

**CONTROLO REPRODUTIVO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÉMEN  
FRESCO E REFRIGERADO EM OVELHAS AWASSI X SARDA EM MAIO.**

*Efeitos da administração de melatonina exógena, de dois tratamentos progestagénicos curtos + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação de sémen.*

**Raquel Rozana Fornazari**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de  
Mestre em Tecnologia da Ciência Animal*

Orientada por:

**Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim**

**Professor Doutor Ricardo Yuji Sado**

**Bragança**

**2018**

*Editado por*

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA – ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA

Campos de Santa Apolónia Apartado - 1172

5301-855 BRAGANÇA

Portugal

Telefone: (+351) 273 303 200 ou (+351) 273 331 570

✉ [sacd@ipb.pt](mailto:sacd@ipb.pt) ou [grei@ipb.pt](mailto:grei@ipb.pt)

 <http://www.esa.ipb.pt>

Reproduções parciais deste documento serão autorizadas na condição que seja mencionado a Autora e feita referência a *Mestrado de Tecnologias da Ciência Animal, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança*.

Este documento foi produzido a partir de versão electrónica cedida pela respectiva Autora.

As opiniões e informações incluídas neste documento representam unicamente o ponto de vista da respectiva Autora, não podendo o Editor aceitar qualquer responsabilidade legal ou outra em relação a erros ou omissões que possam existir

## AGRADECIMENTOS

“O esforço de todos é essencial para construir! Ninguém faz nada sozinho, ninguém chega a lugar algum sem apoio, orientação e participação”. Com essa frase de autor desconhecido mas que resume minha trajetória pelo IPB e por Portugal escrevo essas linhas.

Quero em primeiro lugar agradecer a Deus por minha vida e daqueles que fazem parte dela e a partir disso agradecer também:

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR, câmpus Dois Vizinhos/PR, à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança-IPB e às políticas públicas educacionais que possibilitaram minha dupla diplomação e as tantas novas oportunidades acadêmicas, profissionais e pessoais.

Ao meu orientador do IPB, Professor Doutor Ramiro Valentim, por todo conhecimento transmitido, pela paciência, persistência e exemplo de bondade. Agradeço pelo ambiente de paz e pelo bom humor que sempre encontrei na sua presença. Obrigada por tudo que fez por mim e pela amizade. Espero tê-lo sempre por perto.

Ao meu orientador da UTFPR, Professor Doutor Ricardo Yuji Sado, pela disposição em me ajudar em todos os desafios encontrados nessa trajetória. Obrigada pela paciência, compreensão e pelos ensinamentos. Agradeço também a todas as opiniões e conselhos que me ajudaram a crescer e aprender.

Ao Professor Dr. Raimundo Maurício, por me acolher de forma incondicional. Serei eternamente grata por suas opiniões e preocupações. Tenho certeza que o Senhor foi um dos grandes responsáveis pelas novas alegrias da minha vida. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, pela paciência e por sua amizade.

À Dona Céu (Céu Matos) por toda ajuda no Laboratório de Reprodução Animal, pela harmonia e bom humor, pelo acolhimento. Serei sempre grata a você.

Agradeço a todos os docentes do Mestrado de Tecnologias da Ciência Animal, em especial, Professor Doutor Alfredo Teixeira e Professor Doutor Pedro Bastos.

À Exploração Comercial Mateus LDA, por permitir a utilização dos animais. Ao Senhor Alípio e à Dona Celeste (minha segunda mãe de Portugal) por toda a ajuda, convivência, força, carinho e amor que depositaram em mim desde o início. Obrigada de coração!

Aos amigos que estiveram comigo nessa trajetória, Lucas Felipe Francisco, Ana Paula Rizzoto, Luiza Corrêa e Anderclei Conradi. Obrigada pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço em especial ao meu namorado, Óscar Mateus, pelos ensinamentos, pela perseverança e companheirismo. Sem dúvidas você foi um dos principais pilares deste trabalho. Obrigada por estar sempre ao meu lado e não me deixar desanimar, por me mostrar todo dia que somos capazes de fazer tudo e realizar tudo! Sabes que tens minha gratidão.

À minha família, exemplo de amor. Obrigada pai e mãe por me permitir e me animar neste caminho tão distante, mesmo sabendo que o coração de vocês me queria perto. Vocês são meus exemplos de vida. Conheço e honro cada um dos esforços para eu alcançar essa titulação e principalmente para me fazer crer que sou capaz de realizar todos os meus sonhos. Serei eternamente grata!

Às minhas irmãs, Mara e Aline, por todas as mensagens de carinho enviadas todos os dias, pela amizade, incentivo e amor! Vocês são as melhores amigas que poderiam existir! À minha doce sobrinha Lis, desculpe pela minha ausência. Espero que um dia possamos ficar sempre juntas. Eu amo vocês!

À minha tia, Elena, por todas as orações e por todas as palavras de carinho que me oferece todos os dias.

Assim, já que escrever no papel possibilita reviver os sentimentos que motivaram as palavras, registro aqui minha alegria e entusiasmo em ver concluída essa fase trabalhosa e tão marcante da minha vida quando, “descobrimo a Europa”, tornei-me uma mulher adulta.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE QUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
RESUMO .....	XIII
ABSTRACT .....	XV
INTRODUÇÃO .....	1
I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
1 – FISILOGIA REPRODUTIVA DA OVELHA .....	4
1.1 – SAZONALIDADE REPRODUTIVA.....	4
1.1.1 – CICLO ANUAL E SUA REGULAÇÃO .....	6
1.2 – CICLO ÉSTRICO .....	6
1.2.1 – ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ÉSTRICO .....	9
1.2.1.1 – PRÉ-OVULAÇÃO.....	9
1.2.1.2 – OVULAÇÃO.....	13
1.2.1.3 – PÓS-OVULAÇÃO .....	14
1.2.1.3.1 – Luteinização.....	14
1.2.1.3.2 – Luteólise .....	16
1.2.1.3.3 – Início de novo ciclo éstrico.....	17
2 – CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA .....	18
2.1 – MELATONINA .....	19
2.2 – TRATAMENTOS PROGESTAGÉNIOS.....	20
2.2.1 – TRATAMENTO PROGESTANÉNICO CURTO .....	21
2.3 – GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA.....	22
3 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	23
3.1 – CÉRVIX.....	24
3.1.1 – TAMANHO E FORMA DO CÉRVIX.....	24
3.1.2 – Os EXTERNO .....	26
3.2 – REPRODUTORES A UTILIZAR NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL .....	28
3.3 – SÉMEN DE CARNEIRO.....	29
3.3.1 – RECOLHA DE SÉMEN .....	30
3.3.1.1 – VAGINA ARTIFICIAL.....	32
3.3.1.2 – ELECTROEJACULAÇÃO.....	33

3.3.2 – MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN.....	36
3.3.2.1 – SÉMEN FRESCO .....	37
3.3.2.2 – SÉMEN REFRIGERADO .....	37
3.3.2.3 – DILUIDORES.....	39
3.4 – TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS .....	40
3.4.1 – VAGINAL .....	41
3.4.2 – CERVICAL.....	42
II – TRABALHO EXPERIMENTAL.....	44
1 – MATERIAL E MÉTODOS .....	44
1.1 – ANIMAIS.....	44
1.2 – AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA .....	44
1.2.1 – AVALIAÇÃO DA CICLICIDADE PRÉ-TRATAMENTO PROGESTAGÉNICOS.....	45
1.2.2 – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS +ECG	45
1.3 – TRATAMENTOS APLICADOS.....	45
1.4 – RECOLHA DO SÉMEN.....	47
1.5 – DOSES SEMINAIS (FRESCAS E REFRIGERADAS) .....	48
1.6 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL A TEMPO FIXO.....	49
1.6.1 – POSIÇÃO DAS FÊMEAS DURANTE A INSEMINAÇÃO.....	51
1.7 – DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	51
1.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
2.1 – ESTADO FISIOLÓGICO PRÉ-TRATAMENTO PROGESTAGÉNICO.....	54
2.2 – RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS CURTOS + ECG.....	54
2.3 – RESPOSTA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	56
2.3.1 – IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL.....	56
2.3.2 – MELATONINA EXÓGENA .....	57
2.3.3 – TIPO DE PROGESTAGÉNIO.....	58
2.3.4 – DOSE DE ECG .....	58
2.3.5 – NÚMERO DE PARTOS.....	59
2.3.6 – CARNEIRO .....	59
2.3.7 – MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN .....	59

2.3.8 – DILUIDOR SEMINAL .....	60
2.3.9 – Os EXTERNO .....	60
2.3.10 – COR DA MUCOSA E LUBRIFICAÇÃO VAGINAL .....	61
2.3.11 – VISCOSIDADE DAS SECREÇÕES CERVICAIS .....	62
2.3.12 – LOCAL DE DEPOSIÇÃO DE SÉMEN .....	62
2.3.13 – REFLUXO VAGINAL .....	63
3 – CONCLUSÕES.....	64
III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I. Ciclo éstrico na ovelha.....	7
Quadro II. Divisão das ovelhas de acordo com os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva aplicados .....	46
Quadro III. Doses de sémen fresco ou refrigerado, diluído com Andromed® (Andro) ou OviXcell .....	48
Quadro IV. Idade, peso e condição corporal (CC) das ovelhas estudadas de acordo com os tratamentos hormonais aplicados, com o processo de preservação e o tipo de diluidor .....	53
Quadro V. Configuração anatómica da entrada do canal cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade .....	61
Quadro VI. Local de deposição do sémen (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade .....	63
Quadro VII. Refluxo cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Equilíbrio entre os factores condicionadores da actividade reprodutiva .....	2
Figura 2. Sazonalidade reprodutiva entre os ovinos no Norte da Europa .....	5
Figura 3. Variação das principais hormonas envolvidas na regulação do ciclo éstrico da ovelha: FSH, LH, estrogénios (E <sub>2</sub> ) e progesterona (P <sub>4</sub> ) .....	9
Figura 4. Variação da secreção pulsátil de LH ao longo do ciclo éstrico da ovelha .....	10
Figura 5. Crescimento dos folículos antrais que emerge com 2-3 milímetros nas ovelhas ....	11
Figura 6. Via de transporte da PGF <sub>2α</sub> no endométrio uterino até ao ovário onde induz a lise do corpo lúteo .....	17
Figura 7. Efeito do fotoperíodo sobre a secreção de melatonina .....	19
Figura 8. Variação temporal dos níveis plasmáticos médios de cronolona em ovelhas tratadas com Chronogest CR .....	21
Figura 9. Efeitos de um tratamento progestagénico curto associado à administração de Gonadotrofica Coriónica equina (eCG) .....	22
Figura 10. Fotografia da cérvix de ovelha da raça Churra Galega Bragançana seccionada verticalmente evidenciando os anéis cervicais .....	25
Figura 11. Estrutura interna do cérvix da ovelha (secção longitudinal).....	26
Figura 12. Classificação da aparência da entrada do Os cervical externo da ovelha .....	27
Figura 13. Vaginas artificiais para pequenos ruminantes .....	32
Figura 14. Contenção e preparação de um carneiro para a recolha de sémen por electroejaculação .....	34
Figura 15. Banho-maria refrigerado usado na refrigeração de sémen .....	38
Figura 16. Contador de cintilações y (esquerda) e colocação dos tubos de ensaio nos poços de leitura.....	45
Figura 17. Materia necessário à colocação de implantes subcutâneos de melatonina .....	46
Figura 18. Materia necessário à colocação de esponjas vaginais.....	47
Figura 19. Banho-maria, palhinhas francesas e pó-polivilínico.....	47
Figura 20. Avaliação visual de algumas características seminais .....	48
Figura 21. Banho-maria refrigerado .....	49
Figura 22. Banho-maria (esquerda) e arca refrigeradora (direita) para transporte, respectivamente, de sémen fresco e refrigerado.....	49
Figura 23. Classificação do tipo de Os externo: a) bico de pato, b) aba, c) rosa, d) papila e e) fenda .....	50
Figura 24. Equipamento e material de inseminação utilizado .....	50
Figura 25. Posição de inseminação das ovelhas.....	51
Figura 26. Ecógrafo Mindray Z5Vet e sonda rectal multifrequência .....	52
Figura 27. Variação da taxa de fertilidade em função da idade das ovelhas Awassi x Sarda. 57	

## LISTA DE ABREVIATURAS

% – Percentagem

c.v. – Coeficiente de variação

CIDR – *Controlled Internal Drug Release*

CL – Corpo lúteo

CC – Condição corporal

CASA – *Computer-Assisted Semen Analysis*

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

E<sub>2</sub> – Estrogénios

*et al.* – E colaboradores

FGA – Acetato de Fluogesterona

FSH – Hormona Folículo-Estimulante

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina Coriônica humana

IA – Inseminação artificial

i.m. – Intramuscular

Kg – Quilograma

LED – Diodo Emissor de Luz

LH – Hormona Luteinizante

mg – Miligramas

MHz – Megahertz

ml – Mililitro

MAP – Acetato de Medroxiprogesterona

ng/ml – Nanogramas por mililitros

°C – Graus centígrados

° – Graus

Pg/ml – Pico grama por mililitro

PPNPP<sub>4</sub> – Primeira Elevação dos Níveis Plasmáticos de Progesterona.

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

PRL – Prolactina

P<sub>4</sub> – Progesterona

RIA – Radioimunoensaio

r.p.m. – Rotação por minuto

TRIS – Hidroximetil Aminometano

UI – Unidades internacionais

µg – Microgramas

VA – Vagina artificial

*vs.* – *Versus*

$\chi^2$  – Qui-quadrado

## RESUMO

Do ponto de vista da Produção Ovina é importante conhecer a eficácia da aplicação das técnicas de controlo reprodutivo e de inseminação artificial (IA) em explorações comerciais.

O presente trabalho teve como principal objectivo avaliar a eficácia da aplicação de um tratamento prévio com melatonina e de dois tratamentos progestagénicos curtos (FGA vs. MAP) + eCG (750 UI) no controlo da actividade reprodutiva de ovelhas cruzadas Awassi x Sarda, durante o mês de Maio. Simultaneamente procurou-se avaliar os efeitos da utilização de dois diluidores seminais – Andromed<sup>®</sup> vs. OviXcell<sup>®</sup> – e do método de preservação do sémen – Fresco vs. Refrigerado – na IA destes animais.

