados por Bettencourt, 1999). De acordo com Evans e Maxweel (1987), citados por Bettencourt (1999), a inseminação intra-uterina, por laparoscopia, com sémen congelado, deverá efectuar-se 60-66 horas após a remoção das esponjas vaginais. Em fêmeas superovuladas, o intervalo entre o fim do tratamento progestagénico e a inseminação deverá ser de 36-48 horas, com sémen fresco, e de 44-48 horas, com sémen congelado.

Se a sincronização da actividade ovárica foi feita com recurso a um tratamento com PGF_{2α}, a IA deverá processar-se 72-96 horas após a última administração das mesmas (Buckrell *et al.*, 1991; citados por Bettencourt, 1999).

A utilização repetida de eCG pode originar a produção de anticorpos anti-eCG. Estes podem alterar o momento em que se produz o pulso pré-ovulatório de LH e, conseqüentemente, o momento da ovulação. Assim, a IA efectuada 55 horas após o término do tratamento de sincronização da actividade ovárica pode resultar em baixas taxas de fertilidade aparente e de prolificidade (Bodin *et al.*, 1997; citados por Bettencourt, 1999).

Geralmente, nos programas de IA, com recurso à aplicação de tratamentos de sincronização da actividade ovárica, o uso de carneiros vasectomizados é muito pouco frequente (destinado à detecção de cios). Porém, eles podem ter um efeito benéfico sobre a taxa de fertilidade aparente. Na verdade, a exposição das ovelhas ao(s) carneiro(s) induz uma maior sincronia da ovulação e permite que apenas as ovelhas em cio sejam inseminadas (taxas de fertilidade aparente superiores).

III Procedimento Experimental

1 Material e Métodos

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança (latitude 41° 49' N, longitude 6° 40' W e altitude 720 metros), mais especificamente na Quinta de Santa Apolónia, pertencente à Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), entre 18 de Fevereiro e 1 de Julho de 2008.

As ovelhas estudadas foram alimentadas em pastoreio de prados naturais e suplementadas, em grupo, com feno de prados naturais (*ad libitum*) e com 300-350 g/dia/ovelha de alimento concentrado comercial.

1.1 Animais

Todas as ovelhas Churras Bragançanas (n = 74), pertencentes ao rebanho experimental da ESAB, com idades compreendidas entre os 1-8 anos, foram utilizadas neste estudo. Posteriormente, por diferentes motivos, 5 foram excluídas. Todas as ovelhas primíparas e múltíparas tinham parido à, pelo menos, 6 meses.

1.2 Avaliação da Ciclicidade Inicial das Ovelhas

A fim de avaliar a ciclicidade de todas as ovelhas, durante duas semanas (18 de Fevereiro a 3 de Março), pela manhã, com 3-4 dias de intervalo, procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através da punção da veia jugular. Após a centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante, ou seja, do plasma sanguíneo. A técnica de RIA utilizada na determinação dos níveis plasmáticos de progesterona foi a indicada pelo fabricante dos *kits* (*Diagnostic Products Corporation*). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 8,7 e 15,8%.

Considerou-se que as ovelhas estavam em anestro sazonal quando, na totalidade das amostras recolhidas, os níveis plasmáticos de progesterona se revelaram inferiores a 0,5 ng/ml.

1.3 Pesagem e Determinação da Condição Corporal

No início deste trabalho, todas as ovelhas foram pesadas numa balança com jaula (sensibilidade mínima de 100 gramas). A sua condição corporal foi determinada de acordo com a tabela de classificação australiana (Russel, 1969).

1.4 Tratamentos Aplicados

No dia 3 de Março, as ovelhas foram aleatoriamente divididas em dois grupos – Controlo (n = 33) e Melatonina (n = 36). Nesse mesmo dia, as ovelhas do grupo Melatonina receberam um implante subcutâneo de melatonina (18 mg; Melovine®; CEVA Saúde Animal). Sessenta e cinco dias mais tarde (7 de Maio), todas as ovelhas dos dois grupos – Controlo e Melatonina – foram tratadas com uma esponja vaginal impregnada com 20 mg de FGA (Acetato de Fluorogestona; Chrono-Gest®; Intervet Portugal). Doze dias depois (19 de Maio), procedeu-se à remoção das esponjas vaginais e à administração de 500 UI de eCG/ovelha (Gonadotropina Coriónica equina; Intergonan®; Intervet Portugal).

