

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÉMEN E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS DE RAÇA  
MERINO BRANCO E MERINO PRETO EM PROGRAMAS DE CONSERVAÇÃO GENÉTICA**

Gil Alexandre Gomes Lopes de Oliveira

Orientador:

**Prof. Doutor António Luís Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha**

Co-Orientadores:

**Prof. Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt**

**Doutora Mónica Morganti**

Porto 2018

## RESUMO

O estágio curricular feito ao longo de 16 semanas pelo autor, foi parcialmente realizado na Herdade da Abóbada (3 meses), em Serpa, concentrando-se principalmente na área da reprodução com o propósito de preservar raças autóctones de ovinos, caprinos, bovinos e suínos. O restante tempo (1 mês) foi realizado na área de Equinos em Inglaterra na Quinta de Twemlows Hall Stud Farm na localidade de Whitchurch Shropshire, na companhia da Doutora Mónica Morganti, Médica Veterinária especialista em reprodução de equinos.

Ambos os estágios possibilitaram ao autor obter conhecimento e experiência, observando duas realidades completamente distintas, sendo a primeira focada na gestão e trabalho a ser realizado num centro de recolha e congelação de sémen creditado para o efeito, onde conseguiu ganhar experiência em todo o processo de treino dos animais para a posterior recolha sémen e congelação do mesmo, principalmente de ovinos e caprinos, e também adquirir experiência em clínica e sanidade nas diversas espécies presentes na Herdade da Abóbada.

No estágio realizado em Inglaterra, o autor observou um caráter de trabalho distinto, acompanhando o dia a dia numa quinta de Equinos focada na área de reprodução. O trabalho realizado teve em vista não só a área mencionada, focada no acompanhamento e auxílio aos veterinários nos registos ecográficos, mas também em todo o maneio previsto, desde a limpeza de boxes, alimentação, encaminhamento de éguas para a sala das ecografias, contenção de éguas e poldros para a realização de tratamentos, exames de estado geral e desinfeção de lesões, administrações de fármacos e ajuda na realização de partos.

Apesar do trabalho ter sido realizado em duas áreas distintas o autor desenvolveu o tema da presente tese de mestrado na área de pequenos ruminantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de começar por salientar dois dos aspetos que mais me motivaram durante a realização deste trabalho, sendo eles a paciência e o apoio incondicional que várias pessoas demonstraram ao longo da minha vida e que foram fulcrais para a realização, não só deste trabalho como também de todo o Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

Ao meu orientador, Professor Doutor António Rocha, e Co-orientadores Professor Doutor Carlos Bettencourt e Doutora Mónica Morganti, por todo o apoio, dedicação, conhecimento e ensinamentos que transmitiram durante toda esta etapa e que levarei comigo para ultrapassar as etapas que me esperam no futuro.

Um obrigado a todos os colaboradores da Herdade da Abóbada, em especial à Dona Fátima, Dona Catarina, Dona Rosalina, ao Pastor António e à Doutora Matilde por todo o convívio, amizade, prazer e privilégio da sua presença, durante o tempo que passei em Vila Nova de São Bento. Foram pessoas excepcionais que sempre me demonstraram confiança para desempenhar as minhas funções. Dirijo também os meus sinceros agradecimentos à minha amiga e colega de curso Gabriela Dias, que me acompanhou durante parte do estágio, pela cumplicidade, companhia, amizade indiscreta e ajuda essencial nos registos de dados.

Os meus sinceros agradecimentos aos donos da quinta de Twemlows e Stallion AI Services Edward Matson e Tullis Matson pela oportunidade concedida em trabalhar num dos melhores locais da Europa na área de reprodução de equinos. Agradeço também a alguns colaboradores Jack George, Manuel Garcia, Megan Owen e Nikee Hudson. Neste âmbito, quero agradecer em especial à minha colega e amiga Nina Hamann, pela paciência, transmissão de conhecimentos e confiança depositada no meu trabalho.

A todo o meu núcleo familiar mãe, pai, irmão, avós, tios, tias, primos, namorada, cunhada, ama por todo o apoio e amor incondicional e por nunca terem deixado de acreditar em mim mesmo quando as coisas não correram bem. Ao meu Pai Virgílio e à minha Mãe Armanda por serem os meus pilares, por toda a fé depositada em mim, amor e valores transmitidos, que fazem de mim a pessoa íntegra que sou hoje e que sem os quais nada disto seria possível. Ao meu irmão Gustavo, por ser o meu ídolo e um exemplo excepcional na minha vida, pela bondade, disponibilidade total e apoio logístico que foi fulcral no meu ingresso no ICBAS. À minha cunhada Catarina, por toda a motivação, delicadeza, carinho, por me proporcionar momentos de felicidade pura e pelo seu coração generoso que faz o meu irmão tão feliz.

À minha namorada Filipa Lento, que foi um anjo que apareceu na minha vida, por todo o amor, carinho, lealdade e ajuda de valor inigualável que permitiu chegar até aqui sendo uma das pessoas mais importantes em todo este processo.

Ao meu avô Álvaro e à minha avó Fernanda, por me intitularem nos seus corações como o melhor do mundo e zelarem tanto por mim mesmo nos dias mais complicados, mantendo sempre a crença na minha pessoa. Às minhas tias Kikika, Graça e Romy, por todo o amor transmitido e pelo papel ativo que tiveram em toda a minha educação. Aos meus tios Toninho, Osório e Augusto e falecido Tio Tózé, pelo importante papel que tiveram na minha educação através da transmissão de valores indissociáveis. Aos meus primos, André, António, Diogo, Francisco, João, Miguel e Ricardo, por me relembrares a minha infância, pelos sorrisos e união. À minha Rosinha, ama e mãe, por me ter criado desde bebé na ausência dos meus pais e que fez de mim a pessoa que sou hoje. Às falecidas tia Isabel e prima Belinha, por tudo aquilo o que significam para mim, sendo sinónimo de amor, elegância, educação e trabalho.

Ao meu núcleo de amigos do secundário, Aninhas, Cinfas, Graçinha, Kikó, Inês, Rego, Mariana, Costinha, Pinho e Tari, por toda a amizade inigualável que, me moldou como “a” pessoa até aos dias de hoje.

Ao meu núcleo de amigos do ICBAS Náná, Alice, Beni, Cathy, Borges, Eva, Grilinho Chiquinha, Chico, Bouças, Costinha, Camarheiro, Lopes, Freitas, Kiko, Luciano, Mónica, Pépito, Rita Larcher, Tiago Costa, pelas conversas, pelos conselhos infalíveis, por me ajudarem a ultrapassar as adversidades, pela partilha de aprendizagens, pelo respeito, pela sinceridade e por potenciarem as minhas melhores qualidades, sendo uma verdadeira família que escolhi. Aos meus amigos de Coimbra, Inês Lucas, Joaquim Canotilho, Mónia, Nádia, Rui, Victor e Xuxu um obrigado pela partilha de momentos fantásticos que me levo comigo para a vida. Um especial agradecimento, ao Rómulo Pereira, pela presença constante, pela amizade, companheirismo e força transmitida, que me ajuda a ser uma pessoa melhor.

Um forte agradecimento, à Professora Corália Vicente, à Sónia, à Marisa, ao Dr. Migue França, ao Sr. Frias e Manuela Frias, por toda a gentileza, amabilidade e por tudo o que se prestaram a fazer por mim.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer simbolicamente aos meus cães, a falecida Branca, a Mia e o Summer, porque foi por eles que segui este caminho e por serem uma forte motivação para vencer todos os dias, durante todo este percurso, por me fazerem desejar ser aquilo que eles veem em mim e um dia poder fazer pelos outros aquilo que faço por eles e os torna tão especiais na minha vida.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES .....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vi
INDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
1. A RAÇA MERINA BRANCA.....	1
2. A RAÇA MERINA PRETA.....	2
3. FISIOLOGIA REPRODUTIVA.....	2
3.1 HORMONAS DA REPRODUÇÃO E A SUA REGULAÇÃO ENDÓCRINA .....	2
3.2 SAZONALIDADE REPRODUTIVA.....	4
3.3 CICLO ESTRAL.....	5
3.3.1 FASE FOLICULAR.....	6
3.3.2 ESTRO.....	7
3.3.3 OVULAÇÃO.....	7
3.3.4 FASE LÚTEA.....	8
4. SINCRONIZAÇÃO DO CIO.....	8
4.1 INDUÇÃO DA LUTEÓLISE.....	9
4.2 ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA.....	9
5. TREINO DOS CARNEIROS.....	12
6. AVALIAÇÃO DE SÉMEN.....	12
6.1 COLHEITA DE SÉMEN.....	12
6.2 MANUSEAMENTO DO SÉMEN.....	12
6.3 EXAME DO SÉMEN.....	13
6.3.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	13
6.3.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	13
6.4 DILUIÇÃO.....	14
6.5 CONGELAÇÃO.....	14
7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	15
7.1 VAGINAL.....	15
7.2 CERVICAL.....	15
7.3 TRANSCERVICAL OU INTRAUTERINA.....	15
7.4 INTRAUTERINA POR LAPAROSCOPIA.....	15
8. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	16
9. ESTUDO EXPERIMENTAL.....	16
9.1 INTRODUÇÃO.....	16
9.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
9.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL E MANEIO.....	17
9.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO.....	17
9.2.3 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO.....	18
9.2.4 EXPERIÊNCIA 1.....	19
9.2.4.1 Treino dos Carneiros.....	19
9.2.4.2 Recolha do Sémen pelo Método da Vagina Artificial.....	20
9.2.4.3 Avaliação e Diluição do Sémen.....	20
9.2.4.4 Inseminação Artificial Vaginal, Cervical e Intrauterina.....	20
9.2.5 EXPERIÊNCIA 2.....	21
9.2.5.1 Preparação do Diluidor.....	21
9.2.5.2 Recolha de Sémen pelo método da Electro-Ejaculação.....	22
9.2.5.3 Processamento e Congelação do Sémen.....	22
9.2.5.4 Inseminação Artificial Laparoscópica.....	23
9.2.5.5 Descongelação do Sémen e sua Avaliação.....	23
9.2.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	24
9.2.7 TESTES ESTATÍSTICOS.....	24
10. RESULTADOS.....	25
10.1 EXPERIÊNCIA 1.....	25
10.2 EXPERIÊNCIA 2.....	26
11. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	28
12. BIBLIOGRAFIA.....	31
ANEXOS.....	33

## **ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 - Protocolo de Sincronização de Cio.....	19
Figura 2 - Esquema representativo do treino dos carneiros no Centro Experimental .....	20

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1 - Resultados do diagnóstico de gestação conforme o tipo de inseminação.....	25
Tabela 2 - Descrição da amostra total. ....	26
Tabela 3 - Data de Recolha das esponjas. ....	26
Tabela 4 - Descrição da amostra com intervenção laparoscopia. ....	27
Tabela 5 - Diagnóstico de gestação relativam/ à Motilidade progressiva antes da congelação e após a descongelação. ....	27
Tabela 6 - Diagnóstico de gestação relativam/ aos carneiros utilizados para a laparoscopia. ....	28

## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 - Diagnóstico de gestação relativam/ aos carneiros utilizados para a laparoscopia.....	28
--	----

## INDICE DE ABREVIATURAS

% - Percentagem

> - Maior que

< - Menor que

CE - Ciclo éstrico

CH - Corpo hemorrágico

CL - Corpo lúteo

CG - Células da granulosa

E<sub>2</sub> - Estrogénio

eCG - Gonadotrofina coriónica equina

EE - Electro ejaculação

FSH - Hormona folículo estimulante

GnRH - Gonadoliberina

IA - Inseminação artificial

LH - Hormona luteinizante

MB - Merino Branco

MP - Merino Preto

P<sub>4</sub> - Progesterona

PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>

PGF<sub>2</sub>α - Prostaglandina F<sub>2</sub>α

VA - Vagina artificial

## 1. A RAÇA MERINA BRANCA

A Merina Branca é uma raça de ovinos autóctone cuja origem não é consensual entre autores, havendo quatro teorias possíveis para explicar a sua origem genética (ANCORME 2018). A maioria dos autores defende que esta descende do Merino Espanhol (*Ovis aris africana*) (Matos 1986). Por outro lado, a Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina defende que os Merino Ibéricos tiveram origem no tronco pré-histórico *Ovis Aires Vigney* proveniente das imediações do mar cáspio ou em ovinos autóctones primitivos, selecionados ao longo de várias gerações (ANCORME 2018), havendo, no entanto, quem defenda que este provém de uma espécie selvagem primitiva *Ovis arkal* oriunda da Ásia Menor (Matos 2000). O Merino Branco sofreu influência genética do Ramboillets e do Merino Precoce, raças ovinas francesas introduzidas há mais de 200 anos na Península Ibérica que tiveram uma grande influência nos Merinos de Portugal e Espanha (ANCORME 2018). Posteriormente, nos anos 50 a população Merina sofreu uma forte influência de raças exóticas, mais uma vez com o Merino Precoce e mais recentemente com o Ile de France e Merino Alemã (Matos 2000), com vista a um melhoramento da qualidade da lã e rusticidade anatómica. Esta última característica permite-lhe sobreviver em regiões com fraca pluviosidade e sujeitas a grandes amplitudes térmicas podendo suportar quebras alimentares durante vários períodos do ano (ANCORME 2018).

Os Merinos Brancos compreendem cerca de metade do efetivo ovino nacional, estando distribuídos maioritariamente pelo centro-sul de Portugal (ANCORME 2018). São animais com maior aptidão para carne e lã, sendo caracterizados pela “extensão de seu velo com lãs muito finas e frisadas e com toque suave”, podendo um macho adulto produzir um velo com pesos que variam entre os 4,5 e os 5 quilogramas (ANCORME 2018). A produção de carne provém fundamentalmente de borregos de pasto em geral desmamados com 4 a 5 meses de idade e 25 a 30 quilogramas de peso-vivo, obtendo em média um rendimento por carcaça de 48 a 50 por cento (ANCORME 2018). A produção de leite destes animais não é caracterizada pela abundância, com índices de produção de leite de 20-25 litros por animal com uma duração de ordenha de 90-100 dias (ANCORME 2018).

Algumas variantes físicas podem ser observadas em função das influências exercidas pelo meio ambiente e pelos criadores. No entanto, e segundo o protótipo racial que consta no regulamento de registo zootécnico da raça, são animais de “cor branca, cabeça de tamanho médio, larga, curta, bem revestida de lã que, por vezes cobre parte do frontal e faces. A cabeça apresenta perfil craniano subconvexo. O Chanfro é mais ou menos reto a convexo nos machos e reto nas fêmeas. A boca é grande com lábios grossos. Os olhos são grandes com arcadas orbitais não muito salientes. A existência de cornos é frequente nos machos, enrolados em espiral mais ou menos fechada, rugosos de secção triangular e ausentes nas fêmeas. Pescoço em geral sem pregas, curto e bem revestido de lã, possuindo por vezes uma pequena barbela. Tronco de volume



mediano com garrote pouco destacado, seguindo uma linha dorso lombar horizontal possuindo um ventre desenvolvido. A garupa é curta e ligeiramente descaída. A pele é fina untuosa e sem pigmentação. Têm úbere largo e bem inserido, com tetos curtos, mas bem implantados. Os membros anteriores e posteriores são fortes possuindo joelhos e curvilhões grossos, com revestimento lanar abaixo dos mesmos. O velo é muito extenso, homogéneo, cobrindo a cabeça, o pescoço, o ventre, os testículos e os quatro membros quase até as unhas” (Perloiro, et al. 2017).