O ensaio foi realizado em Carviçais, Torre de Moncorvo, mais precisamente na Exploração Comercial (Mateus Lda.), entre os meses de Abril e de Julho de 2017. Nele foram utilizadas 110 ovelhas lactantes cruzadas de Awassi x Sarda e dois carneiros Assaf. Inicialmente as ovelhas foram divididas em dois grupos: Controlo (n = 47) e Melatonina (n = 63). As ovelhas do grupo Controlo não receberam qualquer tratamento. As ovelhas do grupo Melatonina receberam um implante subcutâneo (18 mg) de melatonina/fêmea. Sessenta dias depois, 83 ovelhas foram tratadas com esponjas vaginais de 20 mg de FGA e 27 ovelhas com esponjas vaginais de 60 mg de MAP. Nessa altura, todas as ovelhas foram injectadas via subcutânea com 100 µg de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). Os tratamentos progestagénicos duraram 7 dias. Quando da remoção das esponjas vaginais, todas as ovelhas receberam uma injeção de 750 UI de eCG. A IA foi realizada 55 + 1 horas depois da remoção das esponjas. Cinquenta e seis ovelhas foram inseminadas com sémen fresco: 29 com doses seminais diluídas com Andromed<sup>®</sup> e 27 com OviXcell<sup>®</sup>. As demais 54 ovelhas foram inseminadas com sémen refrigerado: 29 das doses seminais foram diluídas com Andromed<sup>®</sup> e 25 com OviXcell<sup>®</sup>. Avaliou-se a ciclicidade pré e pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG e a percentagem de ovelhas gestantes 38 dias pós-inseminação.

Na segunda quinzena de Maio, todas as ovelhas Awassi x Sarda estavam cíclicas. Ambos os tratamentos progestagénicos curtos (FGA ou MAP) + eCG foram eficazes. A administração prévia de melatonina não afectou a percentagem de ovelhas que ovularam em resposta aos tratamentos progestagénicos + eCG. O FGA e o MAP foram igualmente eficazes na sincronização do momento de formação do primeiro CL. Trinta e oito dias após a IA, 74,5% das ovelhas Awassi x Sarda estavam gestantes. A taxa de fertilidade foi significativamente influenciada pela idade das ovelhas, pelo carneiro dador de sémen, pelo tipo de Os externo, pelo local de deposição do sémen e pelo refluxo cervical. A taxa de fertilidade não foi

significativamente alterada pelo número de partos (Primíparas vs. Multíparas), método de preservação do sémen (Fresco vs. Refrigerado), pelo tipo de diluidor (Andromed<sup>®</sup> vs. OviXcell<sup>®</sup>).

**Palavras-chave:** Ovinos, Awassi x Sarda, melatonina, FGA, MAP, super-ovulação, IA.

## **ABSTRACT**

The knowledge of the efficiency of reproduction control techniques and artificial insemination (AI) is very important in commercial farms.

This work aimed to assess the effectiveness of a prior melatonin and two short progestogen treatments (FGA *vs.* MAP) + eCG (750 UI) in the control of the ovarian activity of cross-bred Awassi x Sarda sheep at May. Simultaneously, the effects of two seminal extenders – Andromed<sup>®</sup> *vs.* OviXcell<sup>®</sup> – and two method of semen preservation – Fresh *vs.* Cooled –in the AI of these ewes were evaluated.

This experiment took place in Carviçais, Torre de Moncorvo, at a commercial farm (Mateus Ltd) between April and July of 2017. One-hundred and ten lactating Awassi x Sarda ewes and two Assaf rams were used. Primarily ewes were divided into two groups: Control (n = 47) and Melatonin (n = 63). Control ewes received no treatment. Melatonin ewes were treated with a subcutaneous melatonin implant (18 mg). Sixty days later, 83 ewes were treated with a vaginal sponge of FGA (20 mg) and 27 with a vaginal sponge of MAP (60 mg). Simultaneously all ewes received a subcutaneous injection with 100 µg of Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>). Progestogen treatments lasted for 7 days. At sponges removal all ewes received an injection of 750 UI of eCG. AI was performed 55 + 1 hours after sponge removal. Fifty six ewes were inseminated with fresh semen: 29 with semen extended with Andromed<sup>®</sup> and the other 27 with semen extended with OviXcell<sup>®</sup>. The remaining 54 ewes were inseminated with cooled semen: 29 with semen extended with Andromed<sup>®</sup> and the other 25 with semen extended with OviXcell<sup>®</sup>. Pre and post short-term progestogen + eCG treatments ovarian activity was assessed as well as the fertility rate (38 days after AI).

All Awassi x Sarda ewes ovulated at the second fortnight of May. Both short-term progestogen treatments (FGA or MAP) + eCG were quite efficient. Previous administration of melatonin did not affect the percentage of ewes responding to the progestogen + eCG treatments. FGA and MAP were equally efficient. About 74.5% of the Awassi x Sarda ewes were pregnant 38 days after AI. Fertility rate was significantly influenced by age, semen donor, type of external *Os*, place of semen deposition and cervical reflux. On the contrary fertility rate was not significantly affected by parity (Primiparous *vs.* Multiparous), semen preservation method (Fresh *vs.* Cooled) or seminal extender (Andromed<sup>®</sup> *vs.* OviXcell<sup>®</sup>).

**Keywords:** Ovine, Awassi x Sarda, melatonin, FGA, MAP, superovulation, AI.

## INTRODUÇÃO

A produção ovina foi umas das primeiras actividades zootécnicas desenvolvidas pelo homem, uma vez que os ovinos foram dos primeiros animais a ser domesticados (Filho, 2006, Viana, 2009 e Fonseca *et al.*, 2012). O homem terá começado por utilizar os ovinos como uma fonte de alimento (carne e leite) antes de os utilizar como produtores de lã (Hyde, 1988). Porém, assim que começou a confeccionar o seu vestuário a fim de se proteger do frio e do calor, depressa aprendeu que os ovinos podiam valer mais vivos do que mortos (Hyde, 1988).

Ao longo do processo evolutivo, os animais desenvolveram mecanismos que lhes permitem em períodos de escassez de alimentos direccionar os nutrientes para a manutenção de funções fisiológicas essenciais à vida em detrimento de outras que não contribuem no imediato para a sua sobrevivência (caso da actividade reprodutiva) (El-Maati e El-Gawad, 2014 e Dendena, 2017). A sazonalidade reprodutiva é uma consequência destes mecanismos (Scaramuzzi *et al.*, 2006, Abecia *et al.*, 2017 e Dendena, 2017). Ela garante que a maioria dos animais se reproduz numa época específica do ano, para que os partos coincidam com o momento do ano em que as disponibilidades naturais de alimentos e as condições climáticas são mais favoráveis ao crescimento fetal final e à lactação (Martin *et al.*, 2002, Thiéry *et al.*, 2002, Rosa e Bryant, 2003, Duarte *et al.*, 2008, Menassol *et al.*, 2012 e Dendena, 2017), aumentando assim as probabilidades de sobrevivência da mãe e da(s) cria(s) (Hugo e Chemineau, 2004, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Duarte *et al.*, 2008, Safari *et al.*, 2012 e Dendena, 2017).

Nas explorações ovinas os principais custos de produção estão associados à alimentação, pelo que existe sempre uma grande pressão no sentido de os reduzir e para que estes originem os maiores benefícios possíveis (Martin *et al.*, 2004). A reprodução é a principal actividade geradora de benefícios económicos, ainda que seja dispendiosa do ponto de vista nutricional (Martin *et al.*, 2004, Blache *et al.*, 2008, Viana, 2009, Fonseca *et al.*, 2012 e Mateus *et al.*, 2016). Para que a rentabilidade das explorações seja máxima há que minimizar os períodos improdutivos, otimizar as taxas reprodutivas (mais fêmeas gestantes e mais crias nascidas) e produtivas (maiores taxas de sobrevivência, de crescimento e um conseqüente maior número de crias vendidas), controlar a actividade reprodutiva de modo a que o período de maior produção coincida com o período de maior procura por parte dos mercados (Mateus *et al.*, 2016).

Para que haja um bom desempenho reprodutivo é necessário “equilibrar” os factores que o condicionam. Estes podem ser internos – genética e indivíduo (idade, sexo, peso, condição corporal, estado fisiológico, estado de saúde, entre outros) – e externos: alimentação, condições ambientais (fotoperíodo, temperatura, humidade do ar, dinâmica atmosférica, entre outros) e relações sociais (dominância, permanência ou não dos machos junto das fêmeas, relações mãe-cria, entre outros) (Baril *et al.*, 1993, Hafez e Hafez, 2004 e Morello e Chemineau, 2004 e Mateus *et al.*, 2016) (Figura 1). **Factores externos**

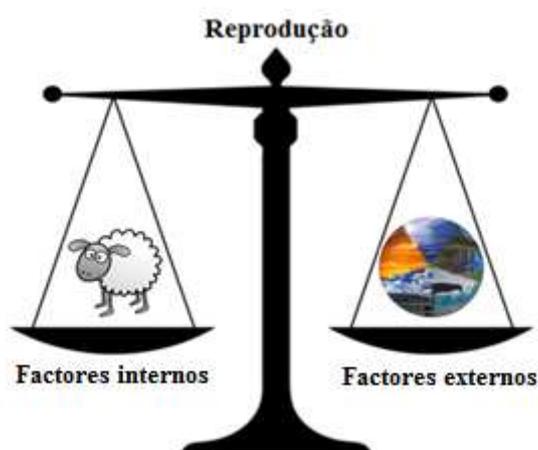


Figura 1 – Equilíbrio entre os factores condicionadores da actividade reprodutiva.

O controlo da actividade reprodutiva é uma das técnicas mais importantes em qualquer uma das modernas explorações de produção ovina (Mateus *et al.*, 2016). Todavia a resposta dos animais aos tratamentos de controlo da actividade reprodutiva é muito variável, pois ela é multifactorial (Azevedo *et al.*, 2006, López-Sebastian *et al.*, 2007, Bartlewski *et al.*, 2008, González-Bulnes *et al.*, 2010 e Bukar *et al.*, 2012). Não existe um tratamento ideal (Azevedo *et al.*, 2006). Existem vários tratamentos e a sua eleição deve ter em conta as condições presentes de cada exploração (Azevedo *et al.*, 2006).

A técnica de IA comporta vantagens tão importantes como melhorar a gestão da exploração, promover um rápido progresso genético (utilização de machos melhorados, mesmos que eles estejam geograficamente afastados, inclusive, outro País), prevenir doenças sexualmente transmissíveis, reduzir o número de machos presentes na exploração, baixar os custos de produção e aumentar o rendimento da exploração (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Chemineau *et al.*, 1996, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004a,b, El-Shahat e Alsafy, 2009, Bucak *et al.*, 2010, Fonseca *et al.*, 2010, Cseh *et al.*, 2012, Konyali *et al.*, 2013, Santolaria *et al.*, 2014, Palacios e Abecia, 2015, Abecia *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Yotov *et al.*, 2016, Abecia *et al.*, 2017,

Abecia *et al.*, 2017, Banday *et al.*, 2017 e Romano *et al.*, 2017). A IA pode ser feita com sémen fresco (puro ou diluído), sémen refrigerado (diluído) ou congelado (diluído) (Ferra e Sereno, 2006, Palacios, 2010, Morrell, 2011 e Leão, 2017). O sémen pode ser depositado no fundo do saco vaginal, no canal cervical ou no útero (Anel *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Fonseca *et al.*, 2010, Valentim *et al.*, 2016d e Leão, 2017).

O presente trabalho teve como principal objectivo avaliar a eficácia da aplicação de um tratamento prévio com melatonina e de dois tratamentos progestagénicos curtos (FGA *vs.* MAP) + eCG (750 UI) no controlo da actividade reprodutiva de ovelhas cruzadas Awassi x Sarda, durante o mês de Maio. Simultaneamente procurou-se avaliar os efeitos da utilização de dois diluidores seminais – Andromed<sup>®</sup> *vs.* OviXcell<sup>®</sup> – e do método de preservação do sémen – Fresco *vs.* Refrigerado – na IA destas fêmeas.



## **I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1 – FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA OVELHA**

As ovelhas são animais poliéstricos sazonais, uma vez que possuem um padrão reprodutivo regido pela estação reprodutiva ou pela estação de anestro (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Simonetti, 2008, Fonseca *et al.*, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Durante a estação reprodutiva (“dias decrescentes” ou “dias curtos”) se as ovelhas não ficarem gestantes, os ciclos éstricos sucedem-se de forma regular (Morello e Chemineau, 2004 e Bartlewski *et al.*, 2011), garantindo-lhes repetidas oportunidades de copularem e de ficarem gestantes (Morello e Chemineau, 2004). São múltiplas as alterações neuroendócrinas que estão associadas ao ciclo éstrico e que resultam da interacção coordenada de vários órgãos: glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários, útero e placenta (Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Bartlewski *et al.*, 2011). Esta actividade é condicionada por factores genéticos, individuais, fisiológicos, ambientais e sociais (Baril *et al.*, 1993, Hafez e Hafez, 2004 e Morello e Chemineau, 2004).

#### **1.1 – SAZONALIDADE REPRODUTIVA**

A sazonalidade reprodutiva constitui um dos maiores obstáculos à gestão flexível das explorações ovinas uma vez que condiciona a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos comerciais (Quirke *et al.*, 1986, Vijil, 1989, Fitzgerald e Sellflug, 1991, Haresign, 1993, Gates *et al.*, 1998, Vincent *et al.*, 2000, El-Alamy *et al.*, 2001, Morello e Chemineau, 2004, Valentim, 2004 e Mateus, 2014). Mantém a sua utilidade nos sistemas de exploração extensivos tradicionais dado que a alimentação dos animais assenta nas disponibilidades naturais de alimentos (Mateus, 2014). Contudo, os mercados têm normalmente muita dificuldade em absorver, em poucos meses, a produção total anual de carne fresca de borrego (Vijil, 1986, Gates *et al.*, 1998 e Valentim, 2004).

A duração da estação reprodutiva varia em função da latitude – diminui com o aumento da latitude (Chemineau *et al.*, 1992, Valentim, 2004, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Fonseca *et al.*, 2010). Nas regiões temperadas mais setentrionais e meridionais (> 40°-45°), o fotoperíodo (duração do período diário de luz) é o principal factor ambiental regulador da sazonalidade reprodutiva (Chemineau *et al.*, 1992, Baril *et al.*, 1993, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Fonseca *et al.*, 2010 e Santolaria *et al.*, 2011). A estação reprodutiva ocorre no Outono (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Bartlewski *et al.*, 2011). Nas regiões temperadas intermédias (Reino Unido e

Norte e Centro de França), a actividade ovárica cíclica surge no fim do Verão/início de Outubro e prolonga-se pelo Inverno (Baril *et al.*, 1993, Fonseca, 2005, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010) (Figura 2). Nas regiões temperadas de menor latitude, a sazonalidade tende a ser cada vez menos marcada e a importância relativa do fotoperíodo parece ser progressivamente substituída pela alimentação (Chemineau *et al.*, 1992, Baril *et al.*, 1993 e Mateus, 2014). No Sul da Europa, a sazonalidade reprodutiva é pouco marcada e a estação reprodutiva estende-se sensivelmente do Solstício de Verão ao Solstício de Inverno (Valentim, 2004, Abecia *et al.*, 2012 e Afonso, 2015).

Em Portugal os factores ambientais que mais condicionam a actividade reprodutiva são: o fotoperíodo, a temperatura do ar, a pluviosidade, a disponibilidade natural de alimentos e as relações sociais (Mateus *et al.*, 2016). Estes factores condicionam as reservas corporais de energia que podem vir a ser usadas na reprodução (Leão *et al.*, 2016 e Valentim *et al.*, 2016a). Na prática, a actividade sexual apenas se reduz durante alguns meses ou semanas do ano (Correia, 1996, Bettencourt, 1999, Sacoto, 2012 e Valentim *et al.*, 2016). Contudo, o genótipo desempenha sempre um importante papel (Hafez, 1987, Chemineau e Delgadillo, 1990 e Pérez-Clariget e Porras, 2008).