Nessa altura, 10 ovelhas de cada um dos grupos – Controlo e Melatonina – foram, aleatoriamente, seleccionadas para serem sujeitas a Inseminação Artificial (IA) (n = 20). As restantes ovelhas foram beneficiadas por Monta Natural (MN) (n = 48). Para o efeito foram utilizados 4 carneiros adultos (2-4 anos de idade).

A IA foi realizada, com sémen fresco, cerca de 55 horas após a remoção das esponjas vaginais (Chemineau *et al.*, 1991). Foi utilizado o sémen de 2 carneiros adultos (3-4 anos), recolhido através de electroejaculação. Depois de recolhidas, as amostras de sémen foram temporariamente mantidas num banho-maria a 37°C. Posteriormente, avaliou-se o seu volume, aspecto, odor e motilidade massal. Só foram usadas amostras de sémen com, pelo menos, 1,2 ml de volume, opacas uniformes, de odor *sus generis* e de excelente motilidade massal (movimento ondulatório rápido, com redemoinhos; Chemineau *et al.*, 1991). A partir de cada ejaculado foram preparadas 10 palhinhas (0,25 ml) de sémen diluído com soro fisiológico isotónico (diluição feita a 37°C). A ordem de inseminação das ovelhas foi aleatória. O sémen foi depositado, sempre que possível, depois de ultrapassada a primeira prega do canal cervical.

1.5 Detecção dos Cios

A fim de se proceder à detecção das ovelhas em cio, equiparam-se todos os carneiros com um arnês marcador. Adicionalmente, o carneiro colocado junto das

ovelhas destinadas à IA foi equipado com um avental. Este carneiro foi deixado junto das ovelhas apenas por 55 horas (até à IA). Os restantes carneiros permaneceram com as ovelhas durante uma semana. A identificação das ovelhas em cio foi feita duas vezes por dia, de manhã cedo e ao fim da tarde.

1.6 Diagnóstico de Gestação

Quarenta e cinco dias após a remoção das esponjas vaginais, todas as ovelhas foram sujeitas a diagnóstico de gestação por ultrasonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo ALOKA SSD-500 e de uma sonda abdominal de 5,0 MHz.

1.7 Análise Estatística

No sentido de identificar diferenças estatisticamente significativas entre alguns parâmetros, efectuaram-se análises de variância (Steel e Torrie, 1980). A comparação entre médias realizou-se segundo o teste de Bonferroni/Dunn (Dunn, 1961). Com o intuito de se compararem frequências, utilizou-se o teste do χ^2 (Snedecor e Cochran, 1980).

2 Resultados e Discussão

No início deste estudo, a idade média das ovelhas era de $3,7 \pm 2,0$ anos (c.v. = 54,5%) (Quadro I). O seu peso médio era de $49,9 \pm 6,5$ kg (c.v. = 13,0%) e a sua condição corporal média de 3,0.

QUADRO I – Valores máximos e mínimos da idade, peso e da condição corporal das ovelhas estudadas

	Idade (anos)	Peso Corporal (kg)	Condição Corporal
Mínimo	1	36,0	2,0
Máximo	8	64,0	4,0

Entre 18 de Fevereiro e 3 de Março (duas primeiras semanas de ensaio), 10,3% (n = 7) das ovelhas apresentaram, em pelo menos uma das tomas de sangue, níveis plasmáticos de progesterona superiores a 0,5 ng/ml, ou seja, 89,7% das ovelhas estavam já em anestro sazonal. Este valor revelou-se claramente superior ao registado por Correia (1996) – 66,0% –, num trabalho desenvolvido com ovelhas da mesma raça e sujeitas ao mesmo manejo geral ($\chi^2 = 16,783$; $P \leq 0,001$). Nem a idade, nem o peso, nem

a condição corporal afectaram significativamente o estado fisiológico inicial das ovelhas estudadas ($P>0,05$).

2.1 Cios

A idade das ovelhas não influenciou significativamente a apresentação ou não de cio ($P>0,05$). Das 69 ovelhas utilizadas neste ensaio, 46 (66,7%) apresentaram cio, 24-96 horas após a remoção das esponjas vaginais, ou seja, a maioria manifestou sinais detectáveis de cio ($\chi^2 = 23,120$; $P\leq 0,001$). Dezasseis (48,5%) destas ovelhas pertenciam ao grupo Controlo e 30 (83,3%) ao grupo Melatonina ($\chi^2 = 27,105$; $P\leq 0,001$) (Quadro II). Na verdade, em relação ao tratamento clássico com progestagénios e eCG, o tratamento com melatonina exógena determinou um aumento da percentagem de ovelhas que apresentou cio. As manifestações de cio dependem, essencialmente, do correcto funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (Correia, 1996, Azevedo *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2006). Neste sentido, tudo indica que o tratamento com melatonina ditou uma melhor actividade deste eixo.