## **2. A RAÇA MERINA PRETA**

A Merina Preta é uma raça de ovinos autóctone, com origem genética num Merino primitivo de lã pigmentada devido à sua ligação ao *Ovis aris vignei*, sendo o representante direto do ovino criado pelos Lusitanos e o mais fiel exemplar ovino do tronco étnico ancestral. O Merino Preto foi em tempos o Merino dominante em Portugal, achando-se na altura que a sua lã era de melhor qualidade. Posteriormente, devido as limitações relacionadas com a utilização de lã preta na indústria os Merinos Pretos começaram a ser substituídos por Merinos Brancos, de tal forma que em 1955 a população Merina Preta era um terço da existente em 1870 (ANCORME 2018). Atualmente a produção da raça Merina Preta compreende as sub-regiões da Beira Interior Sul, Alentejo Central, Baixo Alentejo e Alentejo Litoral (ANCORME 2018). As características morfológicas do Merino Preto são semelhantes as do Merino Branco, sendo as principais diferenças a pigmentação da pele e a menor corpulência possivelmente devido ao facto de não ter sofrido cruzamentos com raças exóticas mais pesadas. As suas qualidades e aptidões respeitantes aos aspetos reprodutivos, produção de carne, leite e lã são semelhantes ao Merino Branco (Perloiro, et al. 2017).

## **3. FISIOLOGIA REPRODUTIVA**

A Reprodução é regulada por uma interação entre o sistema nervoso e o sistema endócrino. Estes dois sistemas atuam de forma coordenada ajustando desta forma todas as funções reprodutivas. As hormonas produzidas e os produtos das suas ações são necessários para um ciclo reprodutivo bem-sucedido. As hormonas proteicas atuam na membrana citoplasmática das células enquanto as hormonas esteroides atuam através de recetores nucleares, resultando na produção de novas proteínas. Ambos os tipos de hormonas provocam mudanças na função das células alvo (Senger 2005).

### **3.1 HORMONAS DA REPRODUÇÃO E A SUA REGULAÇÃO ENDÓCRINA**

## **Hormonas Hipotalâmicas**

### **Gonadoliberina (GnRH)**

Função - Polipéptido constituída por 10 aminoácidos. A hierarquia das hormonas reprodutivas inicia-se com a libertação de GnRH por parte do hipotálamo de uma maneira pulsátil, para o plexo capilar da eminência média. Esta hormona está relacionada diretamente com a libertação de FSH e LH pela hipófise anterior, que possui recetores de GnRH. A ligação da GnRH ao seu recetor vai iniciar a produção de FSH e LH (Reece, 2007).

## **Hormonas Hipofisárias**

### **Hormona folículo estimulante (FSH)**

Função - Hormona glicoproteica que tem um papel essencial na reprodução, através da interação com os seus recetores gonadais. Esta ligação ao recetor ativa sinais celulares que levam à maturação das células germinais e crescimento folicular (Hammond 1960).

### **Hormona Luteinizante (LH)**

Função - Hormona glicoproteica, principal responsável pela ovulação e pela luteinização sendo este último o processo através do qual a LH transforma as células do folículo ovulatório (células da granulosa e teca interna) em tecido luteico. Estes processos são exequíveis devido à presença dos recetores de LH presentes nas células da teca interna, possibilitando desta forma a ovulação e posterior luteinização (Senger 2005).

### **Ocitocina**

Função - Hormona proteica, produzida no Hipotálamo e libertada na Neuro-hipófise Também é produzida ao nível placenta e corpo lúteo (CL) possuindo ações periféricas e cerebrais. Provoca contrações uterinas, tendo um papel essencial no parto, e promove a descida do leite. Tem também um papel fundamental na luteólise, induzindo a produção de recetores para a prostaglandina F<sub>2</sub>α (PgF<sub>2</sub>α). Os seus recetores são expressos em diversas partes do cérebro, espinal medula, amígdalas e tronco cerebral assim como na via mesolímbica sendo a hormona que mais relação tem com o orgasmo e conseqüente prazer sexual (Reece, 2007).

### **Prolactina**

Função - Hormona Proteica que inicia o comportamento maternal, lactogénese e a função do CL (Reece, 2007)

## **Hormonas Ovárias**

### **Estrogénio (E<sub>2</sub>)**

Função - Hormona esteroide dominante durante a fase folicular. Causa alterações profundas no trato reprodutivo preparando-o para a ovulação (Senger 2005). O Estrogénio estimula o crescimento das células da granulosa, aumenta a síntese do factor de crescimento semelhante à

insulina (IGF), mantém os recetores de FSH, induz a formação de recetores para LH e atenua a apoptose das células da granulosa. Os recetores de E<sub>2</sub>, tem um papel crítico no desenvolvimento das características sexuais secundárias da fêmea em mamíferos não primatas (lordose, vocalização e atividade física), assim como no desenvolvimento do trato reprodutor feminino (aumento da vascularização uterina, edema dos tecidos, secreção de muco, mobilização dos leucócitos, motilidade do musculo liso e crescimento das glândulas uterinas), manutenção da gestação e controlo do pico pré ovulatório de LH. Os recetores de E<sub>2</sub> estão expressos em muitos órgãos incluindo o hipotálamo, pituitária anterior, glândula mamária, útero e ovário (Hammond 1960).

### **Progesterona (P<sub>4</sub>)**

Função – Hormona esteroide dominante durante a fase lútea e principal responsável pela manutenção da gestação. Produzida no CL, exerce um efeito de “*feedback*” negativo nos neurónios hipotalâmicos produtores de GnRH, prevenindo desta forma o estro comportamental e impedindo conseqüentemente o pico pré-ovulatório de LH. Exerce também um efeito de “*feedback*” positivo no endométrio uterino, favorecendo a atividade secretora das glândulas endometriais. A progesterona inibe a contratibilidade do miométrio diminuindo assim a contratilidade e o tónus uterino (Reece, 2007).

### **Inibina e Ativina**

Função – Hormonas proteicas, que têm um papel regulador na glândula pituitária. Em geral a inibina possui a função de antagonista da activina e foi primariamente descrita como uma substância proteica que inibe a secreção de FSH, sendo produzida localmente em variados tecidos, incluindo o cérebro, pituitária, placenta, glândula adrenal e principalmente nas gónadas (Hammond, 1960).

### **Folistatina**

Função – Hormona proteica que é um regulador negativo da activina (Hammond, 1960)

## **Hormonas Uterinas**

### **Prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α)**

Função – Ecosanóide produzido no endométrio uterino na maioria dos mamíferos, tendo um papel fundamental na lutéolise (Reece, 2007).

## **Hormonas Placentárias**

### **Relaxina**

Função – Proteína produzida pela placenta e CL, tem um papel importante no parto na medida em que degrada o colagénio que liga a placenta ao útero (Reece, 2007).

## **3.2 SAZONALIDADE REPRODUTIVA**

A ovelha é considerada poliéstrica sazonal, com variações que dependem da raça e latitude em que se encontram (Spain, *et al.* 2007), sendo chamadas de reprodutoras de dias curtos, ou seja a sua época reprodutiva começa no outono/inverno quando há períodos menores de luz. Durante os períodos em que os dias são mais curtos, a glândula pineal que está localizada no cérebro, começa a secretar melatonina em maiores quantidades (Legan and Karsch 1979). O aumento da produção de melatonina vai ser responsável pelo início da época reprodutiva, começando desta forma a produção de GnRH e conseqüentemente de FSH e LH (Reece, 2007). Normalmente o primeiro e segundos ciclos éstricos da época reprodutiva são mais curtos que o normal, devido a malformações ou regressões prematuras do CL (Maxwell 1987). A atividade ovárica aumenta gradualmente, à medida que a época reprodutiva se aproxima do início, havendo desta forma, um período transitório entre o anestro e o estro, que acontece devido ao aumento gradual de gonadotrofinas na corrente sanguínea, mas não em quantidade suficiente para causar ovulação. No entanto, fêmeas que se encontram nesta fase respondem facilmente à estimulação artificial da ovulação com gonadotrofinas (Maxwell 1987). Nas ovelhas, a primeira ovulação da nova época reprodutiva, usualmente não é acompanhada de comportamento de cio, sendo chamada de estro silencioso. Este acontecimento está relacionado com o facto de a ovelha necessitar de um pré-condicionamento de progesterona do ciclo anterior para que o comportamento de estro seja totalmente expresso, não se devendo necessariamente à inadequada produção de E<sub>2</sub> (Maxwell 1987). Dentro das raças de ovinos os Merinos Australianos possuem uma época reprodutiva mais longa que a maioria das raças, apresentando ciclos éstricos regulares durante 6 meses. Por outro lado, algumas raças britânicas, possuem épocas reprodutivas curtas, apresentando apenas 4 ciclos éstricos por ano. Seja qual for a raça e latitude onde se encontram, todas as raças de ovelhas apresentam um período anual de inatividade sexual, ou seja, anestro; contudo, técnicas reprodutivas usadas em conjunto com inseminação artificial (IA) permitem obter, na maioria das raças, uma época reprodutiva durante todo o ano (Maxwell 1987).

### **3.3 CICLO ESTRAL**

O ciclo éstrico consiste numa série de eventos reprodutivos previsíveis, começando no estro (cio) e acabando no estro subsequente, tendo uma duração aproximada de 16-17 dias (alcance 14-19) (Maxwell 1987). Estes intervalos podem ser mais curtos 1-2 dias em fêmeas mais nova (Spain, *et al.* 2007) .

O ciclo éstrico, pode ser dividido grosso modo em duas fases, a fase folicular sendo este o período de desenvolvimento folicular (duração de 3-4 dias) e a fase lútea, definida como período do CL (duração de 13-14 dias). O estro ocorre na fase final do período folicular (Maxwell 1987) e a sua

duração varia de 12-50 horas, ocorrendo a ovulação no final do estro, 24 a 30 horas após o seu início (Hafez, 2003).

O ciclo éstrico pode ainda ser dividido em maior detalhe em Proestro que corresponde à fase em que ocorre o início da formação dos folículos ovulatórios e o início da secreção de  $E_2$ . A seguinte fase o Estro, representa o início da recetividade sexual devido ao pico de secreção de  $E_2$ , seguido do pico de LH e conseqüente ovulação. O Metaestro começa com a formação do corpo hemorrágico e subseqüente formação do CL dando início à produção de progesterona ( $P_4$ ) por parte do mesmo. Por fim o Diestro em que se observa uma secreção lútea sustentada de  $P_4$  por parte do CL (Senger 2005).

### **3.3.1 FASE FOLICULAR**

A fase folicular representa o período entre a regressão do CL e a ovulação consistindo em 4 eventos principais sendo eles caracterizados pela libertação de GnRH do lobo anterior da pituitária, preparação do folículo para a ovulação, recetividade sexual e ovulação. Este período compreende apenas 20% do ciclo éstrico e é iniciado após a luteólise, levada a cabo pela  $PgF_{2\alpha}$ , resultando numa redução marcada da  $P_4$ . Assim o “*feedback*” negativo causado pela  $P_4$  no hipotálamo é removido, e a GnRH é libertada a amplitudes e frequências mais elevadas do que na fase lútea precedente.

O proestro e o estro, estão englobados na fase folicular, sendo esta fase controlada pelo hipotálamo, o lobo anterior da pituitária e principalmente pelo o ovário, que inicia a produção de  $E_2$  na ausência de  $P_4$  (Senger 2005).

No entanto o crescimento folicular ocorre continuamente ao longo do ciclo éstrico. Folículos antrais de vários tamanhos desenvolvem-se em resposta aos níveis tónicos de FSH e LH estando estes folículos sempre presentes em diferentes tamanhos (pequeno, médios e grandes). Na dinâmica dos folículos antrais estão envolvidos 4 processos, sendo eles a atresia que é definida como a degeneração de folículos antrais; o recrutamento em que ocorre a formação de grupos de pequenos folículos antrais que iniciam o seu crescimento e produção de  $E_2$ , explicado pelo aumento da concentração dos níveis sanguíneos de FSH, diminuição de LH e ausência de produção de inibina; a seleção que consiste na escolha dos folículos que não iniciam o processo de atresia, havendo uma diminuição da produção de FSH, síntese moderada de LH e níveis baixos de inibina na corrente sanguínea; e por ultimo a dominância onde os folículos selecionados, se mantêm em crescimento e se tornam dominantes devido a uma diminuição dos níveis de FSH, um aumento de LH e inibina e à diminuição da  $P_4$  (Senger 2005). Os níveis de  $E_2$  aumentam na corrente sanguínea e alcançam a concentração máxima (pico) mesmo antes do começo do estro (Legan and Karsch 1979).

### 3.3.2 ESTRO

O estro ou cio é a fase do ciclo éstrico em que a fêmea demonstra comportamento e atividade sexual, e é o único período de aceitação do macho. A duração do estro nas ovelhas varia entre as 12 e as 50 horas (Hafez, 2003). Este período varia com a raça (em ovelhas Merinas adultas a duração do estro é geralmente 24-42 horas), idade (estro é mais curto em fêmeas jovens), localização geográfica e contato com machos (Maxwell 1987). Durante o estro há um aumento do fluxo sanguíneo e da atividade secretora das glândulas do útero, cérvix e vagina, observando-se uma abundante secreção de muco que se acumula na vagina e ocasionalmente se exterioriza na vulva (Spain, *et al.* 2007). O tipo e consistência do muco é claro e escasso no início, após 12-18 horas vai de claro a nublado e copioso e às 25-30 horas torna-se mais grosso e de consistência mais cremosa (Maxwell 1987). Os sinais externos de estro são pouco marcados em ovelhas, mas podem incluir, edema da vulva com descarga vaginal de muco como já referido anteriormente, acompanhado de inquietude, abanar a cauda e aproximação e a procura do macho. O sinal mais seguro de cio por parte da fêmea é o “reflexo de parar” ou “reflexo de imobilidade” (Bettencourt and Bettencourt 2016) e consequente aceitação por parte desta à monta do macho. Apesar dos machos serem considerados agressivos as fêmeas em estro vão frequentemente à sua procura, forçando a sua atenção sobre ela, observando-se nessa situação particular, um macho rodeado por um “harém” de fêmeas competindo pela sua atenção. Assim, na deteção de cio podem ser utilizados machos vasetomizados equipados com arreios marcadores (Maxwell 1987).

### 3.3.3 OVULAÇÃO

A ovulação é um evento que implica a destruição programada de tecido folicular. O pico pré-ovulatório de LH é de extrema importância, pondo em marcha uma série de eventos bioquímicos que vão levar à ovulação (figura 3, anexo I). Um desses importantes eventos é a produção local de  $P_4$  por parte das células da teca interna. A produção de  $P_4$  vai estimular a síntese da enzima colagenase. Esta enzima vai levar a cabo a rutura de colagénio do tecido que envolve o ovário (túnica albugínea). Outro importante acontecimento é a produção de prostaglandina  $E_2$  ( $PgE_2$ ) e de  $PgF_{2\alpha}$ . A  $PgF_{2\alpha}$  vai provocar a contração do músculo liso ovárico e leva a cabo a ativação e rutura de lisosomas existentes nas células da granulosa libertando desta forma enzimas que vão executar a degradação de tecido ovárico. A  $PgE_2$  promove a remodelação do tecido folicular que vai levar á formação do CL, através da produção de plasminogénio resultando na dissolução dos coágulos que formam o corpo hemorrágico (CH). O aumento do fluxo sanguíneo no ovário é provocado maioritariamente pela  $PgE_2$  e a histamina. A acompanhar este aumento do fluxo sanguíneo no ovário a teca interna torna-se edematosa principalmente devido à permeabilidade vascular induzida pela histamina. Esta condição observada causa uma elevação da pressão hidrostática em torno do folículo o que facilita a sua rutura. Aliado a isto os folículos dominantes

produzem fatores angiogénicos (substâncias que levam à formação de novos vasos sanguíneos) que providenciam ao folículo pré ovulatório as hormonas e metabolitos necessários para a sua maturação final (Senger 2005).