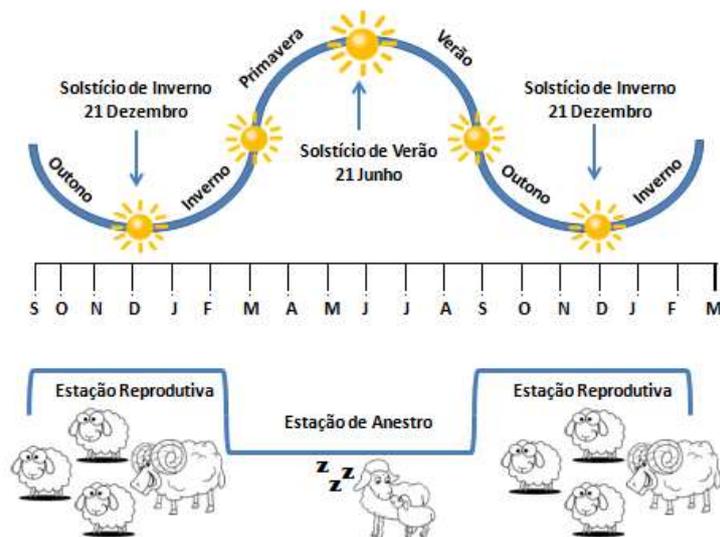


Figura 2. Sazonalidade reprodutiva entre os ovinos no Norte da Europa.

Nas regiões tropicais onde o fotoperíodo pouco ou nada varia, as cobrições ocorrem ao longo de todo o ano (Chemineau *et al.*, 1992, Baril *et al.*, 1993 e Fonseca *et al.*, 2010). Ainda assim, algumas raças de pequenos ruminantes originárias ou adaptadas às condições tropicais apresentam sazonalidade reprodutiva (Walkden-Brown *et al.*, 1999). Nestes animais, a

temperatura e a pluviosidade são os factores ambientais mais importante, por condicionar as disponibilidades naturais de alimentos (Baril *et al.*, 1993, Thatcher e Hansen, 1993, Rosa e Bryant, 2003, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Fonseca *et al.*, 2010).

### **1.1.1 – CICLO ANUAL E SUA REGULAÇÃO**

O ciclo anual de actividade ovárica é determinado por um padrão reprodutivo constituído por uma estação reprodutiva e uma estação de anestro (Correia, 1996, Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Fonseca *et al.*, 2010, Bartlewski *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2015). Na estação reprodutiva, as ovelhas manifestam ciclicamente comportamento sexual e ovulações espontâneas (Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). Na estação de anestro, as fêmeas tendem a não apresentar manifestações de cio e/ou a não ovularem de forma cíclica (Correia, 1996, Simonetti, 2008 e Fonseca *et al.*, 2010).

A duração da estação reprodutiva varia em função da espécie, da raça, do indivíduo, das condições ambientais e das relações sociais (Hafez, 1987, Baril *et al.*, 1993, Correia, 1996, Hafez e Hafez, 2004 e Morello e Chemineau, 2004, Valentim *et al.*, 2015 e Mateus *et al.*, 2016). O nascimento das crias deve ocorrer na altura do ano em que as condições naturais são mais favorável à sobrevivência e ao crescimento das crias (Hafez, 1987, Chemineau *et al.*, 1992, Baril *et al.*, 1993, Correia, 1996, Forcada, 2010, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015). Independentemente da duração da estação reprodutiva, todas as raças ovinas alcançam a sua plenitude reprodutiva no Outono (Correia, 1996, Simonetti, 2008 e Valentim *et al.*, 2015).

São dois os principais mecanismos de controlo da sazonalidade reprodutiva: a) o ritmo endógeno circanual da actividade neuroendócrina, que se manifesta sempre que os animais são mantidos sob um fotoperíodo constante (Correia, 1996, Valentim, 2004 e Simonetti, 2008) e b) alteração do período diário de luz (fotoperíodo) e sua interpretação pelo sistema neuroendócrino (Correia, 1996, Valentim, 2004 e Simonetti, 2008).

### **1.2 – CICLO ÉSTRICO**

Nas ovelhas após o estabelecimento da puberdade desenvolve-se um padrão rítmico de eventos fisiológicos que promovem alterações comportamentais e anátomo-morfológicas no tracto genital (Baril *et al.*, 1993, Bettencourt, 1999, Morello e Chemineau, 2004 e Dendena, 2017). Este ciclo de mudanças é denominado de ciclo éstrico (Quadro I) (Bettencourt, 1999, Morello e Chemineau, 2004 e Dendena, 2017). Estas variações cíclicas são interrompidas

apenas pela gestação, por condições ambientais desfavoráveis e por patologias (Baril *et al.*, 1993, Bettencourt, 1999, Morello e Chemineau, 2004 e Dendena, 2017).

Na estação reprodutiva a duração do ciclo éstrico é notavelmente consistente (Bartlewski *et al.*, 2011). A duração média é de 16,5 dias (Baril *et al.*, 1993) ou de 17 dias (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010). Contudo, ela pode variar entre 14-19 dias (Morello e Chemineau, 2004 e Pérez-Clariget e Porras, 2008), 15-19 dias (Maia, 2010), 16-17 dias (Hafez, 1987 e Bartlewski *et al.*, 2011) ou 16-19 dias (Forcada, 2010). A duração do ciclo éstrico varia com a idade, a raça e a estado fisiológico (Pérez-Clariget e Porras, 2008). Os efeitos da idade são muito reduzidos (Bartlewski *et al.*, 2011). Por seu turno, as diferenças entre raças não ultrapassam normalmente mais de 1 dia (Bartlewski *et al.*, 2011). Uma elevada frequência de ciclos “curtos” – insuficiente luteinização e destruição precoce do corpo lúteo (CL) (Hunter, 1991) – e “longos” – prolongamento da actividade do CL (Bartlewski *et al.*, 1999) – são detectáveis nos períodos de transição entre as estações reprodutiva e de anestro e vice-versa (Baril *et al.*, 1993, Correia, 1996, Morello e Chemineau, 2004 e Pérez-Clariget e Porras, 2008) e durante o anestro (Correia, 1996).

Quadro I. Ciclo éstrico na ovelha (Morello e Chemineau, 2004)

Fase	Período	Duração (dias)	Hormona dominante	Ovário	Cérvix	Vagina	Genital externo	Comportamento
Folicular	Proestro	2,5	FSH, LH, E <sub>2</sub>	CL a regredir. Desenvolvimento do foliculo pré-ovulatório	Muco	Secreção	Normais	Fêmea inquieta, que procura o macho
	Estro	1-2 (± 30 horas)	Pico pré-ovulatório de LH (6-12 horas pós-cio)	Ovulação (24-30 horas pós-início do cio)	Muco espesso. Congestão das pregas do cérvix	Secreção copiosa	Vulva congestionada.	Imobilidade perante a monta
Lútea	Metaestro	2-4	Aumento da secreção de P <sub>4</sub>	Formação do CL. Desenvolvimento das ondas foliculares	Fecho do orifício uterino	Epitélio pálido	Vulva normal	Fêmea inactiva
	Diestro	4-11/13	P <sub>4</sub> e FSH PGF <sub>2α</sub> (luteólise)	CL funcional. Desenvolvimento das ondas foliculares	Orifício uterino fechado	Pálida	Vulva normal	Fêmea inactiva

Legenda: FSH (Hormona Folículo-Estimulante), LH (Hormona Luteinizante), E<sub>2</sub> (Estrogénios), P<sub>4</sub> (Progesterona) e PGF<sub>2α</sub> (Prostaglandina F<sub>2α</sub>).

Nas ovelhas a duração do cio é de aproximadamente 30 horas (Pérez-Clariget e Porras, 2008), oscilando entre as 24-36 horas de cio (Costa, 2007, Fonseca *et al.*, 2010 e Maia, 2010),

a 24-40 horas (Forcada, 2010) ou as 24-48 horas (Pérez-Clariget e Porras, 2008). Este tende a ser mais prolongado nas ovelhas mais prolíficas e mais velhas (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010). Varia ainda em função da época do ano (Steyn, 2003, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010). Se a cobrição ocorrer no início do cio, a duração deste pode ser encurtada (Steyn, 2003 e Pérez-Clariget e Porras, 2008). Pelo mesmo motivo, quando os carneiros são deixados junto das ovelhas para identificar os cios, estes podem durar apenas metade do tempo (Pérez-Clariget e Porras, 2008). O pico pré-ovulatório de LH surge 2-6 horas (Forcada, 2010), 8-12 horas (Pérez-Clariget e Porras, 2008) ou 12 horas (Morello e Chemineau, 2004) após o início do cio. Os níveis de LH mantêm-se elevados (100-200 ng/ml; 50-100 vezes os níveis basais) durante cerca de 10 horas (Morello e Chemineau, 2004) ou 12 horas (Pérez-Clariget e Porras, 2008) e depois caem para níveis basais (Morello e Chemineau, 2004). A ovulação ocorre cerca de 24 horas após o pico pré-ovulatório de LH (Baril *et al.*, 1993 e Pérez-Clariget e Porras, 2008), ou seja, no último terço do cio (Robinson, 1965, Steyn, 2003, Freitas e Rubianes, 2004 e Fonseca *et al.*, 2010): 24-30 horas (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Maia, 2010), 24-32 horas (Forcada, 2010), 25-30 horas (Baril *et al.*, 1993 e Steyn, 2003), 30 horas (Morello e Chemineau, 2004) ou 30-36 horas após o início do cio (Costa, 2007). O intervalo entre o pico pré-ovulatório de LH e a ovulação é muito constante (Pérez-Clariget e Porras, 2008).

O ciclo éstrico pode ser dividido em duas fases: folicular e lútea (Baril *et al.*, 1993 e Morello e Chemineau, 2004). A fase folicular tem uma duração de cerca de 3-4 dias (McDonald, 1991, Fernández Abella, 1999 e Forcada, 2010), ou seja, 20% do ciclo éstrico (Morello e Chemineau, 2004). Estende-se entre a luteólise e a ovulação (Morello e Chemineau, 2004) e inclui duas subfases: proestro (quando os níveis circulantes de P<sub>4</sub> se tornam inferiores a 1 ng/ml) e estro (McDonald, 1991, Fernández Abella, 1999 e Morello e Chemineau, 2004). No decurso desta fase, a estrutura ovárica primária é o folículo pré-ovulatório, secretor de elevadas quantidades de estradiol (Morello e Chemineau, 2004). Dependendo da espécie e da raça o proestro pode durar 2-5 dias (Morello e Chemineau, 2004). É nesta subfase que os folículos ováricos são seleccionados para a ovulação (Morello e Chemineau, 2004). De acordo com a raça, 1-4 folículos tornam-se dominantes e ovulam (Morello e Chemineau, 2004, Granados *et al.*, 2006 e Bartlewski *et al.*, 2011). A fase lútea estende-se por 11 dias (Forcada, 2010), 12-14 dias (Keyes *et al.*, 1983 e Fernández Abella, 1999) ou 13-14 dias (Legan e Karsch, 1979), ou seja, cerca de 80% da duração do ciclo éstrico (Morello e Chemineau, 2004). Esta fase compreende duas subfases: metaestro e diestro (Sebastian Lopez, 1989, Baril *et al.*, 1993 e Morello e Chemineau, 2004). O metaestro (2-3 dias) inicia-se após a ovulação, quando o

fóliculo De Graff se enche de sangue e se transforma em corpo hemorrágico (Morello e Chemineau, 2004). O diestro é a subfase do ciclo éstrico mais longa (11-13 dias) e caracteriza-se pela produção de P<sub>4</sub>, sintetizada a partir do CL (Morello e Chemineau, 2004). Os valores plasmáticos desta hormona elevam-se entre o 4º-5º dia, para atingirem um *plateau* por volta do 8º dia (3-4 ng/ml) (Morello e Chemineau, 2004). A secreção de P<sub>4</sub> mantém-se até ter início a luteólise do CL (Morello e Chemineau, 2004). Se a fêmea não ficar gestante, 11-12 dias depois o CL transforma-se em corpo branco ou de albicans (Morello e Chemineau, 2004).

## 1.2.1 – ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ÉSTRICO

### 1.2.1.1 – PRÉ-OVULAÇÃO

O ciclo éstrico é controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise, que interage com os ovários e o útero através da secreção de várias hormonas (Figura 3) (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). A nível de sistema nervoso central, o hipotálamo produz GnRH (Hormona Libertadora de Gonadotropinas) (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). A sua semivida é muito curta: 4-5 minutos (Baril *et al.*, 1993). Esta hormona controla a secreção de gonadotropinas hipofisárias – FSH (Hormona Folículo-estimulante) e LH (Hormona Luteinizante) (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011).

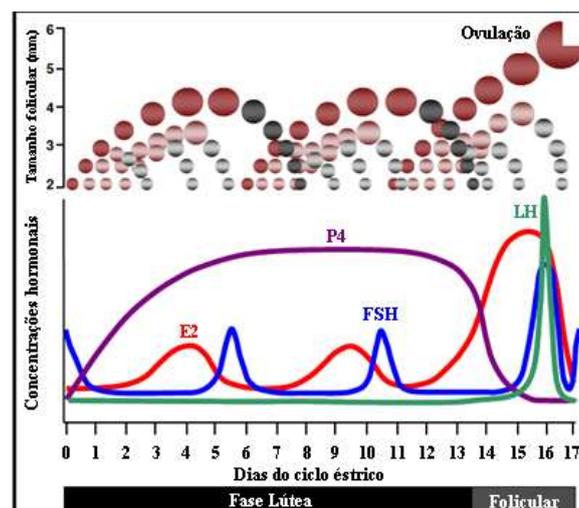


Figura 3. Variação das principais hormonas envolvidas na regulação do ciclo éstrico da ovelha: FSH, LH, estrogénios (E<sub>2</sub>) e progesterona (P<sub>4</sub>) (Simonetti, 2008).

A secreção das gonadotropinas é ainda regulada através de mecanismos de retroacção exercido por outras hormonas ou factores de origem ovárica (Binkley, 1995, Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porrás, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Neste sentido, existem mecanismos de retroacção negativa ou positiva que envolvem os esteróides sexuais – estrogénios ( $E_2$ ) e progesterona ( $P_4$ ) – na libertação de FSH e de LH (Binkley, 1995, Pérez-Clariget e Porrás, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011) ou um mecanismo de retroacção negativa exercida pela inibina folicular sobre a secreção de FSH (Baird *et al.*, 1991, Binkley, 1995, Morello e Chemineau, 2004, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Consequentemente, os folículos dominantes impedem o crescimento de outros folículos e limitam a taxa de ovulação (Morello e Chemineau, 2004 e Bartlewski *et al.*, 2011).