QUADRO II – Percentagem de ovelhas que apresentaram cio, tendo em conta o tratamento e o tipo de beneficiação aplicado

Cio	Tratamento		Beneficiação	
	Controlo	Melatonina	Monta Natural	Inseminação Artificial
Sim	48,5% ^a	83,3% ^b	70,6% ^x	55,5% ^y
Não	51,5% ^a	16,7% ^b	29,4% ^x	44,5% ^y

a≠b, para $P\leq 0,001$ (entre tratamentos)

x≠y, para $P\leq 0,05$ (entre tipos de beneficiação).

Do grupo MN, 35 (68,6%) ovelhas manifestaram cio, contra 11 (55,0%) das beneficiadas por IA ($\chi^2 = 3,605$; $P>0,05$). De qualquer modo, independentemente de terem apresentado cio ou não, todas as ovelhas do segundo grupo foram inseminadas artificialmente.

2.2 Diagnóstico de Gestação

A idade das ovelhas não influenciou significativamente a taxa de gestação ($P>0,05$). Quarenta e cinco dias após a remoção das esponjas vaginais, 20 (60,6%) das ovelhas Controlo e 29 (80,1%) das Melatonina estavam gestantes ($\chi^2 = 8,679$; $P\leq 0,01$) (Quadro III). Deste modo, a administração de melatonina exógena, comparativamente à

aplicação de um tratamento clássico com progestagénios e eCG, determinou um aumento significativo da taxa de gestação. Resultado idêntico foi registado por Santander *et al.* (2003), com ovelhas da raça Rasa Aragonesa. Pelo contrário, de la Fuente *et al.* (2001) e Valentim *et al.* (2006) referem a existência de vários trabalhos com conclusões exactamente contrárias.

Por seu turno, 38 (76,0%) das ovelhas cobertas por MN e 11 (55,0%) das beneficiadas por IA estavam gestantes ($\chi^2 = 9,758$; $P \leq 0,01$). De acordo com este resultado, 3 ovelhas do grupo MN terão sido cobertas sem que se tenha identificado o cio. Algo terá falhado no processo de identificação das ovelhas em cio (sabão colorido sujo, má interpretação da marcação – possível confusão com salto guloso). No que concerne ao grupo de ovelhas sujeitas a IA, apesar da percentagem de fêmeas que apresentou cio ser igual à das que ficou gestante, nem todas as do primeiro grupo ficaram efectivamente gestantes (4 ficaram vazias).

QUADRO III – Percentagem de ovelhas gestantes, tendo em conta o tratamento e o tipo de beneficiação aplicado

Gestação	Tratamento		Beneficiação	
	Controlo	Melatonina	Monta Natural	Inseminação Artificial
Sim	60,6% ^a	80,1% ^b	76,0% ^x	55,0% ^y
Não	39,4% ^a	19,9% ^b	24,0% ^x	45,0% ^y

a≠b, para $P \leq 0,01$ (entre tratamentos)

x≠y, para $P \leq 0,01$ (entre tipos de beneficiação)

De acordo com a generalidade dos trabalhos publicados, a diferença acima indicada, relativamente as percentagens de ovelhas que ficaram gestantes por MN e por IA, pode ser explicada pelo facto da IA cervical, geralmente, resultar numa diminuição da taxa de fertilidade aparente. Na realidade, o número de espermatozóides que é colocado no canal cervical, na IA cervical, é significativamente inferior à que é depositada, naturalmente, pelo macho, no fundo do saco vaginal.

Desconhece-se a publicação de qualquer trabalho científico anterior, relativo ao uso da técnica de IA em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Mais, este estudo constitui o primeiro contacto desta equipa de investigação com a IA em ovinos. Nestes animais, o sucesso da aplicação da IA cervical depende muito da habilidade do inseminador. Segundo Blasco *et al.* (2002), as equipas de inseminadores da OVIARAGÓN obtiveram taxas de fertilidade aparente que variaram entre 32,0% e

68,0% (média = 50,0%), após 6.053 inseminações. No trabalho publicado por Martín (2008), a IA cervical traduziu-se numa taxa de fertilidade aparente média de 45,0% (após 2.311 inseminações). Assim sendo, o resultado alcançado pela nossa equipa é altamente motivador e a experiência adquirida será certamente utilizada em futuros estudos.