A ovulação pode ser estimulada através de métodos farmacológicos e métodos naturais. Os métodos farmacológicos usados são baseados na suplementação dos animais com gonatropinas (eCG i.m. ou s.c. 1-2ml) e técnicas de imunização (imunização contra a inibina) enquanto que os métodos naturais são à base do efeito macho e efeitos nutricionais (Maxwell 1987).

### **3.3.4 FASE LÚTEA**

A fase lútea é o período compreendido entre a ovulação (ruptura do folículo de Graaf que dá origem ao CH durante 4-5 dias (Maxwell 1987)), até à regressão do CL e ocupa cerca de 80 % do ciclo éstrico (Senger 2005). Esta fase pode ser dividida em 3 processos principais, sendo eles: 1) transformação das células foliculares em células lúteas sendo este processo conhecido como luteinização (metaestro); 2) crescimento e desenvolvimento do CL produzindo grandes quantidades de P<sub>4</sub> (diestro); 3) destruição do CL pela PgF<sub>2</sub>α (luteólise), resultando numa fase folicular subsequente, como resultado da diminuição dos níveis sanguíneos de P<sub>4</sub>. A fase lútea do ciclo éstrico é constituída pelo Metaestro e o Diestro. Durante esta fase a estrutura ovárica dominante é o CL e a hormona reprodutiva primária é a P<sub>4</sub> que atinge o seu pico 6 dias após a ovulação e regride ao fim de 11-12 dias, caso a fêmea não fique gestante. Apesar da fase lútea ser dominada pela P<sub>4</sub> proveniente do CL, os folículos continuam a aumentar e a diminuir de tamanho produzindo concentrações baixas de E<sub>2</sub> (Senger 2005).

## **4. SINCRONIZAÇÃO DO CIO**

Há vários métodos para sincronizar o cio que se englobam em duas grandes categorias, os métodos naturais e os métodos farmacológicos. O método natural, conhecido como “efeito macho”, é mais barato, mas menos eficaz e só pode ser usado em certas regiões e em períodos do ano específicos. O método farmacológico incorre em algumas despesas, mas é mais eficaz permitindo predeterminar o dia da inseminação artificial. O método farmacológico, pode ser dividido em dois tipos baseado nos diferentes princípios fisiológicos. O primeiro assenta na administração de PgF<sub>2</sub>α ou análogos sintéticos com o objetivo de diminuir o tempo de vida do CL. Este método está dependente da presença do CL só podendo ser usado na época reprodutiva. O segundo método é baseado na administração de progestagénios sintéticos ou naturais (progesterona) com o objetivo de estimular o CL (Maxwell 1987).

O desafio da maior parte dos programas de controlo hormonais reprodutivos nas ovelhas são a sincronização do ciclo éstrico durante a época reprodutiva de outono e de inverno; a indução de

um estro fértil no final do inverno e no início do período de anestro da primavera e o prolongar da época reprodutiva até o período de transição de verão (Spain, *et al.* 2007).

Os objetivos do produtor vão requerer uma decisão baseada na estação do ano. Por outras palavras, o produtor tem de determinar qual a proporção de ovelhas que estão a ciclar e as que não estão a ciclar. Para determinar tal condição há 3 abordagens possíveis, sendo elas a verificação das ovelhas que entram em cio durante o período de um ciclo éstrico (16.5 dias) através do “efeito macho”; determinar a proporção de ovelhas que entram em cio por dia como guia para estimar a proporção de ovelhas do rebanho que estão a ciclar e medir os níveis de progesterona no sangue (Spain, *et al.* 2007).

#### **4.1 INDUÇÃO DA LUTEÓLISE**

A  $PgF_{2\alpha}$  induz a regressão do CL em ovelhas cíclicas. No entanto é completamente ineficaz em ovelhas que não apresentam CL, tais como ovelhas em anestro ou pré-púberes (Spain, *et al.* 2007)

A administração de  $PgF_{2\alpha}$  num rebanho de ovelhas cíclicas sincronizará o estro em 60% a 70% das ovelhas, 30 a 48 horas após o tratamento. Na verdade, o intervalo entre o tratamento e o aparecimento do estro depende do dia do ciclo éstrico em que se administra a  $PgF_{2\alpha}$ . A proporção de ovelhas que não respondem ao tratamento pode ser explicado pelo facto de estas não se encontrarem cíclicas; estarem no processo de formação de um novo CL; estarem no processo de regressão do CL e encontrarem-se no estágio final de prenhez (Spain, *et al.* 2007). As prostaglandinas sintéticas usadas são o Cloprostenol cujo o nome comercial é Estrumate® com a dose de 125 mg e o Prosolvin® (Intervet) com a dose de 3.75 mg. O Lutalyse® é uma prostaglandina natural utilizando-se uma dose de 15mg. Todas elas são administradas pela via I.M. (Maxwell 1987).

É de salientar que o CL só responde ao tratamento entre os dias 5-14 do ciclo éstrico. No entanto para uma sincronização eficaz de todo o rebanho são necessárias duas administrações de  $PgF_{2\alpha}$  com um espaçamento de 10-14 dias de intervalo. Segundo, (Maxwell 1987) foi demonstrado que intervalos de 14 dias são mais vantajosos. O estro irá ocorrer dentro de 2-3 dias após a segunda administração.

#### **4.2 ADMINISTRAÇÃO DE PROGESTERONA**

Neste método a  $P_4$  é administrada diariamente durante 12-14 dias sendo este o tempo de vida útil do CL. No final do tratamento o estro irá ocorrer usualmente ao fim de 2-3 dias. O tratamento atua da mesma forma que o CL, sendo suprimido o “output” de gonadotrofinas pela pituitária. Quando o tratamento com  $P_4$  é retirado, a pituitária liberta grandes quantidades de gonadotrofinas que estimulam o crescimento dos folículos e a subsequente ovulação. Os progestagénios são mais



eficazes em ovelhas cíclicas do que em ovelhas não cíclicas e podem ser usados em qualquer altura do ano mesmo em ovelhas prenhas sem produzir qualquer problema para o feto (Maxwell 1987).

A vantagem dos progestagénios como agente sincronizador do cio deve-se à sua capacidade para atrasar o estro e a ovulação, à facilidade de administração, ao tempo de administração, à rapidez com que podem ser removidos do organismo e pelo seu efeito na fertilidade subsequente. As diferentes propriedades dos progestagénios permitiram o desenvolvimento de várias abordagens e técnicas para a realização de protocolos de sincronização em ovelhas, sendo possível a administração de progesterona através de: 1) injeções IM SID ou BID; 2) dispositivos intravaginais; 3) implantes subcutâneos de vários tamanhos e 4) aditivos no alimento (Spain, *et al.* 2007). Os métodos mais convenientes envolvem o manejo das fêmeas apenas duas vezes durante todo o processo, uma aquando da administração e outra na altura da remoção do fármaco. No momento da remoção podem ser usados estimuladores da ovulação (Bettencourt and Bettencourt 2016). Têm vindo a ser utilizados quer dispositivos intravaginais quer implantes subcutâneos de progesterona sendo no entanto, que por conveniência e simplicidade os dispositivos intravaginais têm sido mais utilizados (Bettencourt and Bettencourt 2016).

- **Progesterona Injetável**

Utiliza-se progesterona em excipiente oleoso com administrações diárias 5-25 mg IM (Spain, *et al.* 2007) .

- **Dispositivos Intravaginais**

Existem dois tipos de dispositivos intravaginais, o pessário ou esponja impregnada em progesterona e o “controlled internal drug realeasing dispencer” (CIDR). Segundo alguns autores, o CIDR nunca foi testado suficientemente para determinar com precisão os seus efeitos na fertilidade (Maxwell 1987). No entanto, outros autores referem que em termos de fertilidade não há diferenças consideráveis entre os dois dispositivos, realçando a maior facilidade de inserção intravaginal do CIDR em relação às esponjas, as menores perdas de dispositivos e menos irritações vaginais com menor acumulação de fluido (Spain, *et al.* 2007) . Apesar disto, a esponja de progesterona é provavelmente o método mais utilizado (Bettencourt and Bettencourt 2016), havendo a produção deste dispositivo com o nome comercial de Chronogest® (Intervet) ou Repromap® (Upjohn). As esponjas Chronogest®, contêm 30,40 ou 45 mg de acetato de fluorgesterona. As esponjas de 30 mg são indicadas para o uso em ovelhas que se encontram em anestro sazonal, as de 40 mg são recomendadas para o uso em ovelhas na época reprodutiva e no caso de fêmeas nulíparas ou primíparas enquanto que as esponjas de 45 mg são usadas

apenas em cabras. As esponjas Repromap®, contêm 60 mg de acetato de medroxiprogesterona e são aplicadas em qualquer das situações anteriormente referidas (Maxwell 1987).

As esponjas intravaginais possuem um fio que facilita a sua remoção, enquanto que sua inserção é efetuada através do auxílio de um aplicador com um tubo de plástico e um espéculo (figura 4, Anexo I). O aplicador é desaconselhado no caso de fêmeas nulíparas ou primíparas por estas possuírem vaginas muito apertadas, sendo recomendada a aplicação da esponja manualmente através da inserção dos dedos na vagina (Maxwell 1987). A remoção da esponja, deve ser realizada manualmente após o período recomendado (12-14 dias). Ocasionalmente, o fio pode ficar encarcerado dentro da vagina, podendo ser facilmente confundido com a queda da esponja. (Spain, *et al.* 2007). A retirada da esponja é acompanhada frequentemente por descarga vaginal. Esta descarga é normal, exceto quando é acompanhada de exsudado sanguino-purulento, havendo nestes casos a necessidade de administração de antibiótico e as fêmeas devem ser retiradas do programa de inseminação. Após a retirada das esponjas, a maioria das ovelhas entrará em cio em 2-3 dias (Maxwell 1987). Os produtores referem uma perda de esponjas entre os 2% e os 25% (Spain, *et al.* 2007).

- **Implantes Subcutâneos**

O princípio ativo dos implantes subcutâneos é o Norgestomet (Syncro-mate-B®). Cada implante, contém 6mg de Norgestomet. São colocados subcutaneamente, caudalmente ao pavilhão auricular (Spain, *et al.* 2007) ou nos membros anteriores, cranealmente ao cotovelo (Maxwell 1987). O implante é removido através de uma pequena incisão na base deste (Spain, *et al.* 2007), feita com um bisturi, sendo retirado de seguida com o auxílio de fórceps. Este método é tão eficaz como as esponjas intravaginais. Apesar deste facto, não é tão popular como os previamente descritos por envolver procedimentos cirúrgicos, consumindo desta forma mais tempo e dinheiro, sendo também mais stressante para os animais que podem sofrer infeções devido às feridas abertas provocadas pela remoção do implante (Maxwell 1987). Após a colocação, o implante é retirado ao fim de 10-14 dias (Spain, *et al.* 2007) .

- **Progestagénio Oral**

O acetato de melengestrol é o único progestagénio oral existente no mercado. A forma de administração oral compreende a sua diluição BID no alimento de 0,125 mg de princípio ativo durante 8 a 14 dias, sendo de alguma forma menos eficaz na sincronização de cio que as esponjas, o CIDR ou mesmo os implantes (Spain, *et al.* 2007) .

## **5. TREINO DOS CARNEIROS**

O método preferível para a recolha de sémen é através do uso da vagina artificial. Os carneiros selecionados devem ser treinados 2 a 3 semanas antes do começo do programa de inseminações (Maxwell 1987). O método de treino está representado na figura 5 no Anexo I e descrito no Estudo experimental na experiência 2 no ponto 9.2.4.1.

## **6. AVALIAÇÃO DE SÉMEN**

### **6.1 COLHEITA DE SÉMEN**

Existem dois métodos para efetuar recolhas de sémen, com vagina artificial (VA) (figura 6 [B], Anexo I) e o método da electro-ejaculação (EE). O método da VA é preferível na medida em que se aproxima mais do processo natural da cópula (Bettencourt and Bettencourt 2016), sendo desta forma menos stressante para os animais e resulta na colheita de sémen de melhor qualidade (Maxwell 1987). A VA (figura 6 [A], anexo I) é uma imitação da vagina da ovelha e proporciona aos machos estimulação térmica (42°C-45°C) e mecânica, sendo ambos os estímulos necessários para que ocorra a ejaculação. A maior desvantagem deste método é que implica o treino prévio dos machos (Maxwell 1987). O método da EE (figura 6 [C], Anexo I) é usado quando há necessidade de obter sémen de carneiros que não estão treinados para a recolha pelo método da VA (Maxwell 1987). As principais desvantagens da EE são o desconforto inferido ao animal (estimulações de 10-15 volts via retal), a baixa frequências de colheitas que este método permite por animal por dia e a contaminação com urina e células de descamação durante a recolha. O sémen colhido através deste meio, possui geralmente maior volume (apesar da diferença não ser significativa), mas uma concentração menor e uma percentagem menor de espermatozoides vivos do que o sémen colhido pelo método da vagina artificial (Mattner and Voglmayr 1962). No entanto a EE, apesar de ser mais traumatizante para o animal é mais rápida, sendo portanto mais útil para testar a fertilidade de um número elevado de machos (Maxwell 1987).

### **6.2 MANUSEAMENTO DO SÉMEN**

O sémen de carneiro é muito sensível a uma série de fatores que podem afetar a sobrevivência dos espermatozoides pelo que é necessário extremo cuidado no seu manuseamento. Os fatores a ter em conta são, a temperatura (aquecimento dos tubos e diluidor para evitar o coque térmico), a exposição do sémen à luz Solar, o contato com metal, o contato com a água (choque osmótico), a exposição do sémen a bactérias e impurezas, contato com desinfetantes, a longa exposição ao ar, a capacidade tampão do diluente e a osmolaridade do diluente (Maxwell 1987).

### 6.3 EXAME DO SÉMEN

O exame do sémen, é efetuado mediante a sua avaliação macroscópica e microscópica. A avaliação macroscópica é realizada tendo em conta o volume, consistência, cor e cheiro. A avaliação microscópica incide na observação da motilidade massal, motilidade progressiva, concentração e morfologia (Maxwell 1987).

#### 6.3.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

**Volume** - O volume varia de 0,5 a 1,5 mL e pode ser avaliado através de um recipiente calibrado (Maxwell 1987), podendo variar mediante a frequência e o tipo de recolha (Spain, *et al.* 2007) . O volume pode também ser aferido pelo peso (1g = 1mL).

**Consistência** - Varia de cremosa a leitosa e aquosa (Tabela 9, Anexo I) (Spain, *et al.* 2007) e está relacionada, em condições fisiológicas, com a concentração.

**Cor e Cheiro** - A cor normal do sémen vai de branco a cor creme. Sémen rosado normalmente indica contaminação sanguínea; cinzento ou castanho pode ser indicativo de infeção no trato reprodutivo e amarelo urina. Odores anormais podem ser indicativos de contaminações com urina e sangue (Spain, *et al.* 2007).