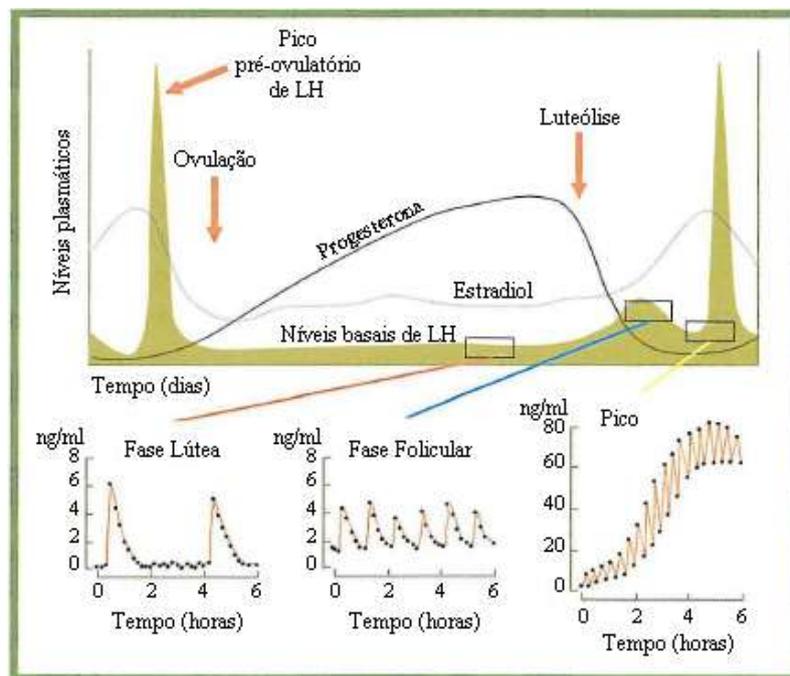


Figura 4. Variação da secreção pulsátil de LH ao longo do ciclo éstrico da ovelha (Forcada, 2010).

As gonadotropinas são sintetizadas e armazenadas nas células da adeno-hipófise, para logo serem libertadas por exocitose (Simonetti, 2008). As gonadotropinas actuam a nível ovárico (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). A FSH condicionando o recrutamento, o crescimento folicular e, conjuntamente com a LH, a maturação final do(s) folículo(s) ovulatórios (Baril *et al.*, 1993, Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). Na realidade, a FSH participa na formação dos receptores membranares de LH que tornam as células foliculares sensíveis à acção da LH (Baril *et al.*, 1993). A LH promove a maturação dos oócitos, a ovulação e a função lútea (Simonetti, 2008,

Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011) (Figura 4). De um modo geral, as hormonas peptídicas ligam-se a receptores de membrana e desencadeiam reacções em cascata no interior da célula (Forcada, 2010). Os seus efeitos são rápidos, uma vez que determinam, fundamentalmente, a activação enzimática (síntese de outros produtos) ou a alteração da permeabilidade da membrana plasmática (secreção hormonal) (Binkley, 1995 e Forcada, 2010).

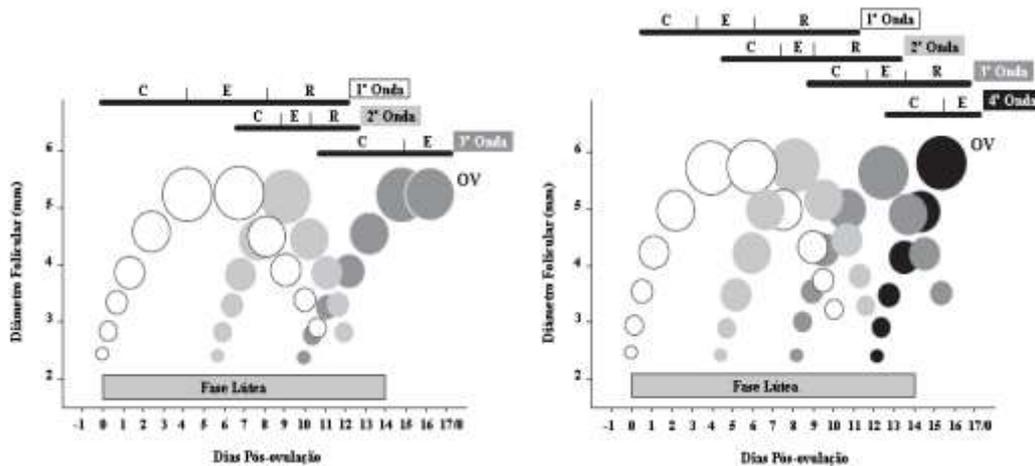


Figura 5. Crescimento dos folículos antrais que emerge com 2-3 milímetros nas ovelhas (Bartlewski *et al.*, 2011). Cada ciclo éstrico tem 3 (esquerda) ou 4 (direita) ondas foliculares. Os folículos de maior dimensão que crescem mais de 5 milímetros, antes de regredirem ou de ovularem, emergem numa sucessão ordenada de 3-4 ondas foliculares. Legenda: OV – ovulação, C – fase de crescimento, E – fase estática, R – fase de regressão e mm – milímetros.

No decurso do ciclo éstrico, a LH não é segregada de uma forma contínua, mas por pulsos ou episódios (Baril *et al.*, 1993, Binkley, 1995, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008 e Bartlewski *et al.*, 2011). Cada pulso corresponde à elevação dos níveis circulantes desta hormona, por um breve período de tempo, seguido do seu declínio até níveis basais, que se mantêm até ao pulso seguinte (Baril *et al.*, 1993, Binkley, 1995 e Simonetti, 2008). Cada pulso de LH é precedido de um pulso de GnRH (Baril *et al.*, 1993). A frequência e a amplitude dos pulsos de LH variam ao longo do ciclo éstrico (Figura 4) (Simonetti, 2008). Por seu turno, a secreção da FSH segue um padrão de “ondas” coincidente com as ondas foliculares – padrão mais contínuo do que pulsátil (Bister e Paquay, 1983, Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004 e Forcada, 2010) (Figura 5). O padrão predominante é de 3-4 ondas foliculares, que emergem por volta dos dias 0, 6 e 11 (Salamonsen *et al.*, 1973, Viñoles *et al.*, 2000, Forcada, 2010) ou dos dias 0, 5, 9, 12 do ciclo éstrico (Bartlewski *et al.*, 2011). Nas ovelhas que apresentam 3 ondas foliculares, as duas primeiras terminam em atresia folicular e a última dará

lugar ao folículo dominante (Forcada, 2010). Em algumas raças podem ser observadas 2-5 ondas foliculares (Forcada, 2010).

Ao longo do ciclo éstrico a  $P_4$  parece regular a frequência dos pulsos de FSH através de dois mecanismos: 1) a GnRH estimula a libertação hipofisária de FSH e de LH, mas como a pulsatilidade da secreção de GnRH permanece baixa a libertação de FSH é favorecida relativamente à secreção de LH e 2) os níveis plasmáticos de  $P_4$  determinam a metabolização das moléculas de FSH em circulação (Bartlewski *et al.*, 2011).

O início de cada onda folicular é precedido de um aumento dos níveis plasmáticos de FSH (Baril *et al.*, 1993, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Posteriormente o decréscimo dos níveis de secreção de FSH é causado pelos elevados níveis de  $E_2$  segregados pelo folículo dominante de cada onda (retroacção negativa) (Goodman, 1988, Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010) e, sobretudo, pela secreção de inibina (glicoproteína produzida pelas células da granulosa) (Baird *et al.*, 1991, Morello e Chemineau, 2004 e Bartlewski *et al.*, 2011). Todavia, os níveis circulantes de  $E_2$  nunca chegam a alcançar valores tão elevados como os observados durante a fase folicular do ciclo (Morello e Chemineau, 2004 e Forcada, 2010). O principal pico de FSH é coincidente com o pico pré-ovulatório de LH (Salamonsen *et al.*, 1973 e Bartlewski *et al.*, 2011). O segundo pico de menor amplitude surge cerca de 18 a 24 horas (Salamonsen *et al.*, 1973) ou 20-36 horas depois (Bartlewski *et al.*, 2011). Este segundo pico é marcado por uma menor amplitude da secreção de FSH. Pelo contrário, a sua duração (20-24 horas) é superior à do pico pré-ovulatório de LH (11-12 horas) (Bartlewski *et al.*, 2011). Ao que tudo indica, a FSH controla fundamentalmente o crescimento inicial dos folículos antrais (Bartlewski *et al.*, 1999). O desenvolvimento folicular posterior é independente das flutuações na secreção de FSH (Bartlewski *et al.*, 1999). Por outro lado, o facto de mais do que um folículo poder atingir o estado ovulatório nas diferentes ondas foliculares e dos folículos de duas ondas consecutivas ovularem simultaneamente indicia que os efeitos do folículo dominante é fraco ou inexistente nos ovinos (Bartlewski *et al.*, 2011).

As variações na secreção de  $E_2$  são um reflexo das ondas foliculares (Bartlewski *et al.*, 2011), já que são segregados pelas células da granulosa dos folículos ováricos em desenvolvimento (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004 Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). Durante o ciclo éstrico, as ovelhas produzem 3-4 picos de  $E_2$  coincidentes com o desenvolvimento do folículo dominante (Souza *et al.*, 1998, Bartlewski *et al.*, 1999, Bister *et al.*, 1999, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). O primeiro pico de  $E_2$  ocorre cerca de 24 horas após a luteólise e é necessário ao aumento da frequência da secreção pulsátil de LH

(Bartlewski *et al.*, 2011). O aumento progressivo da secreção de E<sub>2</sub> é necessário à formação de receptores de LH nos folículos pré-ovulatórios (Bartlewski *et al.*, 2011). O pico pré-ovulatório de LH é precedido de um pico de E<sub>2</sub> – retroacção positiva (Baril *et al.*, 1993). Nas fêmeas, a alternância dos mecanismos de retroacção negativa e positiva exercidos pelos E<sub>2</sub> sobre o eixo hipotálamo-hipofisário é um fenómeno essencial no controlo da actividade gonadotrópica (Baril *et al.*, 1993).

#### 1.2.1.2 – OVULAÇÃO

O pico pré-ovulatório de GnRH e subsequentemente os de FSH e de LH ocorrem cerca de 14 horas antes da ovulação (Bartlewski *et al.*, 2011). Na fase final do ciclo éstrico, o pico pré-ovulatório de LH é determinado e mantido pelo decréscimo da secreção de P<sub>4</sub> e pelo aumento da secreção de E<sub>2</sub> (Bartlewski *et al.*, 2011). Nas ovelhas, o ritmo pulsátil de secreção de LH prevalece em todas as fases do ciclo éstrico (Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). O pico pré-ovulatório de LH resulta da elevação da frequência e da amplitude dos pulsos de secreção desta hormona (Bartlewski *et al.*, 2011).

Após o pico-pré-ovulatório de LH iniciam-se os processos que darão lugar à ovulação (Morello e Chemineau, 2004 e Forcada, 2010). O oócito II (maduro) segrega um factor que permite a expansão das células do cúmulo e que precede a ovulação propriamente dita (Forcada, 2010). Por outro lado, as células da granulosa começam a sofrer alterações funcionais que dão lugar à produção de substâncias pró-inflamatórias e a uma redução da sua capacidade de secreção de E<sub>2</sub> (Forcada, 2010). Seu efeito eleva a expressão das enzimas que participam activamente na ruptura folicular da membrana do ovócito, ou seja, a ovulação (Forcada, 2010). Entre elas estão enzimas capazes de degradar o colagénio, a elastina, os proteoglicanos, entre outras (Forcada, 2010). Por seu turno, imediatamente após o pico pré-ovulatório de LH, as células da teca começam a produzir P<sub>4</sub> (Forcada, 2010). A P<sub>4</sub> induz as células da teca a sintetizar colagenase, enzima cuja acção é essencial à ocorrência do processo físico da ovulação (Forcada, 2010). Outras enzimas, com origem nas células da granulosa, são as gelatinases (Forcada, 2010). Elas participam igualmente na degradação da membrana basal do folículo e que separa as células da granulosa das da teca interna (Forcada, 2010). Mais, o pico pré-ovulatório de LH origina um aumento significativo do fluxo sanguíneo ao ovário e ao folículo dominante, aumentando a pressão folicular e os níveis foliculares de PGF<sub>2α</sub> que aumentam as contracções da musculatura lisa do ovário (Forcada, 2010).

#### 1.2.1.3 – PÓS-OVULAÇÃO

Se a ovulação é um processo de destruição tecidual e está relacionada com eventos inflamatórios, a luteinização, que se inicia imediatamente depois da ovulação, é um processo de reparação em que a fibronectina e o colagénio desempenham um papel crucial (Forcada, 2010). O CL ou corpo amarelo desenvolve-se a partir do folículo ovulatório, num processo denominado de “luteinização” (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). A LH é fundamental ao início do crescimento lúteo e da diferenciação celular (Bartlewski *et al.*, 2011). As estruturas e as células foliculares sofrem grandes alterações estruturais (aumento de tamanho e de vascularização) e funcionais (Morello e Chemineau, 2004, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Nos ruminantes o CL só se torna funcional (com receptores de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) 1-2 dias depois da ovulação (Moraes *et al.*, 2003 e Sousa *et al.*, 2012).

#### 1.2.1.3.1 – Luteinização

O CL é constituído por 4 grandes tipos de células: pequenas células lúteas, grandes células lúteas, fibroblastos e células capilares endoteliais (Bartlewski *et al.*, 2011). As células foliculares da teca passam a formar as pequenas células lúteas (reduzida secreção de  $\text{P}_4$ , mas sensíveis à LH) e as células da granulosa transformam-se em grandes células lúteas (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004 e Forcada, 2010). As grandes células lúteas são responsáveis pela secreção de grandes quantidades de  $\text{P}_4$  e são insensíveis à LH (Morello e Chemineau, 2004). O aumento da vascularização ocorre a partir dos vasos da teca (Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). Este processo está relacionado com a maior capacidade esteroidogénica do CL (secreção de androgénios e de  $\text{E}_2$ ) a partir do colesterol extracelular presente nas lipoproteínas circulantes (Forcada, 2010). O principal produto da secreção do CL é a  $\text{P}_4$  (Baril *et al.*, 1993, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Esta hormona actua, fundamentalmente sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-gónadas e o tracto genital feminino, sendo responsável pelo estabelecimento e manutenção da gestação (Alila e Dowd, 2001). Durante o ciclo éstrico, o CL mantém elevados os níveis circulantes de  $\text{P}_4$  por aproximadamente 13-14 dias (Simonetti, 2008) ou 12-15 dias (Bartlewski *et al.*, 2011). A atrofia do CL é abrupta e dura 2-3 dias (Bartlewski *et al.*, 2011).