3 Conclusões

Tendo em conta as condições em que este trabalho foi desenvolvido, a metodologia empregue e os resultados conseguidos, conclui-se que:

- Nos finais do Inverno, 89,7% das ovelhas Churras Bragançanas estudadas estavam em anestro sazonal.
- O tratamento com melatonina exógena determinou, relativamente ao tratamento clássico com progestagénios, um aumento das percentagens de ovelhas que manifestaram cio e que ovularam.
- Setenta e seis por cento das ovelhas cobertas por MN ficaram gestantes.
- Cinquenta e cinco por cento das ovelhas beneficiadas por IA cervical ficaram gestantes.

IV Referências Bibliográficas:

- AZEVEDO, J.M., VALENTIM, R.C. y CORREIA, T.M., 2006. Control hormonal de la actividad ovárica en ovinos. *Albéitar*, **98**, 2-4.
- BLASCO, M.E., CIUDAD, M.A., GALEOTE, A.I., LAZARO, D., FANTOVA, E., ALABART, J.L. e EQUIPA VETERINARIA DE CARNES OVIARAGON S.C.L., 2002. Resultados de fertilidad y prolificidad en inseminación artificial, dentro del programa de selección por prolificidad de la UPRA Carnes Oviaragón, en función del nivel de rentabilidad económica de las ganaderías. *Producción Ovina e Caprina*, **XXVII**, 989-994.
- BETTENCOURT, E.M.V., 1999. Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campanica. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 106 pp..
- CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUERIN, Y., ORGEUR, P. e VALLET, J.-C., 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper 83, FAO, Roma, Itália, 222 pp..
- CORREIA, T.M.M.A.A., 1996. Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana. Centre International de Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, Saragoça, Espanha, 84 pp..
- DE LA FUENTE, J.V., TUHI, J.T., IBAÑEZ, M.T. e GONZALEZ, E.C., 2001. Utilización de FGA y PMSG en la oveja Rubia de El Molar para incrementar su eficacia reproductiva en Primavera. *Producción Ovina e Caprina*, **XXVI**, 999-1003.
- DUNN, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**, 52-64.
- FORCADA, F., ABECIA, J.A. e ZUÑIGA, O., 2001. Efecto de la melatonina sobre la secreción de progesterona *in vivo* y el desarrollo embrionario *in vitro*. *Producción Ovina e Caprina*, **XXVI**, 1010-1015.
- MARTÍN, S.G., 2008. Utilización de Chronogest 20 mg liberación controlada en IA. *Albéitar*, **111**, 54-55.
- RUSSEL, A.J.F., DONEY, J.M. e GUNN, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J Agric Sci Camb*, **72**, 451-454.

- SANCHEZ, A., SERRANO, M.A., DELETANG, F., MARTIN, S. e MARTINO, A., 2003. Resultados reproductivos con implantes de melatonina en ovejas cruce Merino/Fleischaff en la Coop ALANSER. Interpretación de curvas de partos. *Producción Ovina e Caprina*, **XXVIII**, 212-214.
- SANTANDER, L., SALINAS, M.S., MARTIN, S., e MARTINO, A., 2003. Índices reproductivos obtenidos utilizando el método de sincronización con esponjas vaginales e inducción con implantes de melatonina en raza Rasa Aragonesa. *Producción Ovina e Caprina*, **XXVIII**, 215-217.
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, W.G., 1980. *Statistical methods*. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, IA, EUA, 185 pp..
- STEEL, R.G.D. e TORRIE, J.H., 1980. *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Company. 2ª Edição, Nova Iorque, EUA, xxi-633 pp..
- VALENTIM, R. C., 2004. Estudo da sazonalidade sexual em carneiros da Raça Churra Galega Bragançana. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 179 pp..
- VALENTIM, R.C. CORREIA, T.M. e AZEVEDO, J.M., 2006a. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, **2** (6), 18-22.
- VALENTIM, R.C. CORREIA, T.M. e AZEVEDO, J.M., 2006b. Controlo hormonal da actividade ovárica em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, **2** (6), 4-8.