#### 6.3.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

**Motilidade massal** - Ao microscópio, o sémen apresenta um movimento de onda característico que só acontece em espécies que apresentam sémen com uma concentração muito alta, como é o caso do carneiro. É mais usada para avaliar a mobilidade em sémen fresco. A técnica traduz-se na aplicação de uma gota de sémen numa lâmina, analisando-se a mobilidade ao microscópio em placa aquecida a 37° C, com uma baixa ampliação. O exame é feito a partir da atividade das ondas, aplicando-se uma escala de 0 pontos, quando a mobilidade das ondas é inexistente, a 5 pontos quando se observa uma mobilidade por onda muito elevada (Tabela 8, Anexo I) (Spain, *et al.* 2007).

**Motilidade progressiva** - é mensurada através da observação ao microscópio com uma ampliação de 400x. Analisa-se individualmente o movimento dos espermatozoides. Deve ser colocada uma pequena gota de sémen, numa lâmina pré-aquecida a 37° cobrindo-a posteriormente com uma lamela (com o auxílio de uma pipeta, contendo 10 µl de sémen puro, e apenas com um ligeiro toque, sobrepor na gota de diluidor, uma quantidade equivalente a menos de uma gota de sémen ( $1/10$  da gota de diluidor). O microscópio deve possuir uma placa de aquecimento para manter a temperatura. O operador deverá analisar vários campos para posteriormente estimar a proporção (%) de espermatozoides móveis (Maxwell 1987).

**Concentração** - Um ejaculado normal contém 3.5 a 6.0 biliões de espermatozoides por mililitro (Spain, Lucy, and Hardin 2007). A determinação da concentração pode ser efetuada por contagem

através de um hemocitómetro, utilizando um colorímetro, ou um fotómetro adequado e calibrado para o sémen das diferentes espécies (Maxwell 1987).

**Morfologia** - O exame morfológico do sémen é um teste detalhado da sua qualidade. O corante eosina-negrosina é usado por rotina para avaliar a morfologia dos espermatozoides. As possíveis anomalias observadas ao microscópio (objetiva de 10x e 100x com óleo de imersão) são: cabeças soltas, macrocefalia, microcefalia, caudas enroladas, cabeça em forma de cone, pescoço partido, peça intermédia partida e anomalia acrossómica.

#### **6.4 DILUIÇÃO**

A diluição do sémen é feita por razões técnicas e biológicas, podendo o diluente ser de origem sintética ou natural (leite de vaca). As razões técnicas prendem-se com facto de a realização deste processo permitir a preparação de inúmeras doses de sémen para IA verificando-se desta forma um maior aproveitamento do mesmo. As razões biológicas são justificadas com o facto de o diluente providenciar aos espermatozoides um ambiente isotónico, capacidade tampão contra mudanças de pH, nutrientes e proteção contra o choque térmico aquando da refrigeração e congelação do sémen (Maxwell 1987). Os ingredientes do diluidor sintético Maxwell estão representados na tabela 9 no Anexo I.

#### **6.5 CONGELAÇÃO**

A congelação de sémen é realizada a temperaturas muito baixas em azoto líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  negativos, com o propósito de suspender por completo o metabolismo dos espermatozoides (Maxwell 1987). Este processo possibilita a preservação de sémen por períodos prolongados, garantindo desta forma a conservação de património genético (Bettencourt and Bettencourt 2016). O congelamento do sémen pode ser efetuado em “pellets” ou em palhinhas. O congelamento do sémen em palhinhas é realizado através do arrefecimento das mesmas de  $30^{\circ}$  para  $5^{\circ}\text{C}$  em 1.0 a 1.5 horas numa câmara de refrigeração. Posteriormente as palhinhas são posicionadas na horizontal num equipamento designado “floating freezing rack” ficando estas no interior de uma caixa de esferovite a uma altura de 3-4 cm do azoto líquido, durante 7 a 8 minutos estando este tempo sobre a influência térmica dos vapores de azoto ( $-80$  a  $-100^{\circ}\text{C}$ ). No final são emersas no azoto líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), colocadas dentro de visotubos preenchidos com azoto líquido e armazenadas num contentor de armazenamento de sémen (Maxwell 1987)

## **7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

### **7.1 VAGINAL**

Técnica que consiste na deposição de sémen fresco diluído na vagina anterior sem localizar o cervix. É realizada através da introdução da bainha de inseminação pela parede dorsal na vagina, com o objetivo de evitar a sua introdução acidental na uretra. A vagina deverá ser limpa com algodão antes da inserção da bainha de sanitária (Maxwell 1987).

### **7.2 CERVICAL**

Técnica que consiste na abertura da vagina e localização da entrada do cervix (“flor desabrochada”), realizada com o auxílio de uma lanterna e um espéculo lubrificado inserido paralelamente aos lábios vaginais, a uma profundidade de 10-13 cm. Após a localização do cervix o inseminador deverá inserir a bainha o mais profunda possível através do canal cervical sem usar a força e depositar o sémen fresco diluído a uma profundidade de 1 a 3 cm. A vagina deverá ser limpa com algodão antes da inserção da bainha de sanitária (Maxwell 1987).

### **7.3 TRANSCERVICAL OU INTRAUTERINA**

Técnica semelhante à anterior que ocorre no caso de o cervix permitir a passagem da bainha sanitária através do canal cerviçal até ao útero, sendo considerada um IA intrauterina não cirúrgica (Maxwell 1987).

### **7.4 INTRAUTERINA POR LAPAROSCOPIA**

A inseminação intrauterina por laparoscopia é realizada com equipamento especializado utilizando-se pequenas quantidades de sémen. Tem uma taxa de sucesso (percentagem de prenhez) aproximada de 65%, no entanto, esta taxa é dependente da qualidade do sémen, época do ano, condições em que as ovelhas se encontram e da experiência do operador (Spain, *et al.* 2007). As principais desvantagens são os custos associados ao equipamento, o facto de ser um procedimento invasivo e da necessidade de se ter consideráveis conhecimentos técnicos necessários para realizar o procedimento (Gourley, 1990). As ovelhas antes do procedimento devem ser mantidas em jejum nutricional 24h e 36h, assim como em jejum hídrico entre 12h a 18h de forma a diminuir o tamanho do rúmen e o seu preenchimento, diminuindo desta forma a possibilidade de regurgitação e permitindo uma melhor visualização do útero (Spain, *et al.* 2007). As ovelhas são tipicamente sedadas entre 30 a 45 minutos antes da inseminação, com 5 a 10mg de acepromazina IM, de preferência num local sem acesso a ruídos para minimizar o stress. Os animais são contidos em decúbito dorsal numa maca. A tricotomia é feita 10cm a 20cm cranealmente às glândulas mamárias (Spain, *et al.* 2007). Em seguida, é realizada a preparação do campo cirúrgico (desinfecção) e feita a anestesia local, aproximadamente 5 a 7 cm cranial ao ubere e 3 a 4cm em cada lado da linha média. Durante o procedimento, é preciso ter cuidado para evitar os grandes vasos. Neste momento, a maca é inclinada para que a ovelha fique com a cabeça posicionada num ângulo de 45 graus com o chão (Spain, *et al.* 2007) . Os órgãos abdominais são

deslocados cranealmente para permitir a visualização da bexiga, reto e útero. O trocâter é introduzido no abdómen no local das áreas anestesiadas, e com o uso do CO<sub>2</sub> insufla-se o abdómen (figura 10, anexo III), usa-se um segundo trocâter que também é introduzido através das áreas anestesiadas. Ambos os trocâteres, são removidos e o laparoscópio é inserido pelos pontos de acesso feitos pelos mesmos, permitindo deste modo a identificação dos órgãos (figura 11, anexo III) (Spain, *et al.* 2007). O útero geralmente localiza-se dorsalmente à bexiga e à gordura omental caudal. Após o útero ser identificado e movido para a posição adequada, introduz-se a pipeta de inseminação dirigida para o útero a meio caminho entre a bifurcação intercornual e o corno uterino. É colocado rapidamente metade da dose do sémen no lúmen num corno uterino e a restante no outro corno uterino. Após a inseminação, a pipeta é removida, e depois o laparoscópio. O abdómen é desinsuflado e as cânulas removidas (Spain, *et al.* 2007). A hemorragia é interrompida por pressão, sutura ou agrafos nos locais de punção. Alguns operadores optam por encerrar todos os orifícios por sutura, enquanto que outros só o realizam se estritamente necessário. Antibioterapia profilática deve ser administrada (Spain, *et al.* 2007).

## **8. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO**

O diagnóstico de gestação em ovelhas é uma importante ferramenta prática com um grande impacto económico. A possibilidade de realizar o diagnóstico de gestação numa fase precoce, podendo determinar o número de fetos, estimar o dia de gestação e anomalias na gravidez é uma grande vantagem para os produtores. Existem vários métodos para a realização do diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes, mas o mais usado e eficaz é a ultrassonografia em tempo real (modo B). A ultrassonografia baseia-se na emissão de ultrassons com frequências que variam entre os 3.5 e os 7.5 MHz. Operadores competentes são capazes de analisar o estado de prenhez de centenas de ovelhas por dia com uma precisão de 95 a 98%. O diagnóstico de gestação é baseado em três imagens primárias, sendo elas o fluido (dia 30-45), placentomas e as estruturas fetais (dia 35 batimento cardíaco e dia 45 estruturas ósseas). O fluido e as vesículas trofoblásticas são as indicações mais precoces do diagnóstico de gestação. Regra geral o diagnóstico de gestação faz-se entre os dias 45 e 90, isto porque podem ocorrer falhas em fases iniciais da gestação se a sonda não for colocada corretamente no flanco (Spain, *et al.* 2007).

## **9. ESTUDO EXPERIMENTAL**

### **9.1 INTRODUÇÃO**

O âmbito do programa de preservação de raças autóctones veio possibilitar o desenvolvimento do presente estudo. O programa de preservação de raças autóctones inclui a colheita de 200 palhinhas de sémen por cada 7 carneiros de cada raça de ovinos. As raças incluídas no programa de conservação durante o tempo em que o autor realizou o seu trabalho na Herdade da Abóbada

foram a Bordaleira entre Douro e Minho, Campaniça, Churra do Minho, Merino Branco e Merino Preto. No entanto, uma vez que há um efetivo permanente Merino Branco e Merino Preto na Herdade da Abóbada, o estudo foi realizado animais destas raças.

Para a realização dos estudos foram usadas 124 ovelhas, 60 da raça MB e 64 da raça MP e 12 carneiros, 6 da raça MB e 6 da raça MP. Destas 124 fêmeas, 38 foram utilizadas para IA laparoscópica com sémen congelado, sendo os restantes 86 animais inseminadas com sémen fresco diluído. Desta forma dividiu-se o trabalho em duas experiências; **experiência 1** que engloba o total de ovelhas inseminadas - 86 ovelhas inseminadas com sémen fresco de 8 carneiros e 38 ovelhas inseminadas com sémen congelado dos restantes 4 carneiros. A **experiência 2** focou-se especificamente nas 38 ovelhas inseminadas artificialmente pela técnica laparoscópica, com sémen congelado de 4 carneiros.

A **experiência 1** consistiu: 1) No treino dos carneiros para recolhas de sémen com VA, 2) comparar resultados de fertilidade em base ao método de IA, 3) avaliar o efeito da idade, da condição corporal e da raça na taxa de prenhez do rebanho, 4) avaliar a taxa de prenhez total do rebanho.

A **experiência 2** teve como objectivo 1) avaliar a qualidade *in vitro* do sémen fresco e após a descongelação de 4 carneiros, 2 da raça MB e 2 da raça MP, 2) avaliar a fertilidade real do sémen descongelado através da técnica da IA laparoscópica em 38 ovelhas, 18 da raça MB e 20 da raça MP, 3) verificar da possível existência de uma relação entre o método de recolha, a motilidade progressiva e a taxa de prenhez, 4) verificar a correlação entre idade da ovelha, raça e condição corporal com a taxa de prenhez e por fim 5) relacionar o dia da retirada das esponjas com a taxa de prenhez.

Ambas as experiências foram realizadas no mesmo local, com animais do mesmo rebanho, com o mesmo protocolo de sincronização de cio.

## **9.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **9.2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL E MANEIO**

O presente trabalho foi realizado na Herdade da Abóbada no Centro Experimental do Baixo Alentejo, entre o dia 22/01/2018 e o dia 19/03/2018.

Os machos encontravam-se no Monte das Valadas no Centro Experimental do Baixo Alentejo enquanto que as ovelhas se encontravam no Monte Novo.

O regime extensivo em que os animais permanecem permite o acesso à pastagem durante todo o ano, tendo acesso livre à água em bebedouros colocados ao longo das pastagens assim como em barragens e charcos.

Em relação ao plano sanitário, é efetuada a vacinação anual contra a brucelose e a desparasitação semestral contra endoparasitas.

### **9.2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO**



O rebanho era constituído por 12 carneiros e 464 ovelhas. As 124 ovelhas escolhidas para a experiência foram selecionadas pelo seu mérito genético. De realçar que 5 ovelhas, 2 MB e 3 MP, perderam a esponja intravaginal ao longo do processo de sincronização de cio, sobrando 58 MB e 61 MP, perfazendo um total de 119 animais. Devido à necessidade, de dividir o trabalho das inseminações em dias distintos, o rebanho foi separado por grupos. Os grupos foram formados conforme o dia da retirada das esponjas. As esponjas foram retiradas em 3 dias consecutivos, formando-se desta forma 3 grupos. O grupo 1 constituído por 12 animais, 6 MB e 6M; o grupo 2 constituído por 40 animais, 20 MB e 20 MP e o grupo 3 constituído por 67 ovelhas, 32 MB e 35 MP. Os animais do grupo 1 foram utilizados num workshop de recolha de sémen, IA cirúrgica e não cirúrgica de pequenos ruminantes, para os alunos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

### **Experiência 1**

O grupo de animais desta experiência no que respeita os indivíduos do sexo masculino era constituído por 8 carneiros, 4 MB e 4 MP, cujo o seu sémen foi utilizado no processo de IA não cirúrgica com sémen fresco diluído (avaliação da motilidade progressiva entre os 70% e os 90%). No que respeita às fêmeas, o grupo de estudo incluía o total das 119 ovelhas, 86 inseminadas com sémen fresco diluído, mais 38 utilizadas na experiência 2, inseminadas com sémen congelado. No que diz respeito às 86 ovelhas inseminadas com sémen fresco diluído, no grupo 1 dos 12 animais que o constituíam, 7 ovelhas, 4 da raça MB e 3 da raça MP foram inseminadas com sémen fresco diluído e 5 com sémen congelado, no grupo 2 das 40 fêmeas, 28, 13 MB e 14 MP, foram inseminadas artificialmente com sémen fresco diluído e 13 com sémen congelado. No grupo 3 dos 67 animais utilizados, 47, 22 MB e 25 MP, foi realizada a IA com sémen fresco diluído e 20 animais foram inseminados com sémen congelado.