A manutenção e a regressão do CL dependem respectivamente de mecanismos luteotrópicos e luteolíticos (Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). A acção luteotrópica é exercida pela LH e pela prolactina (PRL) (Baril *et al.*, 1993, Simonetti, 2008 e Forcada, 2010). O número de receptores destas hormonas presentes nas células lúteas aumenta progressivamente até

metade da fase lútea (Forcada, 2010). Existem outros factores luteotrópicos: a melatonina e a P<sub>4</sub> (Lau *et al.*, 1993 e Forcada, 2010). Os efeitos da P<sub>4</sub> são autócrinos (Forcada, 2010). Durante a fase lútea, os níveis plasmáticos de P<sub>4</sub> aumentam progressivamente até alcançarem valores de 1-5 ng/ml, no intervalo de 6-7 dias (Forcada, 2010). No período de domínio da P<sub>4</sub> ocorrem várias ondas de crescimento folicular (Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011).

Durante a fase lútea os elevados níveis circulantes de P<sub>4</sub> induzem a redução da frequência da secreção pulsátil de GnRH e consequentemente dos níveis circulantes de LH (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010). Este efeito é potencializado pelos reduzidos níveis circulantes de E<sub>2</sub> (secretado pelos folículos em crescimento) que através de um mecanismo de retroacção negativa inibem a resposta da adeno-hipófise à acção da GnRH (Forcada, 2010). Deste modo, durante a fase lútea a frequência dos pulsos de LH é reduzida (1 pulso/3-4 horas) (Pérez-Clariget e Porras, 2008), mas a amplitude da sua secreção é elevada o que impede o desenvolvimento folicular final e consequentemente a ovulação (Goodman e Karsch, 1980, Karsch, 1984, Bettencourt, 1999 e Forcada, 2010). Na verdade os níveis plasmáticos de GnRH/LH mantêm-se basais (Forcada, 2010).

Na estação reprodutiva durante a fase lútea, a P<sub>4</sub> possui um efeito inibidor sobre a secreção de GnRH/LH superior ao dos E<sub>2</sub> (Morello e Chemineau, 2004 e Forcada, 2010). Adicionalmente, os elevados níveis circulantes de P<sub>4</sub> reduzem o número de receptores de GnRH nas células da adeno-hipófise (Forcada, 2010). É importante salientar que os neurónios hipotalâmicos secretores de GnRH não possuem receptores de P<sub>4</sub> (Forcada, 2010). A maioria deles pode ser encontrada na área pré-óptica e no hipotálamo médio-basal (Forcada, 2010). Portanto, a P<sub>4</sub> não inibe directamente a secreção de GnRH/LH (Forcada, 2010). Fá-lo, de forma indirecta através de outros sistemas neuronais que contactam com os neurónios secretores de GnRH (Forcada, 2010). Entre outros, há que destacar os sistemas mediados pelos opióides endógenos, em particular, e pelas catecolaminas (Forcada, 2010).

Nos primeiros dois terços da fase lútea a secreção contínua de P<sub>4</sub> induz o endométrio a elevar o armazenamento de fosfolípidos e a actividade enzimática necessária à conversão do ácido araquidónico em PGF<sub>2α</sub> (Forcada, 2010). Nesta fase a P<sub>4</sub> também bloqueia a formação de receptores endométricos de E<sub>2</sub> e de oxitocina (Lau *et al.*, 1993, McCracken *et al.*, 1999 e Forcada, 2010). No último terço da fase lútea a secreção contínua de P<sub>4</sub> acaba por promover uma redução catalítica do número dos seus próprios receptores endométricos de que resulta o desbloqueio da formação de receptores endométricos de oxitocina essenciais à ocorrência da luteólise (McCracken *et al.*, 1999 e Forcada, 2010). Na verdade, a redução da acção da P<sub>4</sub> permite o regresso à acção dos E<sub>2</sub>, tanto a nível do hipotálamo (central) como do útero

(periférica) (Baril *et al.*, 1993 e McCracken *et al.*, 1999). Estes são produzidos pelos folículos recrutados para o próximo ciclo ovárico e estimulam a síntese de receptores endométricos de oxitocina (Lau *et al.*, 1993, Simonetti, 2008 e Bartlewski *et al.*, 2011) e a produção de enzimas envolvidas na síntese de PGF<sub>2α</sub> (Baril *et al.*, 1993 e Silvia *et al.*, 1993).

#### 1.2.1.3.2 – Luteólise

Se a fêmea não fica gestante a fase lútea termina com a lise (destruição) do CL (Baril *et al.*, 1993, McCracken *et al.*, 1999, Forcada, 2010 e Valentim *et al.*, 2016a). A PGF<sub>2α</sub> segregada pelo endométrio é a hormona luteolítica (Bettencourt, 1999, McCracken *et al.*, 1999, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). No final da fase lútea, o CL segrega oxitocina que promove, a nível do endométrio, a libertação pulsátil de PGF<sub>2α</sub> (McCracken *et al.*, 1999, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Na mesma altura, os E<sub>2</sub> ováricos elevam a secreção de PGF<sub>2α</sub> e promovem a formação de receptores endométricos de oxitocina (Bartlewski *et al.*, 2011). Este efeito é ampliado pela exposição prévia à P<sub>4</sub> (Bartlewski *et al.*, 2011). São necessários cerca de 5 pulsos de PGF<sub>2α</sub> para que ocorra a luteólise (Forcada, 2010). Todos os pulsos de PGF<sub>2α</sub> são procedidos de um pulso de oxitocina, ainda que apenas metade dos pulsos de oxitocina resulte em um pulso de PGF<sub>2α</sub> (Forcada, 2010). Na realidade, há que dar tempo à recuperação das reservas de fosfolípidos necessárias à síntese de PGF<sub>2α</sub> (Forcada, 2010). A acção luteolítica da PGF<sub>2α</sub> endométrica produz-se entre o 12º-14º dia (Simonetti, 2008), 12º-15º dia (Bartlewski *et al.*, 2011), 13º dia (Silvia *et al.*, 1993), 13-14º dia (Baril *et al.*, 1993) ou 15º-16º dia (Baril *et al.*, 1993) do ciclo éstrico.

A PGF<sub>2α</sub> endométrica alcança o CL através da artéria ovárica, um ramo da artéria uterina, por anastomose com a veia uterina (Figura 6) (Baril *et al.*, 1993, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011) e vasos linfáticos (Bartlewski *et al.*, 2011). Os mecanismos concretos da luteólise permanecem pouco conhecidos (Forcada, 2010). Sabe-se, que a PGF<sub>2α</sub> reduz significativamente o fluxo sanguíneo ao CL, fundamentalmente através da degeneração dos capilares lúteos e não tanto pela vasoconstrição dos mesmos, o que compromete a viabilidade das células lúteas (Forcada, 2010). Por outro lado, a PGF<sub>2α</sub> liga-se a receptores membranares das grandes células lúteas causando tanto uma redução acentuada da síntese de P<sub>4</sub> (que inibe o transporte intracelular de colesterol) com um aumento na entrada de cálcio nas mesmas (que promove a apoptose ou morte celular) (Forcada, 2010).

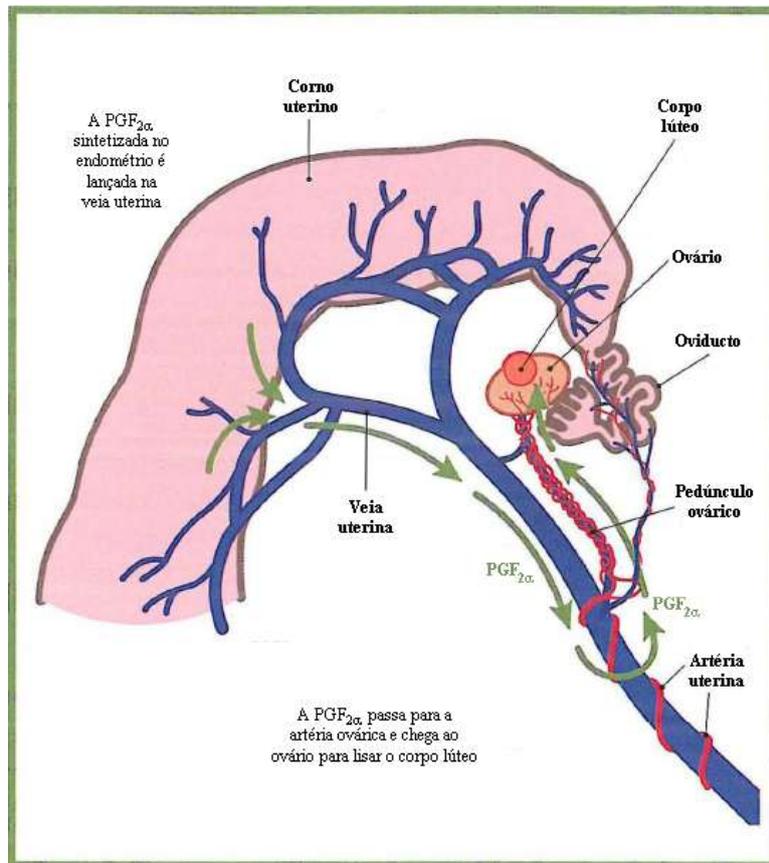


Figura 6 – Via de transporte da  $PGF_{2\alpha}$  do endométrio uterino até ao ovário onde induz a lise do corpo lúteo (Forcada, 2010).

#### 1.2.1.3.3 – Início de Novo Ciclo Éstrico

Terminada a luteólise, que marca o fim da fase lútea e o início de uma nova fase folicular (Forcada, 2010), produz-se uma queda abrupta dos níveis de  $P_4$  (término da inibição da acção da GnRH) (Karsch, 1984, Goodman e Karsch, 1990, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Por outro lado, os níveis circulantes de  $E_2$  são incapazes de prevenir um aumento da frequência de secreção pulsátil de GnRH e de LH (que chega a 1 pulso/hora) (Karsch, 1984, Goodman e Karsch, 1990, Baril *et al.*, 1993 e Forcada, 2010). Consequentemente, os níveis plasmáticos de LH aumentam progressivamente (Karsch, 1984, Goodman e Karsch, 1990, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011) e promovem a maturação final dos folículos em crescimento (Baril *et al.*, 1993, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). O crescimento folicular está associado a um aumento significativo dos níveis circulantes de  $E_2$  que determinam as manifestações de cio que precedem o pico pré-ovulatório de LH e à subsequente ovulação (Baril *et al.*, 1993, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Forcada, 2010).

## 2 – CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA

Nos pequenos ruminantes a IA deve ser aplicada após o controlo reprodutivo de um grupo de fêmeas (Palacios, 2010). Nestes animais não faz qualquer sentido prático e económico inseminar as fêmeas à medida que apresentam cio. O controlo da actividade reprodutiva de um grupo de fêmeas permite organizar o manejo de toda a exploração, reduzir os períodos improdutivo, programar a época de parição, ajustar a produção ao ciclos sazonais de procura de produtos de origem animal, criar lotes uniformes de animais para venda e aumentar a produtividade (Steyn, 2003, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Palacios, 2010, Abecia *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2015a).

O controlo da actividade reprodutiva pode ser feito sincronizando ou induzindo a actividade ovárica (Dendena, 2017). Normalmente, a sincronização refere-se à concentração de número de fêmeas em estro num intervalo de tempo restrito (24-72 horas) durante a estação reprodutiva (Steyn, 2003 e Dendena, 2017). Fora da estação reprodutiva, quando as fêmeas estão em anestro sazonal há necessidade de se induzir o estro (Fonseca, 2005 e Dendena, 2017).

Não existe um protocolo ideal de controlo da actividade reprodutiva (Azevedo *et al.*, 2006). Nas últimas décadas foram desenvolvidos múltiplos protocolos (González-Bulnes *et al.*, 2010, Abecia *et al.*, 2011 e Dendena, 2017). Existem protocolos naturais, hormonais e mistos (Azevedo *et al.*, 2006, Forcada *et al.*, 2011, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a,b). O melhor protocolo é aquele que produzir melhores taxas reprodutivas. Contudo, a resposta das fêmeas aos tratamentos é muito variável e depende de factores genéticos (espécie, raça, indivíduo), individuais (idade, estado fisiológico, estado nutricional, estado de saúde), ambientais (fotoperíodo, alimentação, condições climáticas), sociais e de manejo, do protocolo (*timing*, hormonas e doses) aplicado e do sistema de beneficiação adoptado (monta natural ou IA) (Azevedo *et al.*, 2006, López-Sebastian *et al.*, 2007, Bartlewski *et al.*, 2008, González-Bulnes *et al.*, 2010 e Bukar *et al.*, 2012). Esta variabilidade é particularmente marcada durante a estação de anestro (Bartlewski *et al.*, 2008), altura em que o hipotálamo é muito sensível à retroacção negativa exercida pelos E<sub>2</sub> (Kaya *et al.*, 2013).

De seguida são referidos os efeitos das hormonas usados no presente trabalho: melatonina, progestagénios e gonadotropina coriónica.

## 2.1 – MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida pela glândula pineal e é responsável pela mediação dos efeitos do fotoperíodo sobre o organismo (Correia, 1996, Valentim, 2004, Rocha *et al.*, 2011 e Rocha *et al.*, 2014). É produzida segundo um ritmo endógeno diário, definido pelos núcleos supraquiasmáticos, sincronizado pelo fotoperíodo diário e suprimido pela acção da luz (Figura 7) (Valentim, 2016 e Rocha *et al.*, 2014). Na verdade, esta hormona é produzida apenas durante a noite (Rosa e Bryant, 2003 e Valentim, 2004).

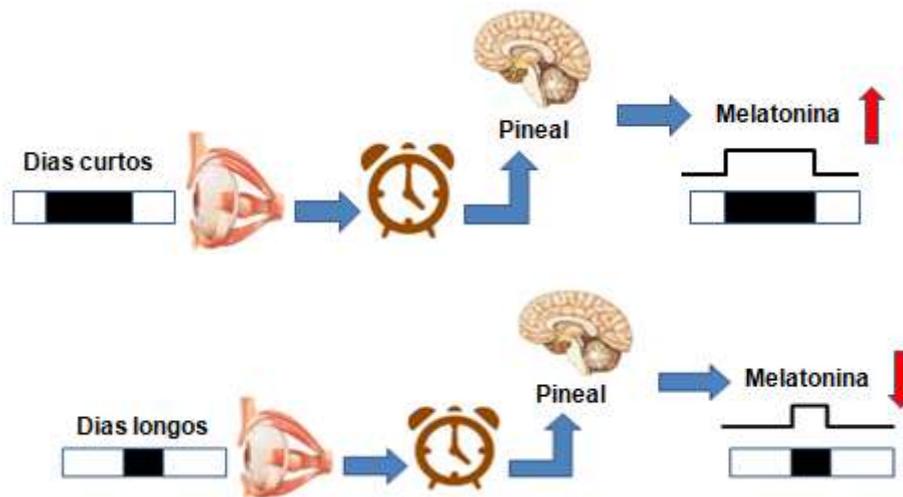


Figura 7. Efeito do fotoperíodo sobre a secreção de melatonina (adaptado de Goldman, 1999).

A melatonina actua a vários níveis do eixo reprodutivo (Valentim, 2004, Abecia *et al.*, 2012, Mohart *et al.*, 2014, Romano, 2016, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015b). Contudo, sua acção principal exerce-se ao nível do sistema nervoso central e relaciona-se com a modificação da frequência de libertação de GnRH/LH e da actividade das gónadas (Valentim, 2004, Valentim *et al.*, 2006, Abecia *et al.*, 2012, Omontese *et al.*, 2012, Mohart *et al.*, 2014, Romano, 2016, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015b). A acção hipotalâmica é mediada por dois mecanismos complementares: modulação directa da secreção de GnRH (esteróide-independente) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos esteróides gonadais (esteróide-dependente) (Valentim 2004, Valentim *et al.*, 2006, Forcada, 2010 e Afonso, 2015).

A forma mais comum de administrar melatonina é através da colocação de implantes subcutâneos (2 x 4 mm) contendo 18 mg de melatonina (Chemineau *et al.*, 2008, Mateus, 2014,

Mohart *et al.*, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015b), colocados na base das orelhas, e que libertam lentamente para a corrente sanguínea 100-300 pg/ml de melatonina (Omontese *et al.*, 2012, Mohart *et al.*, 2014, Romano, 2016 e Valentim *et al.*, 2015b). O núcleo dos implantes é biodegradável e é recoberto por uma fina camada de polímeros que permite uma difusão limitada da melatonina a aproximadamente 250 ug/dia (Williams *et al.*, 1993). Estes mantêm-se funcionais por um período de 60-70 dias (Romano, 1996, Omontese *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2015b), podendo mesmo alcançar os 100 dias (Omontese *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2015b).

Nos pequenos ruminantes, a melatonina exógena pode ser usada na indução da actividade reprodutiva (Valentim *et al.*, 2006, Rocha *et al.*, 2011, Abecia *et al.*, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015b e Dendena, 2017), embora, *per se*, não garante uma sincronização precisa e concentrada dosaios (Valentim *et al.*, 2015b). Contudo, este procedimento pode não fazer sentido em grandes efectivos, tanto do ponto de vista económico como de manejo (Valentim *et al.*, 2015b).

## 2.2 – TRATAMENTOS PROGESTAGÉNIOS

Os progestagénios são análogos sintéticos da P<sub>4</sub>, com efeitos biológicos superiores ao da molécula natural, pelo que são administrados em doses mais reduzidas (Romano, 1996 e Azevedo *et al.*, 2006). Mimetizam os efeitos naturais da P<sub>4</sub> produzida pelo CL (corpo lúteo), inibindo a secreção de GnRH/LH, as manifestações de cio e a ovulação e prolongando a fase lútea (Leyva *et al.*, 1998, Azevedo *et al.*, 2006, Simonetti *et al.*, 2008, Afonso, 2015 e Abecia *et al.*, 2012). A semivida dos progestagénios é reduzida (Figura 8) (Driancourt, 2012 e Afonso, 2015), pois estes são rapidamente metabolizados (Azevedo *et al.*, 2006 e Afonso, 2015) e eliminados pelas fezes e pela urina (Romano, 1996).

Os progestagénios mais utilizados são o acetato de fluorogesterona (FGA; 20 mg) e o acetato de medroxiprogesterona (MAP; 60 mg). São normalmente administrados via esponjas vaginais (Abecia *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Santos-Neto *et al.*, 2015 e Dendena, 2017). Nos primeiros dias pós-colocação das esponjas ( $\approx$  2 dias), a libertação de progestagénios é elevada, mas tende a diminuir com o tempo (Greyling *et al.*, 1994 e Driancourt, 2012). Nesses primeiros dias determinam a atresia dos folículos de grandes dimensões (Driancourt, 2012). Posteriormente inibem o crescimento e a maturação folicular (Driancourt, 2012).

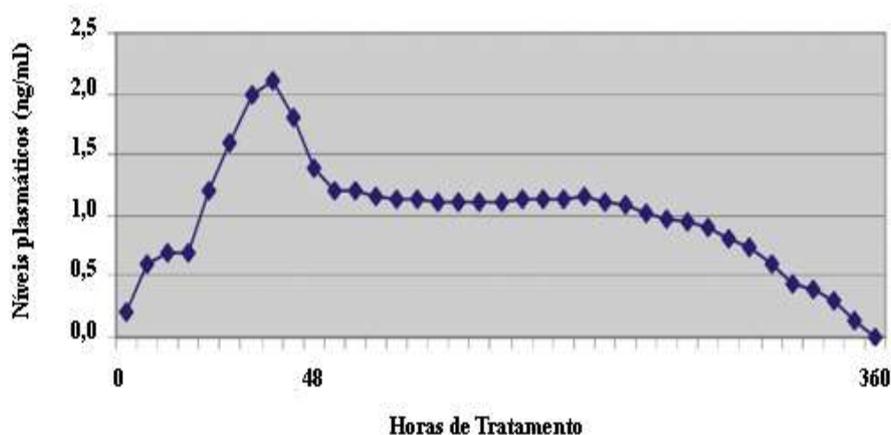


Figura 8. Variação temporal dos níveis plasmáticos médios de cronolona em ovelhas tratadas com Chronogest CR (Driancourt, 2012).

O FGA e o MAP são igualmente eficazes na inibição temporária do ciclo éstrico (Ungerfeld e Rubianes, 2002, Zeleke *et al.*, 2005, Abecia *et al.*, 2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015), embora o FGA tenha o dobro da eficiência do MAP (Romano, 1996) e 25 vezes mais do que a da P<sub>4</sub> (Robinson, 1965). Nos pequenos ruminantes o FGA tem uma semivida mais curta do que o MAP (Romano, 1996). De acordo com alguns autores, o FGA promove um regresso mais rápido à actividade ovárica cíclica e ao cio (maior precisão e concentração) do que o MAP, ainda que não altere a duração do cio (Romano, 1996). Contudo, Ungerfeld e Rubianes (2002), Zeleke *et al.* (2005), Mateus (2014) e Afonso (2015) não encontraram qualquer diferença significativa na resposta reprodutiva de ovelhas tratadas com FGA e com MAP.

### 2.2.1 – TRATAMENTO PROGESTANÉNICO CURTO

Com o objectivo de evitar os efeitos negativos dos tratamentos progestagénicos longos, aconselha-se a aplicação de um tratamento progestagénico curto – 5 dias (Jackson *et al.*, 2014), 5-6 (Knights *et al.*, 2011), 6 dias (Abecia *et al.*, 2012) ou 5-7 dias (Azevedo *et al.*, 2006, Vilariño *et al.*, 2013, Mateus, 2014 e Dendena, 2017) e 7 dias (Contreras-Villarreal *et al.*, 2016). O período de tratamento é inferior à semivida normal de um CL, o que determina a injeção de PGF<sub>2α</sub> ou seus análogos sintéticos (Azevedo *et al.*, 2006, Weems *et al.*, 2006, Martemucci e D’Alessandro, 2011 e Abecia *et al.*, 2012). Esta pode ser administrada quando da colocação do CIDR ou das esponjas vaginais ou quando da sua remoção (Correia *et al.*, 2010, Venâncio, 2012, Vilariño *et al.*, 2013, Jackson *et al.*, 2014, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). A maioria dos autores administra-a no início do tratamento progestagénico (Figura 9) (Venâncio, 2012, Mateus, 2014 e Dendena, 2017). Desta forma procura-se evitar os efeitos deletérios das

PGF<sub>2α</sub> ou seus análogos sobre o momento da ovulação (Correia *et al.*, 2010, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). As taxas de fertilidade conseguidas são muito elevadas, próximas ou de 100% (Dendena, 2017).

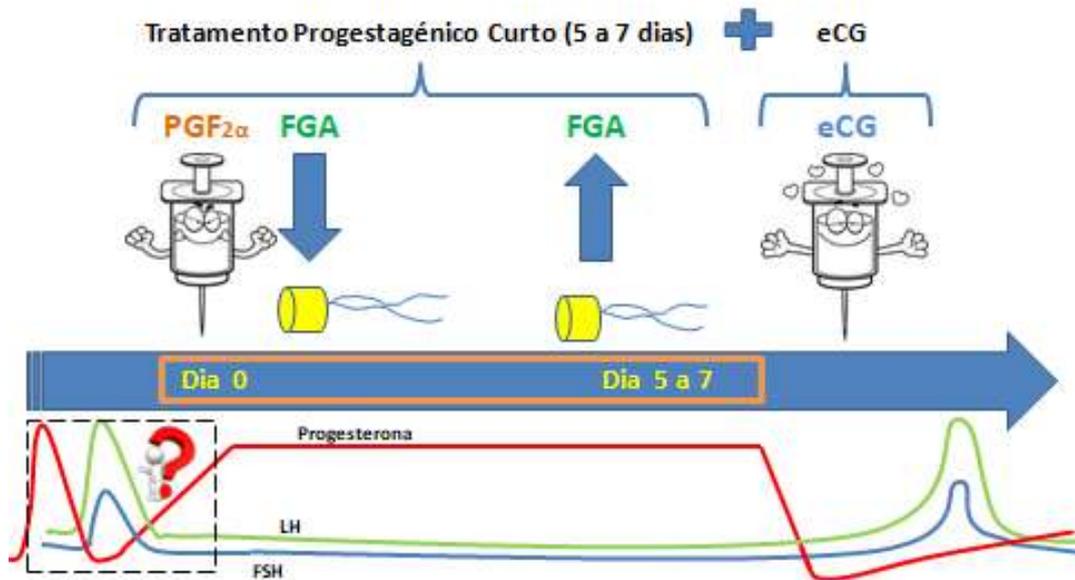


Figura 9. Efeitos de um tratamento progesteragénico curto associado à administração de Gonadotropina Coriónica equina (eCG).

### 2.3 – GONADOTROFINA CORIÓNICA EQUINA

Nos pequenos ruminantes, a ovulação depende do aumento da frequência de libertação de GnRH/LH (Forcada, 2010). Nestes animais, a administração de gonadotropinas exógenas pode promover a ovulação ou superovulações (Azevedo *et al.*, 2006, López-Sebastian *et al.*, 2007, Adams e Boime, 2008 e Shabankareh *et al.*, 2012). Na estação reprodutiva, as gonadotropinas exógenas mais utilizadas são a FSH, a eCG (Gonadotropina Coriónica equina) e a hCG (Gonadotropina Coriónica humana). Na estação de anestro são a FSH e a eCG. Estas também são muito usadas na promoção de superovulações (Azevedo *et al.*, 2006 e Shabankareh *et al.*, 2012).

A eCG é uma hormona produzida pelo trofoblasto dos fetos (equídeos) com 40-130 dias (Dendena, 2017). A eCG possui uma acção biológica dupla – FSH + LH (Azevedo *et al.*, 2006, Abecia *et al.*, 2012, Mohtar *et al.*, 2014 e Dendena, 2017). A acção FSH é mais prolongada e a LH menos marcada (Azevedo *et al.*, 2006). Estimula o recrutamento de pequenos folículos antrais, a sua taxa de crescimento, a produção de E<sub>2</sub>, a ovulação, a formação do CL e a secreção de P<sub>4</sub> (Mohtar *et al.*, 2014 e Dendena, 2017). Tem uma semivida ( $\leq 3$  dias) superior à da FSH

( $\approx$  10 horas) (Murphy e Martinuk, 1991, Dendena, 2017 e Fonseca *et al.*, 2017), devido à sua elevada concentração de ácido siálico, o que lhe confere uma menor precisão de sincronização ( $>$  72 horas) (Riesenberg *et al.*, 2001). Consequentemente tende a resultar em taxas de fertilidade mais baixas (Baril *et al.*, 1996 e Zamiri e Hosseini, 1998), particularmente quando as fêmeas são inseminadas artificialmente a tempo fixo pós-tratamento de controlo da actividade reprodutiva (Baril *et al.*, 1996). Este resultado não foi observado por Dendena (2017). Segundo Baril *et al.* (1993), a taxa de prolificidade é máxima entre as ovelhas que manifestam cio nas primeiras 30 horas pós-administração de eCG. A fim de aumentar a sua precisão podem-se utilizar preparados com substâncias anti-eCG, que deverão ser administrados cerca de 2 dias após a injeção da eCG (Azevedo *et al.*, 2006). Nas cabras, a resposta ovárica à eCG é menos variável do que à FSH (Lehloenya, 2013).

A eCG é normalmente administrada através de uma injeção única (Azevedo *et al.*, 2006 e Shabankareh *et al.*, 2012), devido à sua prolongada semivida (Shabankareh *et al.*, 2012). Esta deve ser injectada entre 48 horas antes e quando do término do tratamento de sincronização ou de indução da actividade ovárica (Azevedo *et al.*, 2006, Mohtar *et al.*, 2014 e Dendena, 2017). A dose a administrar, intramuscularmente ou na mucosa vulvar, depende da genética (espécie e raça), da idade, da estação do ano e da taxa de prolificidade pretendida (Leyva *et al.*, 1998 e Valentim *et al.*, 2015b). Nos ovinos, enquanto doses de 400-600 UI promovem a ovulação, doses próximas das 750 UI induzem superovulações (Abecia *et al.*, 2012). Boland *et al.* (1981) (citados por Abecia *et al.*, 2012) referem a utilização de doses de 250-750 UI, em função da idade – malatas: 250-300 UI e ovelhas adultas: 350-500 UI – e do estado fisiológico – estação reprodutiva: 400-500 UI e estação de anestro: 300-350 UI).

### **3 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

A IA é uma técnica reprodutiva que consiste na colocação, de modo artificial, de sémen no tracto genital feminino (Gordon, 1997, Aisen, 2004a, Robertson, 2005, Granados *et al.*, 2006, Morrell, 2011, Mateus *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Leão, 2017). É a Tecnologia de Reprodução Assistida (ART) mais antiga (Fonseca e Souza, 2011, Cortez, 2012, Abecia *et al.*, 2017 e Leão, 2017) utilizada em animais de produção (Morrell, 2011 e Abecia *et al.*, 2017) e que mais contribuiu para melhorar o progresso genético nos pequenos ruminantes (Abecia *et al.*, 2017).

Nos ovinos, as principais dificuldades da aplicação da IA estão associadas à anatomia do cérvix (número e forma das pregas cervicais) (Sayre e Lewis, 1996, Baril *et al.*, 1993, Salamon

e Maxwell, 2000, Aisen, 2004a,b, Morello e Chemineau, 2004, Anel *et al.*, 2005, Naqvi *et al.*, 2005, Leethongdee *et al.*, 2007, Domínguez *et al.*, 2008, El-Shahat e Alsafy, 2009, Cebrián *et al.*, 2010c, Dayan *et al.*, 2010, Fonseca *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011, Bromfield, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Banday *et al.*, 2017), à necessidade de proceder ao controlo da actividade reprodutiva (Baril *et al.*, 1993, Steyn, 2003, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Maia, 2010, Palacios, 2010, Valentim *et al.*, 2016b, Dendena, 2017 e Leão, 2017) e à produção e composição do sémen e das membranas dos espermatozóides, pouco resistentes ao choque térmico e à criopreservação (Baril *et al.*, 1993, Steyn, 2003, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2005, Naqvi *et al.*, 2005, O'Meara *et al.*, 2007, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a,b, Fonseca *et al.*, 2010, Konyali *et al.*, 2013, Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Banday *et al.*, 2017 e Snoeck *et al.*, 2017).