### **Experiência 2**

O grupo de animais desta experiência, era constituído por 4 carneiros, 2 MB e 2 MP, que foram selecionados para a utilização no processo da inseminação artificial cirúrgica com sémen congelado. No que ás ovelhas diz respeito, apenas 38 animais, 18 MB e 20 MP, dos 119 foram inseminados artificialmente pela técnica laparoscópica com sémen congelado. Dos 12 animais que constituíam o grupo 1, como já referido anteriormente, foram utilizadas 5 ovelhas, 2 da raça MB e 3 da raça MP. Do grupo 2 dos 40 animais foram utilizadas 13 ovelhas, 6 da raça MB e 7 da raça MP e do grupo 3 dos 67 animais apenas 20, 10 MB e 10 MP foram utilizados

## **9.2.3 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO**

O protocolo sincronização do cio foi realizado pelo autor, 2 estagiários e a Médica Veterinária da Herdade da Abóbada, Doutora Matilde Vítor, através da colocação de esponjas intravaginais contendo 20 mg de acetato de fluorgesterona (Chronogest®). Os dispositivos intravaginais foram colocados no dia 12/03 e retirados no dia 23/03 (grupo 1- 11 dias), 24/03 (grupo 2- 12 dias) e 25/03 (grupo 3-13 dias) sendo administrado 2 mL de eCG (internogan®) aos animais aquando da remoção das esponjas (figura 1).

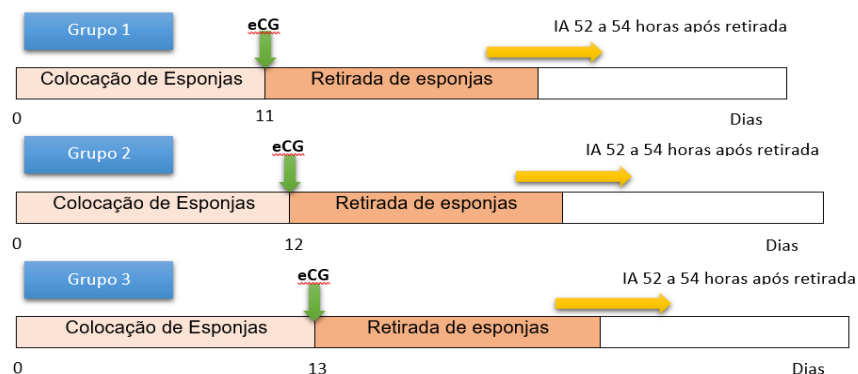


Figura 1 - Protocolo de Sincronização de Cio

Foi realizada uma tentativa de deteção de cio, apenas no primeiro grupo, 48h após a retirada das esponjas, sem resultados conclusivos. A deteção de cio foi realizada através da utilização do “efeito macho” sendo colocado estrategicamente um carneiro ao lado do local onde se encontravam as fêmeas, para posterior observação do comportamento das mesmas. As que evidenciassem maior interesse no macho, ou seja as fêmeas que se aproximassem mais deste, foram eleitas para a inseminação artificial pela técnica laparoscópica, sendo as restantes inseminadas artificialmente com sémen fresco diluído. As inseminações foram realizadas em média 52 a 54 horas após a retirada das esponjas. Foi registado o número dos animais, a raça e a hora de retirada das esponjas.

## 9.2.4 EXPERIÊNCIA 1

### 9.2.4.1 Treino dos Carneiros

Para a recolha do sémen, pelo método de vagina artificial foi realizado o treino dos animais pelo autor com a colaboração dos funcionários da abóbada, uma vez por dia durante três semanas como referido por Maxwell (1987). Segundo o esquema apresentado na figura 2, era colocada uma fêmea em cio, contida no tronco de contenção na sala de recolhas. Os machos que se encontravam nas “boxes” eram encaminhados para o ponto A, no sentido descrito na figura 2 e deste local entravam um a um na sala de recolhas sendo desta forma apresentados à fêmea (setas cor rosa). Neste ponto era observado o comportamento dos machos assim como o seu interesse na fêmea, sendo feito a classificação do grau de interesse, podendo este ser classificado como

muito interessado se o macho tentasse montar a fêmea, interessado se cheirasse a fêmea e não saísse das suas imediações e pouco ou nada interessado se não desse relevância ou nem se aproxima-se da fêmea ou se demonstrasse alguma agressividade para com esta. Os machos permaneciam na sala de recolha uma média de 10 minutos, sendo no final encaminhados para as respetivas boxes (setas cor verde). O processo repetido da mesma forma no dia seguinte.

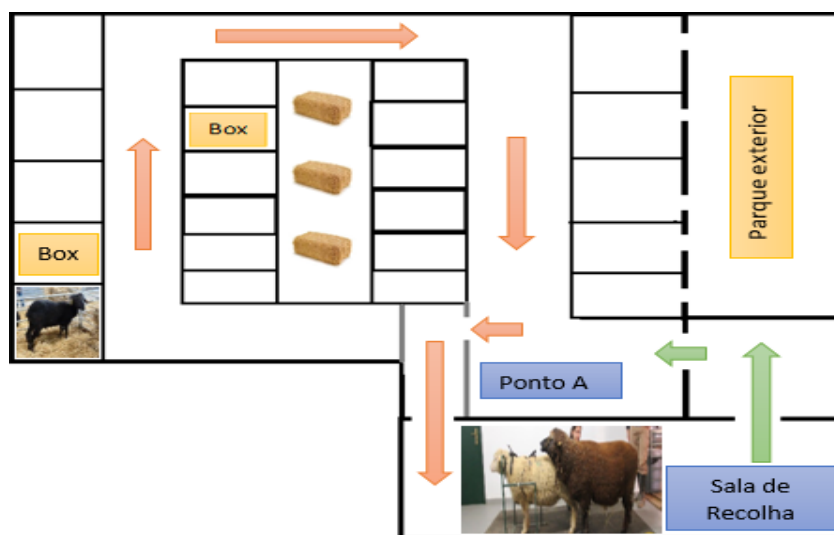


Figura 2 - Esquema representativo do treino dos carneiros no Centro Experimental

#### 9.2.4.2 Recolha do Sêmen pelo Método da Vagina Artificial

O método de recolha está representado na figura 5, Anexo I e na figura 6 [B], Anexo I. A VA é montada e preparada através da colocação de água quente (48°C - 50°C) no interior da vagina, articulação de um tubo graduado aquecido a 30°C-37°C numa das extremidades e insuflação da válvula. (Bettencourt, 2018)

#### 9.2.4.3 Avaliação e Diluição do Sêmen

A avaliação e diluição do sêmen foram realizadas como descrito em detalhe na revisão bibliográfica, ponto 6.3.

#### 9.2.4.4 Inseminação Artificial Vaginal, Cervical e Intrauterina

O processo de inseminações com sêmen fresco diluído foi realizado pelos alunos da Universidade de Lisboa (grupo 1), pelo autor e estagiários da Herdade da Abóbada, pela Doutora Matilde Vítor e pelo Doutor Ricardo Romão. Para a realização das inseminações foi necessário o uso de espéculo vaginal, “pistolet”, lanternas e lubrificante. As ovelhas eram contidas com os membros posteriores em extensão numa posição dorsal com o auxílio de uma paleta de madeira, ficando os membros anteriores apoiados no solo (figura 11, anexo II). Nessa altura, era introduzido o espéculo lubrificado na vagina do animal com uma lâmpada acoplada com o objetivo de visualizar a “flor desabrochada” (entrada do canal cervical) sendo o “pistolet” montado através da colocação da

palhinha e da bainha sanitária. De seguida, o “pistolet” era inserido no canal cervical e conforme o grau de progressão do mesmo e o local de deposição do sémen a inseminação era classificada como vaginal, cervical, transcervical ou intrauterina, ou seja, se o “pistolet” não progredisse pelo canal cervical e se o sémen fosse depositado na vagina a inseminação seria considerada IA vaginal, pelo contrário, se o “pistolet” progredisse de forma a entrar no útero, seria considerada IA intrauterina. A IA para ser considerada cervical o sémen terá que ser depositado no cérvix a uma profundidade de pelo menos 3cm (Maxwell 1987). Era registado o número do animal, a raça, a hora de inseminação o tipo de inseminação, o refluxo de sémen (no caso da vaginal e da cervical) o operador e a origem do sémen.

## **9.2.5 EXPERIÊNCIA 2**

### **9.2.5.1 Preparação do Diluidor**

A preparação do diluidor foi realizada pelo autor e pela Doutora Matilde. O diluidor era preparado todas as manhãs em dias estipulados para a recolha e congelação de sémen. A sua preparação, foi feita com base no diluidor descrito por Maxwell (1987), onde os ingredientes utilizados estão descritos na tabela 3, anexo II, sendo usado o triplo da quantidade representada, devido ao facto de, as quantidades de ingredientes sugeridas por Maxwell (1987) serem insuficientes para os mililitros de sémen recolhidos por dia. Para a realização, deste processo foi necessário a utilização de um frasco, espátula, placa de “petri”, vidro de relógio, pipeta de Pasteur, pipeta de vidro, proveta de vidro, papel de filtro, seringa de 20ml, álcool, balança, agitador magnético e íman. Primariamente, era preparada a solução mãe. O primeiro ingrediente adicionado, a água destilada (300 ml), era medida através de uma proveta calibrada (100ml) e colocada no interior do frasco. Neste ponto, o frasco era pousado no agitador magnético com o íman no seu interior para que à medida que os ingredientes fossem colocados se misturassem com a água destilada. Posteriormente, eram pesados os restantes ingredientes com o auxílio de uma balança sendo estes retirados com uma espátula do interior dos respetivos recipientes e dispostos na placa de “petri” (ou vidro de relógio) para posterior pesagem e adição ao frasco. Devido ao facto de alguns dos constituintes da solução serem em forma de pó, foi necessária a utilização de uma pipeta de Pasteur com água destilada, com o objetivo de retirar os restos das substâncias que se depositavam na placa de “petri”. Ao contrário, do descrito por Maxwell (1987), que optou por não adicionar o glicerol à solução base, sendo desta forma o glicerol em forma líquida espessa, adicionado à solução mãe com o auxílio de uma proveta de vidro de 5 ml através da sucção com a boca. O último ingrediente a ser colocado era a gema de ovo. Os ovos utilizados na solução eram frescos e fornecidos pelas galinhas do Professor Doutor Carlos Bettencourt. Antes de partir o ovo a casca era lavada com água morna, líquido antisséptico para as mãos e álcool. De seguida, partia -se a casca e separava-se a gema da clara sendo a gema colocada num papel de filtro com

a finalidade de absorver a clara que restava. Posteriormente, a gema era recolhida com o auxílio de uma seringa de 20 ml e colocada dentro do frasco, sendo que ao realizar este processo a membrana vitelina (membrana externa na gema) era descartada. No final, o diluidor era colocado no frigorífico sendo apenas utilizado no dia de preparação.

#### **9.2.5.2 Recolha de Sémén pelo método da Electro-Ejaculação**

As colheitas de sémén para congelação e posterior IA cirúrgica foram realizadas através do método da EE. As recolhas feitas por este método foram realizadas pelo Professor Doutor Carlos Bettencourt, pelo autor, por estagiários e operários da Herdade. Para a realização de recolhas pelo método da EE, foi necessário a utilização de um electro-ejaculador (figura 6 [C], Anexo I) , lubrificante, tesoura, estufa e tubos de recolha de plástico. O processo era iniciado com a colocação dos tubos no interior da estufa, de seguida os animais eram encaminhados para a sala de recolhas e colocados em decúbito lateral. Nesta altura, duas a três pessoas prestavam auxílio na contenção do animal enquanto se procedia ao corte dos pelos prepuciais com uma tesoura e à desinfeção do prepúcio com água morna, álcool e algodão. De seguida, era introduzida a sonda retal lubrificada, numa direção crânio-ventral contra o soalho da mucosa retal, com vista à estimulação prostática, a uma profundidade de 10 a 20 cm que dependeria da raça de ovinos em questão (Bordaleiros entre Douro e Minho e Churros do Minho sendo animais mais pequenos não necessitam de uma inserção tão profunda enquanto os MB, MP e Campaniços é necessária uma inserção mais profunda da sonda retal). Neste ponto, o tubo de recolha era retirado da estufa e colocado rostralmente ao prepúcio. De seguida, o EE era ligado e iniciava a estimulação que ia de 1 a 20 volts. A estimulação iria provocar a exteriorização do pénis, que era fixo através da colocação de uma gaze caudalmente à glândula, com posterior ejaculação para o interior do tubo esterilizado. Após a recolha era realizado o processamento do sémén.

#### **9.2.5.3 Processamento e Congelação do Sémén**

O processamento e congelação do sémén foi realizado pelos Médicos Veterinários associados ao projeto de conservação de raças autóctones com a ajuda do autor e estagiários. Para a realização do processamento do sémén foi necessário a utilização de tubos de recolha, balança, pipetas, palhinhas registadas com a identificação do carneiro, dia e mês, electrofotómetro (minitube), banho maria, diluidor, microscópio com platina aquecida, lâminas, lamelas, placa de aquecimento, computador, folhas de registo (figura 8, anexo I), pinça, “reck”, material para encher palhinhas (pente para formar a câmara de expansão nas palhinhas e tampões de álcool polivinílico de várias cores em pó), azoto líquido e “*cuvette*”.

O diluidor era previamente colocado em banho-maria a uma temperatura de 37°C, e as lâminas e lamelas de microscópio colocadas na placa de aquecimento. Após a recolha era medido o volume

de sémen com o auxílio de uma balança. De seguida procedia-se à avaliação da concentração do ejaculado através do auxílio de um electrofotómetro calibrado para sémen de ovinos e avaliava-se a motilidade massal e a motilidade progressiva, sendo que as anomalias morfológicas eram avaliadas na maior parte dos casos sem o auxílio do corante eosina-negrosina (neste detalhe, em contradição com o método descrito no ponto 6.3). À medida que, se iam fazendo os procedimentos eram registadas as características do sémen nas folhas de registo, e no computador numa folha de Excel (figura 9, anexo I), onde era também calculada a diluição aplicada para o sémen em questão. Pretendendo-se ter 100 milhões espermatozóides móveis por palhinha de 0,25 mL, a diluição do sémen para congelação era variável e dependente da motilidade do sémen fresco; em geral a concentração foi acertada para cerca de 480 milhões de espermatozóides totais por mililitro. Após a diluição os todos de sémen eram mantidos dentro de uma *cuvette* em equilíbrio, ou seja, à temperatura ambiente do laboratório (23°C) aproximadamente durante 30 minutos, sendo de seguida enchidas as palhinhas manualmente por sucção e colocadas num “reck” horizontal, para posterior refrigeração durante 3 horas numa câmara apropriada (figura 10, anexo II). Após o tempo descrito procedia-se à congelação do sémen em azoto líquido. Para isso enchia-se uma caixa de esferovite com azoto líquido e de seguida o “reck” era colocado a boiar no azoto tapando-se o recipiente com a tampa para que as palhinhas de sémen congelassem nos vapores de azoto. Aproximadamente 20 minutos depois, as palhinhas eram submersas no azoto e colocadas no interior de visotubos com azoto líquido no seu interior e de seguida armazenadas. Foi registado o número dos carneiros, raça, motilidade massal, motilidade progressiva, volume, concentração, número de palhinhas feiras, número de palhinhas armazenadas, hora e dia da congelação. O sémen utilizado no estudo foi inteiramente congelado durante o trabalho realizado pelo autor na Herdade da Abóbada, à exceção do sémen de um carneiro da raça MB, identificação PT PT214266231.

#### **9.2.5.4 Inseminação Artificial Laparoscópica**

O trabalho cirúrgico foi realizado na maioria dos casos pelo Professor Doutor Carlos Bettencourt, sendo alguns animais intervencionados por estagiários e alunos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa presentes no workshop de pequenos ruminantes que se realizou na Herdade da Abóbada. A descongelação das palhinhas para inseminação, contenção dos animais, tricotomia, desinfeção do campo cirúrgico, anestesia local e o fecho do campo cirúrgico foi realizado inteiramente pelos alunos, estagiários, operários da herdade da Abóbada e pela Doutora Matilde Vítor. A descrição da cirurgia está relatada em detalhe em 7.1.