### 3.1 – CÉRVIX

#### 3.1.1 – TAMANHO E FORMA DO CÉRVIX

O cérvix constitui a primeira grande barreira à progressão dos espermatozóides no tracto genital feminino (Salamon e Maxwell, 2000 e Leethongdee *et al.*, 2007). Nas ovelhas, ele é tubular, longo, composto por tecido fibroso, predominantemente, tecido conjuntivo e algum tecido muscular (Figura 10) (Ferra e Sereno, 2006, Leethongdee *et al.*, 2007, Leethongdee *et al.*, 2010, Lima, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011). O seu lúmen é convoluto e tortuoso devido à presença de 2-5 (Salamon e Maxwell, 2000), 3-7 (Kershaw *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006, Lima, 2010 e Candappa e Bartlewski, 2011), 4-5 (Maia, 2010), 4-7 (Ferra e Sereno, 2006, El-Shahat e Alsafy, 2009, Perry *et al.*, 2010, Moura *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b), 4-8 (McKusick *et al.*, 1998) ou 6 pregas (ou anéis) cervicais (Leethongdee *et al.*, 2007 e Moura *et al.*, 2011), as quais possuem as extremidades voltadas para a região caudal, servindo como uma barreira física a contaminantes externos (Figura 10) (McKusick *et al.*, 1998, Ferra e Sereno, 2006, El-Shahat e Alsafy, 2009, Perry *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011).

O diâmetro do canal cervical é drasticamente estreito, particularmente nas duas pregas mais caudais (McKusick *et al.*, 1998, Ferra e Sereno, 2006, Leethongdee *et al.*, 2007 e Candappa e Bartlewski, 2011). O diâmetro interno de cada prega cervical é de sensivelmente 2,7 mm (1-3 mm) e não estão concentricamente alinhadas com os anéis adjacentes (McKusick *et al.*, 1998, Ferra e Sereno, 2006, Leethongdee *et al.*, 2007, Lima, 2010 e Candappa e Bartlewski, 2011) (Figura 11). A distância média entre pregas é de 3-8 cm (Candappa e

Bartlewski, 2011). O comprimento do cérvix da ovelha varia entre 4,0-7,0 cm (Lima, 2010) ou 5,7-10,0 cm (Ferra e Sereno, 2006, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011) e é influenciado pela raça, pela idade, pelo número de partos e pelo estado fisiológico (Ferra e Sereno, 2006, Lima, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011). Nas estações reprodutiva e de anestro, o comprimento do cérvix de malatas e de ovelhas varia significativamente (Kershaw *et al.*, 2005). Porém, estes autores não conseguiram estabelecer qualquer relação entre o comprimento do cérvix e a idade, a fase do ciclo reprodutivo ou o tipo de *Os* externo. Segundo Windsor (1995), o cérvix alonga-se no decurso do primeiro parto, o que facilita a penetração do canal cervical das fêmeas múltíparas.



Figura 10. Fotografia da cérvix de ovelha da raça Churra Galega Bragançana seccionada verticalmente evidenciando os anéis cervicais (cedida por Luiza Corrêa Oliveira, 2015).

No trabalho realizado por Naqvi *et al.* (2005), o comprimento médio do cérvix foi, respectivamente, de  $3,8 \pm 0,12$  cm, nas ovelhas adultas, e de  $5,3 \pm 0,15$  cm, nas malatas. O número médio de pregas em forma de funil foi de  $3,4 + 0,22$ , nas ovelhas adultas, e de  $3,2 + 0,19$ , nas malatas (Naqvi *et al.*, 2005). Nos ovinos, o volume interior do cérvix é inferior a 0,25 ml (Cseh *et al.*, 2012) ou oscila entre 0,1-0,3 ml (Anel *et al.*, 2006). Nas ovelhas, a segunda e a terceira pregas estão frequentemente desalinhadas relativamente à primeira prega (Naqvi *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006, Ferra e Sereno, 2006, Perry *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011, Moura *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b). As pregas cervicais apresentam um formato de funil assimétrico (Anel *et al.*, 2006, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et*

*al.*, 2011), com um fundo de saco em todos os anéis (Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011), resultando numa elevada dificuldade em ultrapassá-las (Anel *et al.*, 2006, Ferra e Sereno, 2006, Candappa e Bartlewski, 2011, Moura *et al.*, 2011 e Masoudi *et al.*, 2017).

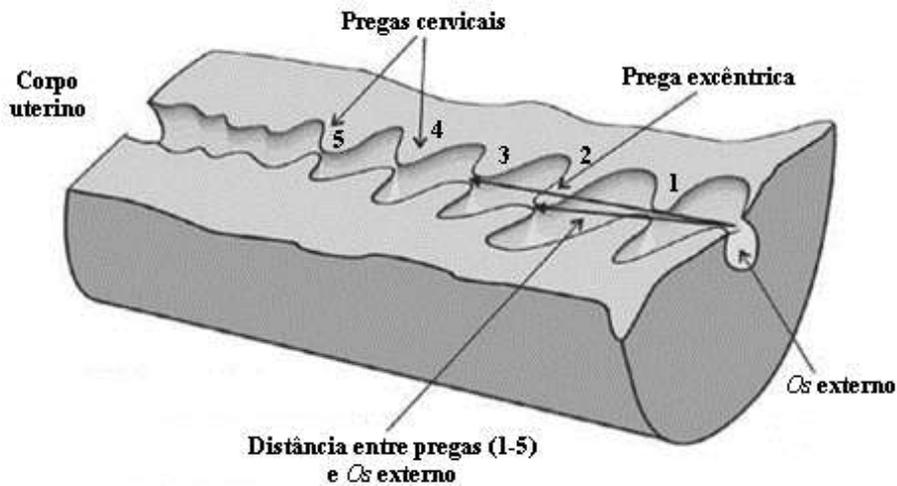


Figura 11. Estrutura interna do cérvix da ovelha (secção longitudinal) (Clifford, 2017).

### 3.1.2 – Os EXTERNO

Os cervical externo está localizado na parte ventral da vagina e o seu lúmen é fechado por proeminências e depressões recíprocas da túnica mucosa (Moura *et al.*, 2011). A morfologia de Os externo varia de fêmea para fêmea (Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011). Este projecta-se para dentro da porção cranial da vagina e é recoberto por uma ou mais pregas de tecido fibroso (Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011). Nos ovinos, Halbert *et al.* (1990) identificaram 4 tipos morfológicos de Os externo: bico de pato (duas pregas opostas), aba (uma prega), rosa (conjunto de pregas) papila (tecido em formato de espiral). Posteriormente, Kershaw *et al.* (2005) descrevem 5 tipos de Os externo: bico de pato (duas pregas opostas), aba (uma prega), rosa (conjunto de pregas), papila (tecido em formato de espiral) e fenda (neste tipo não há protusão da cérvix em direcção a vagina anterior – forma de fenda) (Figura 12).

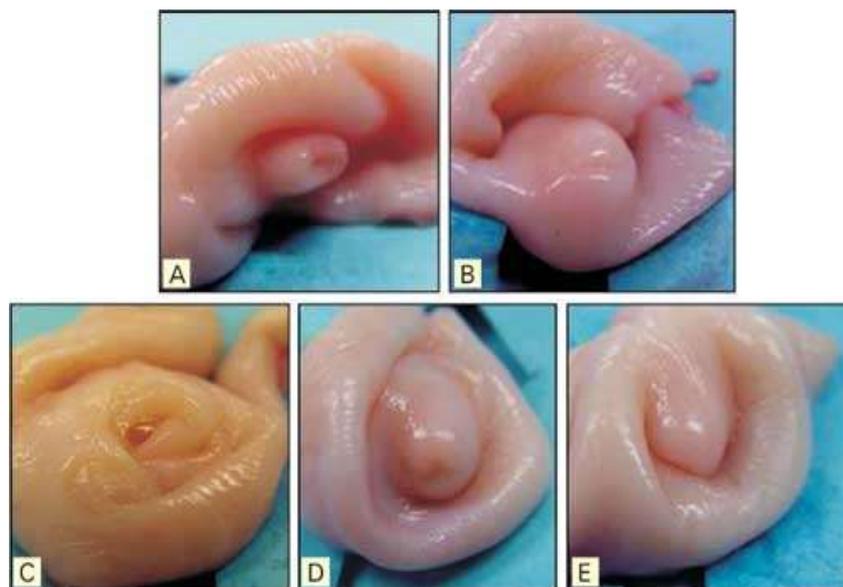


Figura 12. Classificação da aparência da entrada no os cervical externo da ovelha (Kershaw *et al.*, 2005). *Legenda: A – bico de pato, B – aba, C – Rosa, D – papila e E – Fenda.*

De acordo com Kershaw *et al.* (2005), Os cervical externo mais comum nas ovelhas múltíparas e mais velhas é o Rosa. O tipo Espiral (não representado na Figura 12) é mais comum em ovelhas nulíparas (Kershaw *et al.*, 2005). Estes autores admitem que o tipo de Os externo possa modificar-se com o parto, aumentando de tamanho e de complexidade. Esta alteração anatómica pode ser consequência do prolapso do primeiro anel cervical caudal (Kershaw *et al.*, 2005). Os tipos de Os mais apertados, como a Papila, tornam-se mais difíceis de ultrapassar, mas distendem-se mais durante o parto e consequentemente modificada a sua conformação durante o processo de cicatrização (Kershaw *et al.*, 2005).

A fase do ciclo éstrico afecta a penetrabilidade da cérvix, sendo o seu grau de maior relaxamento durante a fase de estro (Sayre e Lewis, 1996, McKusick *et al.*, 1998, Kershaw *et al.*, 2005, El-Shahat e Alsafy, 2009, Maia, 2010 e Leão, 2017). O ciclo natural de relaxamento do cérvix atinge os seus valores máximos 72 horas após a remoção das esponjas vaginais (Ferra e Sereno, 2006 e Leethongdee *et al.*, 2007), ou seja, demasiado tarde para a realização da IA (Leethongdee *et al.*, 2007). Este relaxamento resulta de eventos peri-ovulatórios que envolvem as hormonas P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> e oxitocina (Leethongdee *et al.*, 2007). Por outro lado, ao longo do ciclo éstrico, a secreção de ácido hialurónico varia e é máxima quando do pico pré-ovulatório de LH (Perry *et al.*, 2012). Este ácido determina um certo relaxamento do cérvix, que promover o transporte dos espermatozóides através do canal cervical (Perry *et al.*, 2012). Todavia, é insuficiente para facilitar significativamente a IA (Perry *et al.*, 2012). A oxitocina também induz

a dilatação cervical e a tetania do miométrio sem perturbar o transporte do sémen até ao local da fecundação (Sayre e Lewis, 1996).

### 3.2 – REPRODUTORES A UTILIZAR NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Num programa de IA devem ser utilizados animais saudáveis e sem problemas reprodutivos (Baril *et al.*, 1993, Maia, 2010, Palacios, 2010 e Valentim *et al.*, 2016b). É importante que o lote de ovelhas a inseminar tenha um tamanho adequado (60-120 fêmeas) e que seja o mais homogéneo possível: mesmo estado fisiológico e reprodutivo, boa condição corporal e bem alimentado (elevado nível energético) (Ferra e Sereno, 2006, Palacios, 2010, Valentim *et al.*, 2016b e Leão, 2017). Segundo O'Brein (2002), Scaramuzzi e Martin (2008) e Karikari e Blasu (2009) a CC ideal, no momento da inseminação, deve oscilar entre os 2,5-3,5 pontos. Palacios (2010) e Valentim *et al.* (2016b) referem valores de 3,0-4,0 pontos. Não é recomendável a utilização de ovelhas núlparas e de ovelhas que não tenham ficado gestantes na estação reprodutiva anterior (Palacios, 2010, Valentim *et al.*, 2016b e Mateus *et al.*, 2016). Por outro lado, não devem ser utilizadas ovelhas paridas há menos de 25-35 dias (Mateus *et al.*, 2016). Na verdade, as melhores taxas de fertilidade ocorrem em ovelhas múltíparas jovens (até 4-5 anos de idade) e que tenham parido cerca de 4-7 meses antes (Palacios, 2010 e Valentim *et al.*, 2016a). Segundo Forcada (2010), as ovelhas com idades superiores a 10 anos apresentam uma redução significativa das funções hipotalâmicas e hipofisárias. Anel *et al.* (2006) recomendam que não sejam utilizadas ovelhas com mais de 5 anos de idade.

Caso se decida inseminar cordeiras, estas devem ter um peso corporal de aproximadamente 65-70% do peso corporal das ovelhas adultas (Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2016b). Por outro lado, elas devem ser sujeitas a uma exploração ginecológica prévia e à ruptura do hímen 2-7 dias (Palacios, 2010) ou 15 dias (Simões e Baril, 2008) antes da colocação das esponjas vaginais (Simões e Baril, 2008, Palacios, 2010 e Mateus, 2014).

Depois da IA, as ovelhas não devem ser sujeitas a qualquer tipo de *stress* durante, pelo menos, 20 dias (Palacios, 2010). A aplicação de algumas técnicas de manejo, como mudanças de instalações e de dieta, vacinações e desparasitações, tosquiadas, corte de cascos, entre outras, causam importantes níveis de *stress* (Maia, 2010 e Palacios, 2010). De igual modo, alterações ambientais que causem *stress* térmico têm efeitos deletérios sobre a reprodução (Fonseca *et al.*, 2010, Maia, 2010, Salama *et al.*, 2014 e Silva *et al.*, 2016). O *stress* reduz a taxa de fertilidade aparente, pois interfere no mecanismo da fecundação e aumenta a taxa de mortalidade

embrionária (Gordon, 1997, Dobson e Smith, 2000, Fonseca *et al.*, 2010, Salama *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2016 e Leão, 2017).

A selecção dos carneiros dadores de sémen deve ser feita com uma antecedência mínima de 7-8 semanas antes do início das recolhas de sémen (Pérez-Clariget e Porras, 2008, Maia, 2010 e Leão *et al.*, 2016). Este período é necessário à realização de alterações de manejo, nomeadamente alimentar e sanitário, assim como ao treino dos carneiros para recolha de sémen através de VA (Maia, 2010 e Leão, 2016). Os carneiros devem ser sujeitos a um exame clínico para avaliação do seu estado geral (incluindo idade, temperamento, dentição, peso ou condição corporal, visão, articulações, cascos, tamanho do velo, entre outros parâmetros) (Maia, 2010 e Leão, 2016) e a um exame andrológico (Abecia, 2010 e Maia, 2010). É ainda crucial conhecer a história pregressa de cada macho, com a finalidade de identificar possíveis situações passadas que possam comprometer a produção de sémen. Não esquecer que, nos carneiros, a espermatogénese demoram, sensivelmente, 46-49 dias (Baril *et al.*, 1993 e Robinson *et al.*, 2006).