#### **9.2.5.5 Descongelação do Sémen e sua Avaliação**

A avaliação do sémen à descongelação foi efetuada pelo autor, pelos estagiários da Herdade da Abóbada e pela Doutora Matilde Vítor. Para uma correta descongelação e posterior avaliação do sémen foi necessária uma pinça, banho-maria, pipeta calibrada, tesoura, tubo de “eppendorf”, diluidor, placa de aquecimento, lamina e lamela. O processo iniciou-se com a retirada da palhinha pretendida do canister do tanque de armazenamento. A descongelação foi realizada através da colocação imediata da palhinha de 0,25 em banho maria a 37.5°C durante 40 segundos (Bettencourt, 2018). Após descongelação e secagem da palhinha foram cortadas ambas as extremidades com uma tesoura. Quando se corta a segunda extremidade um tubo de “eppendorf” (aquecido a 37°) é colocado na extremidade oposta ao corte e ato continuo o sémen desce para o tubo. Nesta altura, foram previamente aquecidas, as laminas e as lamelas na placa de aquecimento e o diluidor no banho maria. Uma gota de diluidor foi colocada na lâmina com uma pipeta, depois com a mesma pipeta mas ponta diferente foi retirado o sémen do tubo e, sobrepôs-se, apenas com um ligeiro toque com a ponta da pipeta na gota de diluidor. No final foi colocada uma lamela por cima do sémen e diluidor e observada a motilidade progressiva. A avaliação da motilidade progressiva ou individual foi feita ao microscópio (como já descrito em 6.3.2).

Na IA cirúrgica, como referido anteriormente foi utilizado sémen de 4 carneiros, 2 MB e 2 MP. Num dos carneiros utilizado PT214266231, da raça MB, foram usadas, na cirurgia, palhinhas congeladas em 3 dias distintos (15, 28 e 29/11/2017) com avaliações da motilidade individual diferentes, consoante o dia da congelação. Os restantes animais o PT914191308, da raça MB, foi utilizado na IA cirúrgica, sémen congelado em 2 dias distintos (06 e 08/03/2018), enquanto os outros dois animais da raça MP, PT 218249643 (21/02/2018) e PT318276184 (01/03/2018), utilizou-se sémen congelado apenas num dia. À descongelação as avaliações do MB PT214266231 foram < 5% no que respeita o dia 15/11/2017 de congelação, 40% no que respeita o dia 28/11/2017 de congelação e 20% no que respeita o dia 29/11/2017 de congelação. Quanto ao MB PT914191308 as avaliações da motilidade individual foram 15% e 30% tendo em consideração, respetivamente, os dias 06/03/2018 e 08/03/2018 de congelação. Os outros 2 animais da raça MP o PT 218249643 e o PT318276184 forma avaliados respetivamente com 30% e 15%.

#### **9.2.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO**

Os diagnósticos de gestação foram realizados através da técnica ecográfica, pelo Professor Doutor Carlos Bettencourt com a colaboração dos estudantes de 5º ano do curso Mestrado Integrado em Medicina Veterinária do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, aos 45 dias pós IA.

#### **9.2.7 TESTES ESTATÍSTICOS**

Na experiência 1 foi usado o teste T para medidas contínuas e o teste qui-quadrado para as medidas categóricas, sendo que o p-value considerado foi < 0.05.

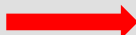
No caso da experiência 2 foi usado o Teste U de Mann-Whitney, em vez do Teste t, devido ao número de ovelhas em cada grupo, não assumindo desta forma a idade normal, uma vez que o número de ovelhas é mais reduzido. Quando se usa o Teste U de Mann-Whitney normalmente apresenta-se a mediana. Foi também usado o teste qui-quadrado com a correção de Yates.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 EXPERIÊNCIA 1

Pode-se constatar na tabela 1 que, avaliando o total de animais relativamente aos animais gestantes observa-se que os tipos de inseminação numericamente mais elevadas, foram através de inseminação cervical profunda. Há 4 ovelhas, das quais não foram obtidas informações sobre a intervenção realizada.

Tabela 1 - Resultados do diagnóstico de gestação conforme o tipo de inseminação

	Diagnósticos de Gestação		
	Total (n = 124)	Negativos (n = 62)	Positivos (n = 47)
Cervical	11	6	4
Cervical c/ refluxo	49	22	21
Cervical c/ refluxo+cervical (sem refluxo)	1	1	0
Cervical c/ refluxo+cervical sem refluxo	1	0	1
Cervical profunda 	11	2	7
Cervical profunda c/ refluxo	1	0	1
Cervical profunda+vaginal c/ refluxo	1	1	0
Intrauterina	1	1	0
Laparoscópica	38	26	11
Vaginal	4	3	1
Vaginal c/refluxo+cervical c/ refluxo	1	0	1

Relativamente à amostra total, descrita na tabela 2 verificou-se, que não existe uma diferença significativa na taxa de prenhez ( $p > 0,05$ ) em relação às variáveis condição corporal, raça e idade. Em relação à idade, houve uma tendência ( $p = 0,052$ ) para ovelhas mais jovens ficarem gestantes. Para este cálculo apenas se considerou um total de 109 (62+47) animais, pois não foi realizado diagnóstico de gestação a 15 animais.

Nas IA não cirúrgicas das 41 ovelhas MP inseminadas, 35 com diagnóstico de gestação, 19 foram consideradas positivas e 16 negativas ficando 54,29% das ovelhas prenhas. No que às MB diz respeito das 40 fêmeas inseminadas, 39 com diagnóstico de gestação, 19 ficaram gestantes e 20 não gestantes, perfazendo um total de 48,72% de ovelhas gestantes.



Tabela 2 - Descrição da amostra total tendo em conta a idade, condição corporal e raça e sua relação da taxa de prenhez.

	Diagnósticos de Gestação			P-value
	Total (n = 124)	Negativos (n = 62)	Positivos (n = 47)	
<b>Idade (anos, media ± desvio padrão)</b>	5.00 ± 2.42	5.32 ± 2.47	4.43 ± 2.21	0.052*
<b>Condição corporal total (media ± desvio padrão)</b>	3.27 ± 0.41	3.34 ± 0.37	3.21 ± 0.43	0.103*
<b>Raça (MB, n (%))</b>	55 (50.5%)	32 (51.6%)	23 (48.9%)	0.848 <sup>#</sup>

## 10.2 EXPERIÊNCIA 2

Como podemos verificar na tabela 3, houve diferenças na taxa de prenhez relativamente ao dia da retirada das esponjas. No entanto, tirando o primeiro dia de retirada dos dispositivos (dia 23), o valor esperado e o valor real estão muito próximos indicando que não há relação entre a data de recolha das esponjas e a taxa de prenhez, sendo o valor esperado a frequência que seria espectável se as variáveis em causa, dia da retirada das esponjas e taxa de prenhez, fossem independentes. Embora, a frequência seja baixa, considera-se que o dia 23 foi prematuro para a retirada das esponjas, devido ao facto de não ter ficado nenhuma ovelha prenha, levando a pensar que essas 24 horas foram importantes. Apesar disto, os dados são escassos para realmente haver uma diferença estatística não sendo esta relação estatisticamente significativa ( $p=1$ ).

Tabela 3 - Data de Recolha das esponjas das ovelhas IA por Laparoscopia e a sua relação com a taxa de prenhez

	Diagnósticos de Gestação			
	Total (n =37)	Negativos (n = 26)	Positivos (n = 11)	
<b>Data Recolha Esponja</b>	23/03/2018	5 (13.5%)	5 (100%)	0 (0%)
	Esperado:		3.5	1.5
	24/03/2018	12 (32.4%)	8 (66.7%)	4 (33.3%)
	Esperado:		8.4	3.6
	25/03/2018	20 (54.1%)	13 (65.0%)	7 (35.5%)
	Esperado:		14.1	5.9

Na inseminação por laparoscopia não houve uma diferença significativa na taxa de prenhez ( $p > 0,5$ ) para as variáveis condição corporal, raça e idade. Da amostra total inicial, 38 (18 MB e 20MP), apenas se considerou 37 animais, dado que, não foi realizado o diagnóstico de gestação a um dos animais da raça.

Tabela 4 – Descrição das ovelhas inseminadas por laparoscopia tendo em conta a relação da taxa de prenhez com a idade, condição corporal e raça.

	Diagnósticos de Gestaçã			P-value
	Total (n = 37)	Negativos (n = 26, 70.3%)	Positivos (n = 11, 29.7%)	
<b>Idade (anos, media ± desvio padrão)</b>	5.27 ± 2.48	5.77 ± 2.42	4.09 ± 2.30	0.065*
<b>Condição corporal total (media ± desvio padrão)</b>	3.19 ± 0.34	3.19 ± 0.25	3.18 ± 0.51	0.832*
<b>Raça (MB, n (%))</b>	18 (48.6%)	12 (46.2%)	6 (54.5%)	0.728 <sup>#</sup>

Observa-se na tabela 5 que a qualidade do sémen se deteriorou após a congelação e que não há diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre a taxa de prenhez e a motilidade progressiva antes de congelar o sémen e à descongelação.

Tabela 5 - Diagnóstico de gestaçã relativamente à motilidade progressiva antes da congelação e após a descongelação.

	Diagnósticos de Gestaçã			
	Total (n=37)	Negativos (n=26,70.3%)	Positivos (n=11,29.7%)	Teste U de Mann-Whitney (P-value)
<b>Motilidade progressiva antes de congelar (% , mediana [Q1; Q3])</b>	70 [70;90]	70 [70;90]	90 [70;90]	0.707*
<b>Motilidade à Descongelação (% , mediana [Q1; Q3])</b>	22.5 [20;25]	22.5 [20;25]	25 [22.5;30]	0.566*

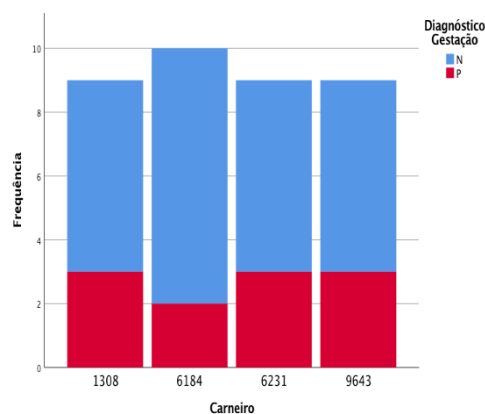
Quanto ao sucesso do estudo principal, como já referido anteriormente, foram inseminadas artificialmente por laparoscopia com sémen congelado 38 ovelhas, 5 do grupo 1 (2 MB e 3MP), 13 do grupo 2 (6 MB e 7 MP) e 20 do grupo 3 (10 MB e 10 MP). Em relação ao carneiro MP PT 218249643, cuja a avaliação da motilidade progressiva à descongelação foi 30%, foram inseminadas 9 ovelhas com o seu sémen, duas do grupo 1, duas do grupo 2 e 5 do grupo 3. Em relação ao grupo 1, no diagnóstico de gestaçã, ambas as ovelhas não estavam gestantes. No grupo 2, das duas ovelhas inseminadas, uma ficou gestante e outra não gestante e no grupo 3 das 5 ovelhas inseminadas duas ficaram gestantes e 3 não gestantes. No total das 9 ovelhas inseminadas artificialmente pela técnica laparoscópica, com sémen deste carneiro, ficaram prenhas 3 ovelhas. No que diz respeito, ao carneiro MP PT318276184 cuja a avaliação da motilidade progressiva à descongelação foi 15%, foram inseminadas 11 ovelhas com o seu sémen, uma do grupo 1, 5 do grupo 2 e 5 do grupo 3. Em relação ao grupo 1, a ovelha inseminada não ficou gestante, no grupo 2 das 5 ovelhas inseminadas, duas ficaram gestantes, duas ficaram não gestantes e a uma não foi feito o diagnóstico de gestaçã, enquanto que no grupo 3 dos 5 animais inseminados ficaram todas não gestantes. No total das 11 ovelhas inseminadas, apenas duas ficaram gestantes. No que concerne, ao carneiro MB PT914191308, cuja a avaliação da motilidade

progressiva à descongelamento foi 15% (congelamento no dia 06/03/2018) e 30% (congelamento no dia 08/03/2018), foram inseminadas 9 ovelhas com o seu s emen, uma do grupo 1, 3 do grupo 2 e 5 do grupo 3. No grupo 1, a única ovelha inseminada não ficou prenha, no grupo 2 das 3 ovelhas inseminadas uma ficou gestante e as outras duas ficaram não gestantes, enquanto no grupo 3 das 5 ovelhas inseminadas artificialmente, duas ficaram gestantes e 3 não gestantes. No total das 9 ovelhas inseminadas, 3 ficaram gestantes e 6 não gestantes. No que diz respeito ao carneiro MB PT214266231, cuja a avalia o da motilidade progressiva   descongelamento foi < 5% (congelamento no dia 15/11/2017), 40% (congelamento no dia 28/11/2017) e 30% (congelamento no dia 29/11/2017), foram inseminadas artificialmente com o seu s emen 9 ovelhas, uma no grupo 1, 3 no grupo 2 e 5 no grupo 3. No grupo 1 a única ovelha inseminada não ficou gestante, no grupo 2 das 3 ovelhas inseminadas nenhuma ficou gestante, enquanto no grupo 3 dos 5 animais inseminados 3 ficaram gestantes e 2 não gestantes. No total das 9 ovelhas intervencionadas por esta técnica ficaram gestantes 3 animais e 6 não gestantes. No que diz respeito às IA cirúrgicas, dos ovinos da raça MP das 20 fêmeas inseminadas artificialmente pela técnica laparoscópica, 19 com diagnóstico de gesta o, 14 ficaram não gestantes, e 5 ficaram gestantes. Dos 2 carneiros utilizados, 3 ovelhas ficaram prenhas do PT 218249643 (motilidade progressiva   descongelamento 30%) e duas do PT318276184 (motilidade progressiva   descongelamento 15%) perfazendo um total de 26,32% de diagnósticos de gesta o positivos. Quanto aos MB, intervencionados cirurgicamente pela técnica laparoscópica, das 18 ovelhas inseminadas, 6 ficaram gestantes e 12 não gestantes, sendo que dos 2 carneiros utilizados 3 ovelhas ficaram prenhas do PT914191308 (motilidade progressiva   descongelamento de 15% e 30%) e 3 do PT214266231 (motilidade progressiva   descongelamento de <5%, 40% e 30%), perfazendo um total de 33,33% ovelhas prenhas.

Tabela 6 - Diagnóstico de gesta o relativamente aos carneiros utilizados para a laparoscopia.

ID Carneiro	Diagnósticos Gesta�o	
	Negativos	Positivos
1308	6 (66.7%)	3 (33.3%)
6184	8 (80.0%)	2 (20.0%)
6231	6 (66.7%)	3 (33.3%)
9643	6 (66.7%)	3 (33.3%)

Gráfico 1 - Diagnóstico de gesta o relativamente aos carneiros utilizados para a laparoscopia (Azul=negativo;vermelho=positivo)



## 11. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Ao longo do estudo, houve fatores que contribuiram negativamente para o seu sucesso como a perda de 5 esponjas intravaginais, das uma delas sofreu a queda no momento da sua coloca o e outras 4 notou-se a sua ausência no momento da retirada.

tais  
quais

É preciso ter em conta que principalmente as IA não cirúrgicas, mas também as IA cirúrgicas, foram realizadas por inúmeros operadores, sendo que muitos deles sem experiência prévia. Outro fator importante a ter em conta, aquando das IA's por laparoscopia, foi não terem sido executado os registos das palhinhas usadas. Os registos deveriam conter os dias de congelação, pois como anteriormente referido, foram feitas congelações do mesmo carneiro em dias diferentes, com avaliações diferentes à descongelação, sendo que as avaliações de sémen à descongelação foram realizadas por diferentes operadores, uns com mais experiência que outros.

#### **Condição Corporal, idade, raça e a sua influência na taxa de prenhez:**

No que concerne ao estudo total do rebanho e do grupo das ovelhas inseminadas por laparoscopia a condição corporal, a idade e a raça não tiveram influência significativa na taxa de prenhez, como descrito nas tabelas 2 e 4. Segundo estudos realizados por Ribeiro, Fontana, Wald, Gregory, & Mattos (2003) que relacionavam a idade e condição corporal com a prenhez em ovelhas onde era realizada monta natural, houve variações na taxa de prenhez no que à condição corporal diz respeito, verificando-se que ovelhas com valores de condição corporal entre 2,5 e 4,5 apresentavam melhores resultados relativos à taxa de prenhez face às ovelhas com condição corporal entre 1,5 e 2,0. No estudo anteriormente referido, no que à idade e raça diz respeito não foram encontrados dados estatísticos significativos.

#### **Dia da retirada das esponjas e a sua influência na taxa de prenhez:**

No presente estudo verificou-se (tabela 3) que as ovelhas do grupo 1 cuja esponja intravaginal de 20 mg de progestagénio foi retirada após 11 dias se obteve uma taxa de prenhez nula. No entanto, nos seguintes grupos (2 e 3), com 12 e 13 dias de tratamento constatou-se que, os valores obtidos superaram os valores que eram espectáveis. O que nos pode indicar, que apesar de no primeiro dia os resultados terem sido inferiores aos esperados, o aumento do período de tratamento contribuiu de facto, para uma melhoria nas taxas de prenhez, respetivamente 33,3% e 35,5%. No estudo de Viñoles et al. (2001), cujo objetivo foi o tempo de tratamento com progestagénios com vista à sincronização de cio, foi avaliada a eficácia de diferentes períodos de retirada das esponjas (6 vs. 12 dias) com recurso a 4 grupos de ovelhas: Grupo 1 - 6 dias sem recurso a eCG; Grupo 2 - 6 dias com recurso a eCG; Grupo 3 - 12 dias sem recurso a eCG; Grupo 4 - 12 dias com recurso a eCG. Os autores verificaram que o grupo 1 obteve uma taxa de prenhez de 87%, o grupo 2 uma taxa de 58%, grupo 3 uma taxa de 63% e por fim o grupo 4 com uma taxa de 67%. Conclui-se assim que comparativamente ao presente estudo, existem diferentes variáveis em causa como o número e características da amostra usada, no entanto, em ambos os estudos se verifica que o aumento do período de tratamento com progestagénios recorrendo ao eCG, representou uma melhoria na taxa de prenhez.

#### **Tipo de inseminação e a sua influência na taxa de prenhez:**

Segundo o estudo de Taqueda et al. (2011), a taxa de prenhez tendo em conta o local presumido de deposição do sémen durante a IA, foi superior através da IA intrauterina e inferior na IA cervical superficial. Os resultados obtidos no presente trabalho diferem dos dados do estudo acima referido, uma vez que, a taxa de prenhez (tabela 1) foi superior na inseminação artificial cervical superficial em contraste com a intrauterina. A intervenção com uma taxa de prenhez mais elevada encontrada neste estudo difere totalmente do estudo referido. Os nossos resultados podem dever-se ao número da amostra ser inferior à do estudo referido.

**Recolha de Sémen por EE e avaliação da sua qualidade através da taxa de prenhez de ovelhas inseminadas artificialmente pela técnica laparoscópica:**

No estudo principal, tendo em conta que o método de recolha de sémen foi por EE que segundo Mattner & Voglmayr (1962) apresenta piores concentrações do que pelo método da VA; considerando que se utilizou sémen congelado que segundo Watson (1999) e Salamon & Maxwell (2000) apresenta uma menor fertilidade, e o facto de não se ter realizado deteção de cios como foi preconizado no estudo de Boscos et al. (2002), os resultados apresentados de 30% de taxa de prenhez podem ser considerados razoáveis.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Bettencourt, C. M. Varela., & Bettencourt, E.M.Varela., (2016). “Aplicação de Tecnologias Reprodutivas a Programas de Conservação e Melhoramento Genético.” **II Colóquio AEMV FMV-ULHT - Animais de Produção e Gestão de Explorações.**
- Bettencourt, C M Varela.; (2018). “Manual de Procedimentos e de Boas Práticas Do Centro de Reprodução Animal Da Herdade Da Abóbada.”
- Bettencourt, C. M. Varela., (2017). “Teriogenologia II.” **In Teriogenologia.**
- Gourley, D., Riese R.L., (1990). “Laparoscopic Artificial Insemination in Sheep”, PubMed - NCBI
- Grilo, R.P. (2016),. “Programa Operacional Regional Do Alentejo Comissão Diretiva Do Programa Operacional Do Alentejo 2020 Parecer Do Secretário Técnico Programa Operacional Regional Do Alentejo Parecer Do Coordenador Parecer Do Técnico.” : 1–19
- Hafez, E. S.; (2003). **Reprodução Animal** 7ªed. Manole.
- Hammond, J. (1960). **Nature Physiology of Reproduction.** 3ªed Elsevier Alabama 396
- Legan, S. J., & Karsch, F. J., (1979). “Neuroendocrine Regulation of the Estrous Cycle and Seasonal Breeding in the Ewe.” **Biology of Reproduction** : 74–85.
- Matos, C. (1986). “História e Evolução Dos Efectivos.” 1–4.
- Mattner, P. E., Voglmayr, J. K., (1962) “A Comparison of Ram Semen Collected by the Artificial Vagina and by Electro-Ejaculation.” **Australian Journal of Experimental Agriculture** : 78–81.
- Maxwell, W.M.C., Gareth, E., Salomin, S., (1987). **Salamo’s Artificial Insemination of Sheep and Goats.** ed. Butterworths. Sydney. 25-31 40-47 55-73 81-117 122-162
- Passanha, L.M.B. Fonseca., ANCORME – “Associação nacional de criadores de ovinos da raça merina”: <http://www.merina.com.pt/conteudo.php?idm=1&idioma=pt> [Online] pesquisa: Fevereiro 2018
- Perloiro, T., Carrasco, A., Ramalho, J. & Taniças,. F. (2017). “Avaliação Genética 2017 Do Merino Preto e do Merino Branco” **ANCORME** – Associação Nacional de Criadores de Ovinos da Raça Merina.
- Reece, W. O., (2007). **Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos** 12ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 578 636-642 644-669 678
- Ribeiro, L. A. O et al. (2003). “Relação Entre a Condição Corporal e a Idade Das Ovelhas No Encarneamento Com a Prenhez.” **Ciência Rural** 33(2): 357–61.
- Salamon, S., and Maxwell W.M.C. (2000). “Storage of Ram Semen.” **Animal Reproduction Science** 62(1–3): 77–111.
- Senger, PL. (2005). “**Pathways to Pregnancy and Parturition.** 2<sup>nd</sup> ed, Current Conception Inc, Washington 145-150 165-181 189-196
- Spain, J.S., Lucy,. C. M. & Hardin, D.K., (2007). **Current Therapy in Large Animal Theriogenology** 2<sup>nd</sup> ed. Saunders Elsevier, Philadelphia

- Taqueda, G. S. et al. (2011). "Influence of Anatomical and Technical Aspects on Fertility Rate Based on Sheep Transcervical Artificial Insemination Performance." **Ars Veterinaria** 27(2): 127–33.
- Viñoles, C, M Forsberg, G, Banchero, . & E Rubianes. (2001). "Effect of Long-Term and Short-Term Progestagen Treatment on Follicular Development and Pregnancy Rate in Cyclic Ewes." **Theriogenology** 55(4): 993–1004.
- Watson, P.F. W., (1999). "Recent progress in the preservation of ram semen" [Original] pesquisa: Abril 2018.

## **ANEXOS**



## ANEXO I

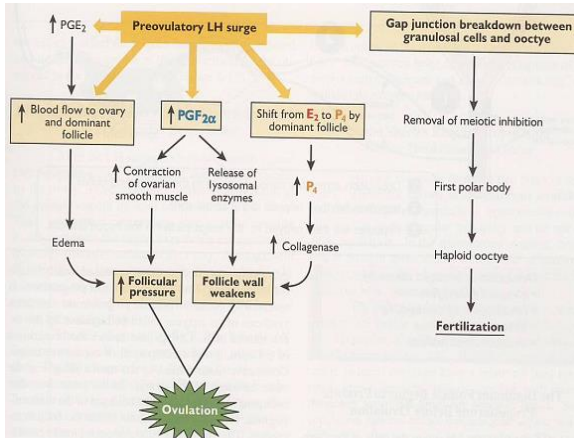
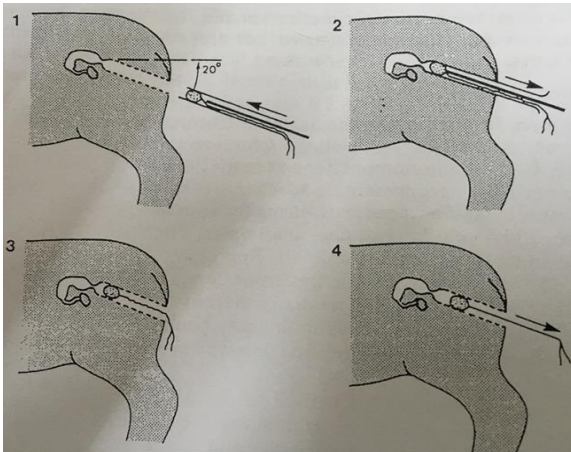


Figura 3 – Eventos presentes nos ovários após o pico pré-ovulatório de LH (Senger, 2005).



o fio da esponja deverá exteriorizar-se através da vulva (4). Após a sua utilização o aplicador deverá ser cuidadosamente desinfetado antes da sua inserção noutra animal (Maxwell 1987).



Figura 5 - Treino dos Carneiros para recolha de sêmen pelo método da VA: 1- Encaminhar o macho para a sala de recolha durante um período de 5-10 dias, para permitir que este se habitue ao ambiente em que encontra; 2- Apresentar ao macho 1 a 2 fêmeas em estro, e permitir que ele faça a monta; 3- Objetivo principal é que o macho se ambiente ao tronco de contenção onde se encontram as fêmeas contidas, isto deve ser feito na presença do operador e quando o macho realiza a monta, o operador deve acostumar o animal ao processo de recolha de sêmen através do toque no pênis do animal. Se o macho não mostrar interesse na fêmea quando deixado com esta sozinho na sala, poderá ser estimulado, tanto pela troca da fêmea como permitindo que outro macho entre na sala. Quando o macho não tem interesse é preferível removê-lo da sala e reintroduzi-lo por períodos curtos de tempo, do que persistir por um longo período. Cada vez que, o reintroduzimos na sala é um fator estimulante; 4- Carneiros que montam as fêmeas regularmente podem ser habituados à vagina artificial. O tempo que, leva ao treino completo dos animais depende da experiência do operador, da idade e temperamento sexual do animal. É vantajoso que estes animais estejam previamente habituados ao contacto humano (Maxwell 1987).



Figura 6 – A) Vagina Artificial; B) Recolha de sêmen com a utilização da VA; C) Eletro-ejaculador

Tabela 7 – Escala de consistência do Sêmen (Spain, et al. 2007).

Score	Consistência	Número de Espermatozoides ( $\times 10^9$ )	
		Média	Intervalo
5	Cremoso x2	5.0	4.5-6.0
4	Cremoso	4.0	3.5-4.5
3	Leitoso	3.0	2.5-3.5
2	Leite magro	2.0	1.0-2.5
1	Turvo a aquoso	>1.0	0.3-1.0
0	Translúcido	insignificante	0.3-1.0

Tabela 8 - Sistema de Classificação da motilidade massal dos espermatozoides (Maxwell 1987).

Score	Classificação	Descrição
5	Muito Bom	Denso, movimento de onda muito rápidos espermatozoides individuais não são observados, >90% dos espermatozoides estão ativos.
4	Bom	Movimento vigoroso, no entanto, o movimento de ondas não é tão rápido como no anterior; 70 a 85% estão ativos.
3	Satisfatório	Apenas um pequeno movimento de onda, espermatozoides individuais são possíveis de observar; 45 a 65% dos espermatozoides estão vivos, tendo uma motilidade baixa.
2	Fraco	Não há movimento de onda, mas observa-se algum movimento dos espermatozoides; 20 a 40% estão vivos.
1	Muito Fraco	Cerca de 10% dos espermatozoides mostram sinais de vida com movimentos fracos.
0	Mortos	Todos os espermatozoides estão parados.

Tabela 9 - Diluidor Maxwell adaptado usado na congelação de Sémen. O fator de diluição é 1 de sémen para 4 de diluidor (Maxwell 1987).

### Solução Base/Mãe

1	Água destilada qbp. 100cm <sup>3</sup>
2	TRIS(hidrometil)aminometano 3,364 g
3	Glucose Anidra 0,500g
4	Ácido cítrico mono-hidratado 1,990 g
<b>Solução</b>	
5	Glicerol 5 ml
6	Gema de ovo fresco 15 ml
7	Penicilina (ui) 100000=66mg OU Estreptomicina 100 mg

Centro de Reprodução Herdade da Abóbarja

REPÚBLICA PORTUGUESA  
AGRICULTURA, FLORESTAS E PESCAÇAMENTO RURAL  
MAR  
Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

CCS: PT40C03 CS CAS: 6.061-OC 6.061-B Expl: WT5AA

ESPÉCIE	OBJECTIVO			
RAÇA	DATA ENTRADA NO CCS	SIA	LG	BPGA
				IA

Dados de Recolha      Vagina artificial       Electro Ejaculação

DATA				
Nº Ordem/Hora				
Volume (ml)				
Cor - Marfim/ leite/ leite magro/ translúcido				
Motilidade Massal (0 a 5)				
Motilidade individual progressiva (%)				
Aglutinação (0; +; ++; +++; ****)				
Concentração (x10 <sup>6</sup> )				
Coloração vital (% spz vivos)				
Morfologia (% formas Anormais)				
Protocolo de congelação				
Sémen apto para inseminação? (Sim/ Não)				
Sémen p/criopreservação				
Sémen p/utilização a fresco				
# Total espermatozoides p/ palhinha				
Nº palhinhas previstas				
Nº palhinhas realizadas				
Nº palhinhas armazenadas				
Cor palhinha				
Cor Tampão				
# Contentor / # Canister / # Andar / Cor do Globelet				
Hora início da refrigeração				
Hora da congelação				
Destino Sémen para IA (marca de exploração) e nº de doses				

Data, assinatura e carimbo do Médico Veterinário Responsável pelo CCS

Figura 7 – Folha de Registos das características do Sémen.

B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Nº	LG	Hora	raça	Motilidade massal (1 a 5)	Motilidade individual	Vol (ml)	Concent (10 <sup>6</sup> spz/ml)	P. diluição	SPS totais	n.º de palhinhas	Volume final	Volume a adicionar	Palhinhas Fritas
6231	131336	09:50	MB	5	0,90	0,35	3,10	0,35	1,0	19,5	4,30	3,60	17
0.083	2902	10:04	MB	4	0,90	0,55	1,50	0,55	0,7	14,9	3,27	2,17	13
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	
								0,00	0,0	0,0	0,00	0,00	

Figura 8 - Folhas de registos Excel.



## ANEXO II

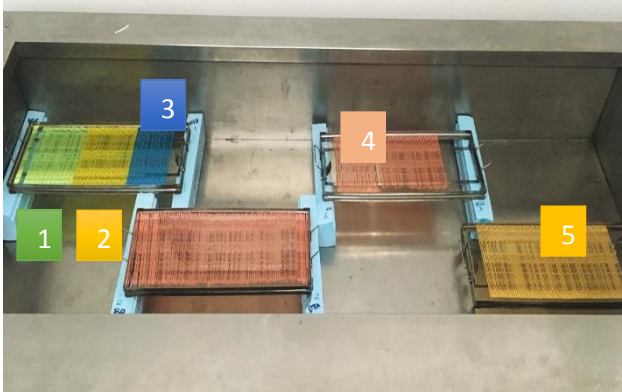


Figura 9 – Palhinhas colocadas num “rack” para refrigeração numa camara apropriada. Descrição: 1- palhinhas cor verde: raça Campaniça; 2 – palhinhas cor amarela: raça Bordaleira, entre Douro e Minho; 3 – palhinhas cor azul: Churras do Minho; 4- palhinhas cor rosa: raça Merina Preta; 5 – palhinhas cor alaranjada: raça Merina Branca.



Figura 10 – Contenção do animal em posição ventro-dorsal para proceder à IA por laparoscopia (imagem à esquerda); Indução do pneumoperitôneu através do aparelho de CO<sub>2</sub> (imagem à direita).



Figura 11 – A) Visualização do útero; B) Contenção e Inseminação dos animais com sêmen fresco.

Tabela 10 – Resumo das atividades desenvolvidas no âmbito do estágio realizado em Twemlows Stud Farm, Whitchurch, UK.

TWEMLOWS STUD FARM, UK.	EQUINOS
DETEÇÃO DE SINAIS DE PARTO	21
ASSISTÊNCIA A PARTOS	17
LAVAGENS INTRA - UTERINAS	13
VISUALIZAÇÃO DE PALPAÇÃO E ECOGRAFIA TRANSRECTAL	72
VISUALIZAÇÃO ENDOSCOPIA VAGINAL	1
LIMPEZA DE FERIDAS	15
ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS (IM)	32
TRATAMENTO DE LAMINITE CRÓNICA	1
EPISIOTOMIA (MÁ CONFORMAÇÃO DA VAGINA)	5
CUIDADOS NEONATAIS:	17
- EXAME ESTADO GERAL PERIÓDICO	
- CUIDADOS PÓS PARTO (ADMINISTRAÇÃO DE ENEMAS, LIMPEZA DAS NARINAS, MEDIÇÃO DO NÍVEL DE COLOSTRO; NÓ NA PLACENTA; AVALIAÇÃO DA PLACENTA; ADMINISTRAÇÃO ROTAVÍRUS; ...)	
- SÍNDROME DE INAPTÊNCIA NEONATAL	1
- ISOELETROLÍSE NEONATAL (ADMINISTRAÇÃO DE COLOSTRO)	1
FLUIDOTERAPIA (SUPORTE IMUNITÁRIO EM POLDROS)	1
ENTUBAÇÃO NASOTRAQUEAL	1
TRATAMENTO DE CÓLICAS	1
AVALIAÇÃO DE SÉMEN	3
ASSISTÊNCIA A RECOLHA DE SÉMEN	10
VISUALIZAÇÃO DE IA (SÉMEN FRESCO, CONGELADO E REGRIGERADO)	5

Tabela 11 – Dados do Rebanho

1	SIA	S	Raça	Esponja	ECG	Rem. Esponja	Cio	IA/Hora	Carneiro	Tipo IA	De
2					23/03/2018	23/03/2018		25/03/2018			
3	PT817546245	F	MP	IA	12/mar	10h57		15h56	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	N
4	PT917546254	F	MP	IA	12/mar	11h14		18h09+18h14	PT414291546	cervical profunda	
5	PT618320487	F	MP	IA	12/mar	10h51		16h13	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	N
6	PT517546435	F	MP	IA	12/mar	x	sem esponja	17h52+17h55	PT414291546	vaginal c/ refluxo	
7	PT718320274	F	MP	IA	12/mar	11h17		11h17	PT318276184 (03/18)	laparoscópica	N
8	PT619142187	F	MP	IA	12/mar	11h11		11h11	PT414291546	cervical profunda c/ refluxo	P
9	PT318320450	F	MP	IA	12/mar	10h48		10h48	PT414291546	cervical c/ refluxo+cervical sem refluxo	P
10	PT619769891	F	MB	IA	12/mar	10h58		10h58	PT617546321	cervical profunda+vaginal c/ refluxo	N
11	PT914440043	F	MB	IA	12/mar	11h01		11h01	PT617546321	cervical c/ refluxo	N
12	PT018320461	F	MB	IA	12/mar	10h55		10h55	PT617546321	cervical profunda	N
13	PT017025480	F	MB	IA	12/mar	11h09		11h09	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	N
14	PT514291611	F	MB	IA	12/mar	11h04		11h04	PT214266231 (12/17)	laparoscópica	N
15	PT518320350	F	MB	IA	12/mar	11h06		11h06	PT617546321	vaginal c/refluxo+cervical c/ refluxo	P
16					24/03/2018	24/03/2018		26/03/2018			
17	PT514211633	F	MP	IA	12/mar	09h37		09h37	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	N
18	PT819769871	F	MP	IA	12/mar	09h39		09h39	PT918320339	cervical c/ refluxo	P
19	PT517546294	F	MP	IA	12/mar	09h42		09h42	PT918320339	cervical c/ refluxo	N
20	PT519142173	F	MP	IA	12/mar	09h42		09h42	PT518320454	cervical c/ refluxo	P
21	PT118320333	F	MP	IA	12/mar	09h43		09h43	PT518320454	cervical profunda	
22	PT819769833	F	MP	IA	12/mar	09h43		09h43	PT318276184 (03/18)	laparoscópica	N
23	PT819142186	F	MP	IA	12/mar	09h44		09h44	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	P
24	PT919769927	F	MP	IA	12/mar	09h48		09h48	PT518320454	cervical profunda	P
25	PT317025498	F	MP	IA	12/mar	09h49		09h49	PT918320339	cervical c/ refluxo	N
26	PT017546225	F	MP	IA	12/mar	09h49		09h49	PT318276184 (03/18)	laparoscópica	
27	PT319142174	F	MP	IA	12/mar	10h01		10h01	PT918320339	cervical c/ refluxo	N
28	PT117546437	F	MP	IA	12/mar	10h03		10h03	PT918320339	cervical profunda	P
29	PT314292749	F	MP	IA	12/mar	10h05		10h05	PT318276184 (02/18)	laparoscópica	N
30	PT619142182	F	MP	IA	12/mar	10h05		10h05	PT318276184 (02/18)	laparoscópica	P
31	PT717025496	F	MP	IA	12/mar	10h07		10h07	PT918320339	cervical profunda	P

32	PT118320451	F	MP	IA	12/mar	10h11	10h11		13h17	PT918320339	cervical c/ reflujo	N
33	PT018320485	F	MP	IA	12/mar	10h16	10h16		13h22	PT518320454	cervical profunda	N
34	PT714291455	F	MP	IA	12/mar	10h23	10h23		13h21	PT518320454	cervical c/ reflujo	N
35	PT818320320	F	MP	IA	12/mar	10h25	10h25		13h27	PT518320454	cervical c/ reflujo	P
36	PT318320271	F	MP	IA	12/mar	10h27	10h27		16h11	PT318276184 (03/18)	laparoscópica	P
37	PT519025938	F	MB	IA	12/mar	09h41	09h41		17h41	PT214266231 (12/17)	laparoscópica	N
38	PT517072163	F	MB	IA	12/mar	09h41	09h41		13h52	PT118320319	cervical profunda	P
39	PT918320433	F	MB	IA	12/mar	09h45	09h45		17h05	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	N
40	PT114440042	F	MB	IA	12/mar	09h46	09h46		13h36	PT417546322	cervical c/ reflujo	N
41	PT319769901	F	MB	IA	12/mar	09h46	09h46		13h38	PT417546322	cervical c/ reflujo	P
42	PT017546381	F	MB	IA	12/mar	09h47	09h47		17h18	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	P
43	PT918320358	F	MB	IA	12/mar	09h50	09h50		14h00	PT118320319	cervical c/ reflujo	P
44	PT714291493	F	MB	IA	12/mar	09h52	09h52		13h49	PT118320319	cervical c/ reflujo	P
45	PT617025543	F	MB	IA	12/mar	x	sem esponja					
46	PT314211578	F	MB	IA	12/mar	09h59	09h59		13h42	PT517546416	cervical profunda	P
47	PT417025549	F	MB	IA	12/mar	10h02	10h02		18h00	PT417546322	cervical	N
48	PT012611947	F	MB	IA	12/mar	10h08	10h08		17h34	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	N
49	PT717546279	F	MB	IA	12/mar	10h09	10h09		13h40	PT517546416	cervical profunda	P
50	PT714291535	F	MB	IA	12/mar	10h10	10h10		13h34	PT417546322	cervical c/ reflujo	N
51	PT314291490	F	MB	IA	12/mar	10h12	10h12		13h54	PT118320319	cervical c/ reflujo	P
52	PT917625935	F	MB	IA	12/mar	10h13	10h13		13h56	PT118320319	cervical c/ reflujo	P
53	PT614211567	F	MB	IA	12/mar	10h14	10h14		13h32	PT417546322	cervical c/ reflujo	N
54	PT118320277	F	MB	IA	12/mar	10h17	10h17		16h56	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	N
55	PT019025945	F	MB	IA	12/mar	10h18	10h18		17h53	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	N
56	PT717546410	F	MB	IA	12/mar	10h22	10h22		13h46	PT517546416	cervical profunda	P
57	PT512611935	F	MB	IA	12/mar	10h24	10h24		13h44	PT517546416	cervical c/ reflujo	N
58					25/03/2018		25/03/2018		27/03/2018			
59	PT114211574	F	MB	IA	12/mar	09h39	09h39		16h15	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	N
60	PT919769908	F	MB	IA	12/mar	09h44	09h44		15h47	PT118320319	vaginal	P
61	PT917025513	F	MB	IA	12/mar	09h50	09h50		14h43	PT417546322	cervical c/ reflujo	P
62	PT914291497	F	MB	IA	12/mar	09h51	09h51		14h38	PT417546322	intrauterina	N
63	PT819025927	F	MB	IA	12/mar	09h54	09h54		15h52	PT118320319	cervical c/ reflujo	P x2
64	PT919769861	F	MB	IA	12/mar	09h55	09h55		16h57	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	P
65	PT817072152	F	MB	IA	12/mar	09h57	09h57		14h44	PT417546322	cervical	N
66	PT715097198	F	MB	IA	12/mar	10h09	10h09		16h34	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	N
67	PT619025947	F	MB	IA	12/mar	10h12	10h12		15h45	PT118320319	cervical	N
68	PT019769837	F	MB	IA	12/mar	10h14	10h14		17h04	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	N
69	PT519769900	F	MB	IA	12/mar	10h15	10h15		14h49	PT417546322	cervical c/ reflujo+cervical (sem reflujo)	N
70	PT817546405	F	MB	IA	12/mar	10h16	10h16		14h56	PT517546416	cervical	P
71	PT519769849	F	MB	IA	12/mar	10h18	10h18		17h50	PT118320319	vaginal	N
72	PT717025477	F	MB	IA	12/mar	10h19	10h19		17h19	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	P
73	PT214211583	F	MB	IA	12/mar	10h40	10h40		14h37	PT417546322	cervical c/ reflujo	N
74	PT317025516	F	MB	IA	12/mar	10h41	10h41		17h10	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	N
75	PT314291612	F	MB	IA	12/mar	10h43	10h43		14h50	PT517546416	cervical c/ reflujo	N
76	PT819769895	F	MB	IA	12/mar	10h47	10h47		16h42	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	P
77	PT518320459	F	MB	IA	12/mar	10h48	10h48		14h46	PT417546322	cervical c/ reflujo	P
78	PT218320460	F	MB	IA	12/mar	10h49	10h49		14h57	PT517546416	cervical c/ reflujo	P
79	PT814211580	F	MB	IA	12/mar	10h50	10h50		15h55	PT118320319	cervical c/ reflujo	P
80	PT417025544	F	MB	IA	12/mar	10h52	10h52		15h52	PT118320319	cervical c/ reflujo	P
81	PT219769916	F	MB	IA	12/mar	10h53	10h53		17h38	PT214266231 (11/17)	laparoscópica	P
82	PT114291519	F	MB	IA	12/mar	10h54	10h54		15h47	PT118320319	cervical	N
83	PT419769835	F	MB	IA	12/mar	10h55	10h55		16h09	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	N
84	PT918320471	F	MB	IA	12/mar	10h57	10h57		14h50	PT417546322	cervical c/ reflujo	N
85	PT917025537	F	MB	IA	12/mar	11h12	11h12		14h52	PT517546416	cervical c/ reflujo	N
86	PT018320282	F	MB	IA	12/mar	11h16	11h16		15h50	PT118320319	cervical c/ reflujo	N
87	PT114291496	F	MB	IA	12/mar	11h19	11h19		14h42	PT417546322	cervical	P x2
88	PT317072164	F	MB	IA	12/mar	11h20	11h20		14h54	PT517546416	vaginal	N
89	PT215097181	F	MB	IA	12/mar	x	sem esponja					
90	PT814291483	F	MB	IA	12/mar	11h24	11h24		14h58	PT517546416	vaginal	N
91	PT414211582	F	MB	IA	12/mar	11h31	11h31		16h24	PT914191308 (03/18)	laparoscópica	P
92	PT317546233	F	MP	IA	12/mar	09h36	09h36		15h15	PT918320339	cervical c/ reflujo	N
93	PT417025483	F	MP	IA	12/mar	09h38	09h38		15h29	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	P
94	PT119769889	F	MP	IA	12/mar	09h40	09h40		15h30	PT518320454	cervical c/ reflujo	P
95	PT814291587	F	MP	IA	12/mar	09h42	09h42		15h33	PT017546442	cervical c/ reflujo	P
96	PT618320340	F	MP	IA	12/mar	09h45	09h45		15h38	PT518320454	cervical c/ reflujo	P
97	PT719769923	F	MP	IA	12/mar	09h46	09h46		15h15	PT518320454	cervical	N
98	PT914211594	F	MP	IA	12/mar	09h47	09h47		15h24	PT518320454	cervical	P
99	PT217025484	F	MP	IA	12/mar	09h49	09h49		16h04	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	N
100	PT719142172	F	MP	IA	12/mar	x	sem esponja					
101	PT617546222	F	MP	IA	12/mar	10h06	10h06		15h52	PT218249643 (02/18)	laparoscópica	N
102	PT718320335	F	MP	IA	12/mar	10h07	10h07		15h16	PT918320339	cervical c/ reflujo	P
103	PT618320500	F	MP	IA	12/mar	10h08	10h08		15h13	PT918320339	cervical c/ reflujo	N