Os carneiros devem ser melhoradores e ter bons aprumos e cascos, um pénis normal, testículos simétricos, ovóides, firmes e localizados na cavidade escrotal, uma boa líbido (elevado interesse sexual, habilidade para a detecção do cio e agilidade para efetuar a monta e a cópula) e produzir sémen em quantidade e qualidade (Baril *et al.*, 1993 e Maia, 2010).

### 3.3 – SÉMEN DE CARNEIRO

O sémen é constituído por plasma seminal e por espermatozóides e a sua composição varia entre espécies, raça e indivíduos (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Gordon, 1997, Karagiannidis *et al.*, 2000, El-Alamy *et al.*, 2001, Valentim, 2004, Cebrián *et al.*, 2010a, Lima, 2010, Maia, 2010 e Leão, 2017). O plasma seminal é a mistura de fluidos produzidos nos testículos, nos epidídimos, nos canais deferentes e nas glândulas anexas ou acessórias (particularmente, na vesícula seminal) (Cebrián *et al.*, 2010a, Maia, 2010 e Leão, 2017). É um líquido opaco e claro e o sémen é cremoso, de cor branca, devido à elevada concentração espermática (Steyn, 2003, Cebrián *et al.*, 2010a, Lima, 2010 e Ramos *et al.*, 2012). É um meio isotónico ( $\approx 7,0$ ) e neutro, rico em numerosas substâncias (frutose, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido glutâmico, inositol, sódio, potássio, cálcio, fosfolípidos, prostaglandinas e proteínas) que nutrem e protegem os espermatozóides de alterações bruscas do pH (Lima, 2010, Maia, 2010 e Leão, 2017). Baril *et al.* (1993) e Lima (2010) referem que o pH do sémen de carneiro varia entre os 5,9-7,3.

A quantidade e a qualidade do sêmen variam em função de factores genéticos, individuais, ambientais, sociais e técnica e frequência de recolha dos ejaculados (Gordon, 1997, El-Alamy *et al.*, 2001, Johnson *et al.*, 2001, Kaya *et al.*, 2002, Morello e Chemineau, 2004, Valentim, 2004 e Maia, 2010). Nos carneiros, o ejaculado tem um volume que varia entre os 0,3-2,0 ml (média: 1,0 ml) (Steyn, 2003), 0,3-3,0 ml (média: 1,0 ml) (Mazariegos *et al.*, 2012), os 0,5-2,0 ml (Gonçalves *et al.*, 2001), os 0,8-1,2 ml (Pérez-Clariget e Porras, 2008), os 0,8-1,5 ml (média: 1 ml) (Cebrián *et al.*, 2010b), os 0,8-2,5 ml (média: 1,0 ml) (Maia, 2010), os 1,0-1,5 ml (Baril *et al.*, 1993) ou os 1,0-2,0 ml (Bicudo *et al.*, 2005 e Lima, 2010) e uma concentração espermática normalmente elevada (Baril *et al.*, 2003, Valentim, 2004 e Lima, 2010), que oscila entre os 0,7-6,0 biliões de espermatozóides/ml (Steyn, 2003), os 2,0-6,0 biliões de espermatozóides/ml (Bicudo *et al.*, 2005 e Lima, 2010), os 2,0-5,0 biliões de espermatozóides/ml (Gonçalves *et al.*, 2001), os 2,0-9,0 biliões de espermatozóides/ml (Maia, 2010), os 2,0-10,0 biliões de espermatozóides/ml (Baril *et al.*, 2003), os 3,0-5,0 milhões de espermatozóides/ml (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Mazariegos *et al.*, 2012) ou 3-7 biliões de espermatozóides/ml (Cebrián *et al.*, 2010b). Os carneiros da raça Churra Galega Bragançana produzem ejaculados com um volume médio de  $1,5 \pm 0,6$  ml e uma concentração média de  $4,7 \times 10^9 \pm 1,5 \times 10^9$  espermatozóides (Valentim, 2004). Nos animais saudáveis, a taxa de motilidade tende a ser elevada (70-80% ou mais de células espermáticas com movimento rectilíneo progressivo) (Valentim, 2004, Bicudo *et al.*, 2005 e Porras, 2008, Lima, 2010, Maia, 2010 e Mazariegos *et al.*, 2012). As características da cinética e da morfologia espermáticas são semelhantes às dos demais ruminantes (Bicudo *et al.*, 2005).

### **3.3.1 – RECOLHA DE SÊMEN**

O método de recolha de sêmen influencia a sua preservação (Aisen e Venturino, 2004, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012b e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016), pois condiciona as suas características quantitativas e qualitativas (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b). Nos ruminantes os métodos de recolha de sêmen mais usados são: a vagina artificial (VA) e a electroejaculação (Baril *et al.*, 1993, Steyn, 2003, Ferra e Sereno, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Maia, 2010, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Leão, 2017).

Nos ovinos, o método de recolha de sêmen mais comum baseia-se no uso de uma VA, deixando o carneiro montar uma ovelha em cio natural ou induzido ou um manequim (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Aisen e Venturino, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006,

Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Maia, 2010, Morrell, 2011, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016). É o método que oferece condições mais próximas das naturais (Sorensen Jr., 1979, Baril *et al.*, 1993, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Leão, 2017), pelo que produz melhores resultados (Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a). Adicionalmente, ela permite a recolha seguida de mais do que um ejaculado (caso o intervalo entre saltos seja reduzido) (Aisen e Venturino, 2004, Maia, 2010 e Leão, 2017).

A principal desvantagem da utilização da VA resulta dos machos terem de estar treinados e necessitarem de apresentar boas condições físicas (Gordon, 1997, Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Fonseca *et al.*, 2010, Maia, 2010, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Leão, 2017). Infelizmente, nem todos os machos são treináveis (os pequenos ruminantes são animais gregários que não gostam de estar sozinhos na presença do homem) ou conseguem estar sempre em boas condições físicas (Baril *et al.*, 1993 e Leão, 2017). Os malatos podem começar a ser treinados com 6-10 meses de idade (Cebrián *et al.*, 2010a). Os treinos devem ser retomados antes de começar uma nova época reprodutiva – 2-3 colheitas/dia (Gordon, 1997), nas 2-3 semanas precedentes (Gordon, 1997 e Maia, 2010). Se o macho permaneceu várias semanas sem ejacular, 24 horas antes da colheita do ejaculado, o macho deve ser levado a ejacular, com o objectivo de eliminar uma parte dos espermatozoides envelhecidos (Aisen e Venturino, 2004).

O tempo necessário para treinar um carneiro dador de sémen depende da habilidade e da paciência do operador (que de futuro será responsável pelas colheitas de sémen) e da idade, experiência sexual e temperamento do animal (Baril *et al.*, 1993, Steyn, 2003, Cebrián *et al.*, 2010a e Maia, 2010). Os carneiros têm de se adaptar ao local de recolha, à fêmea (sã e tranquila) e ao operador (Cebrián *et al.*, 2010a). Estes devem ser manipulados regularmente (Steyn, 2003). Os carneiros habituados à presença de pessoas são mais fáceis de treinar (Steyn, 2003 e Maia, 2010). Os malatos são geralmente mais tímidos do que os carneiros (Maia, 2010). Durante os treinos, os machos são muito sensíveis a distrações ou sustos causados por barulhos inesperados e desconhecidos, gritos do tratador, presença de estranhos, cães, etc. (Maia, 2010). Um susto ou medo, ocorrido durante o treino pode ter um efeito inibidor prolongado sobre o desempenho sexual dos machos (Maia, 2010). Depois de treinados, os machos dadores devem ser sujeitos a uma rotina de recolha de sémen (Steyn, 2003). Nessa altura, não importa se a fêmea esta em cio natural ou induzido (Cebrián *et al.*, 2010a). Apenas se necessita de um tronco para imobilizar o “manequim” (Cebrián *et al.*, 2010a).

Sorensen Jr. (1979) e Vazquez *et al.* (2014) consideram que as amostras de sémen recolhidas por electroejaculação são iguais, quantitativa e qualitativamente, as amostras recolhidas com VA. Contudo, alguns autores reportaram diferenças no volume e na composição do plasma seminal (Baril *et al.*, 1993, Ferra e Sereno, 2006, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012, Vázquez *et al.*, 2014 e Ledesma *et al.*, 2016).

### 3.3.1.1 – VAGINA ARTIFICIAL

A VA é constituída por uma bainha de borracha colocada dentro de um tubo pouco flexível, sobre o qual se dobram as pontas da bainha interior e que são presas com elásticos (Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004, Morrell, 2011 e Leão, 2017). Dessa forma, é criado um espaço que pode ser preenchido com água quente (50-55°C) (Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004 e Leão, 2017) ou ser aquecida numa estufa a 42-45°C (Baril *et al.*, 1993, Steyn, 2003, Dendena, 2017 e Leão, 2017) ou 42-46°C (Ferra e Sereno, 2006), dependendo da temperatura ambiente (Steyn, 2003 e Aisen e Venturino, 2004). Na altura da colheita, a temperatura da água deve ser de 37°C (Nunes, 2002, Ferra e Sereno, 2006 e Lucena, 2010) ou variar entre os 40-42°C e ser controlado com um termómetro (Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004 e Abecia e Forcada 2010). Se um macho introduzir o pénis na VA e não ejacular, a temperatura ou a pressão não é a correcta (Aisen e Venturino, 2004, Lucena, 2010 e Leão, 2017) (Figura 13).



Figura 13. Vaginas artificiais para pequenos ruminantes.

O tubo exterior da VA é dotado de uma válvula dupla (Leão, 2017). Quando se retiram as duas é possível encher o espaço entre a bainha interior e o tubo exterior com água (Steyn, 2003, Cebrián *et al.*, 2010a e Leão, 2017). A abertura apenas da segunda válvula permite, através de insuflação, aumentar a pressão no interior da VA (Steyn, 2003, Cebrián *et al.*, 2010a, Morrell, 2011 e Leão, 2017), dessa forma, pode ser feito o ajuste da mesma conforme a particularidade de cada macho (Nunes, 2002, Ferra e Sereno, 2006, Lucena, 2010 e Leão, 2017).

Numa das extremidades da VA coloca-se um cone de borracha (Steyn, 2003, Morrell, 2011 e Leão, 2017). Na outra extremidade do cone é inserido um tubo colector graduado (Steyn, 2003, Granados *et al* 2006, Lucena, 2010, Morrell, 2011 e Leão, 2017). O tubo colector deve estar envolto em material termo-isolante (Leão, 2017). Outra protecção termo-isolante deve recobrir desde o tubo colector recoberto até a própria VA (Granados *et al* 2006, Lucena, 2010 e Leão, 2017). Antes de usar a VA deve estar desinfectada (por exemplo, quaternário de amónio) (Gordon, 1997, Ferra e Sereno, 2006, Cebrián *et al.*, 2010a e Leão, 2017). A entrada livre da VA deve ser ligeiramente lubrificada (Gordon, 1997, Ferra e Sereno, 2006, Cebrián *et al.*, 2010a e Leão, 2017). Deve ser utilizada uma VA por animal (Cebrián *et al.*, 2010a). O prepúcio do carneiro deve ser previamente sujeito a tricotomia e higienizado para evitar a contaminação do ejaculado (Cebrián *et al.*, 2010a).

Os carneiros devem estar alojados em boxes individuais, de modo a evitar-se que eles montem uns nos outros (Cebrián *et al.*, 2010a). Nestes animais é possível recolher imediatamente dois ejaculados, de um mesmo macho, para o mesmo tubo colector (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Cebrián *et al.*, 2010a e Leão, 2017). Estes devem ser obtidos num intervalo de 2-3 minutos (Baril *et al.*, 1993 e Leão, 2017) ou de 10 minutos (Cebrián *et al.*, 2010a), dependendo da libido do carneiro (Leão, 2017). Se o carneiro demorar mais de 2-3 minutos, ele deve ser afastado da ovelha e mais tarde ser sujeito a nova colheita, mas para um outro tubo de ensaio (Baril *et al.*, 1993 e Leão, 2017). A frequência de recolha de amostras de sémen depende da idade, condição e temperamento do animal, embora, como regra geral, se possa indicar, no caso dos carneiros, de 3-5 recolhas diárias, seguidas de 2-3 dias de descanso (Aisen e Venturino, 2004 e Leão, 2017).

Recolhido o ejaculado este deve ser rapidamente transportado, a temperatura controlada e protegido da luz, de poeiras e de agitações bruscas (Lima, 2000 e Granados *et al.*, 2006), para um banho-maria a 30-34°C (Steyn, 2003) ou a 30-37°C (Aisen e Venturino, 2004, Mateus, 2014, Dendena, 2017 e Leão, 2017).

### 3.3.1.2 – ELECTROEJACULAÇÃO

Sempre que não for possível recolher sémen por VA (machos não treinados, com incapacidade física temporária, irrequietos ou de baixa libido) pode recorrer-se à electroejaculação (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen e Venturino, 2004, Hafez e Hafez, 2004, Morello e Chemineau, 2004, Granados *et al.*, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Morrell, 2011, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b, Vázquez *et al.*, 2014,

Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Leão, 2017). Pode ser usada na recolha repetida de ejaculados de indivíduos sem causar a sua morte (Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b e Vázquez *et al.*, 2014). É uma técnica que depende de um equipamento eléctrico que produz descargas de 4-15 volts (Aisen e Venturino, 2004 e Leão, 2017) ou 10-15 volts (Steyn, 2003 e Cebrián *et al.*, 2010a) e de uma sonda com 2-3 eléctrodos, que permite estimular os centros nervosos do sistema nervoso autónomo e somático (Cebrián *et al.*, 2010a) que controlam a erecção e a ejaculação do sémen (incluindo a secreção das glândulas anexas), localizados logo abaixo do recto (sonda rectal) (Ferra e Sereno, 2006, Cebrián *et al.*, 2010a e Leão, 2017).



Figura 14. Contenção e preparação de um carneiro para recolha de sémen por electroejaculação.

Para realizar a electroejaculação são necessárias, pelo menos, 3 pessoas (Cebrián *et al.*, 2010a). O macho é colocado em decúbito lateral sobre uma mesa (Figura 14) (Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004 e Cebrián *et al.*, 2010a). A zona do prepúcio deve estar livre de pêlos ou de lã e de sujidade para não contaminar o sémen (Aisen e Venturino, 2004 e Cebrián *et al.*, 2010a). A sonda, depois de lubrificada, é introduzida 10-20 cm no recto (Aisen e Venturino, 2004) ou 12-15 cm (Cebrián *et al.*, 2010a), procurando não lesionar a mucosa (Steyn, 2003 e Aisen e Venturino, 2004). Exterioriza-se a glande, segura-se o pénis na sua base (com uma gaze) e há que introduzi-lo em um cone com um tubo colector graduado, lavado, desinfectado, seco e aquecido (Steyn, 2003 e Aisen e Venturino, 2004). Pressionando a sonda contra a porção ventral da pélvis e a fim de estimular a erecção, aplicam-se 3-5 estímulos curtos (1-2 segundos

ou 2-4 segundos), separados 2-4 segundos ou 5 segundos entre si (para evitar o excesso da emissão de secreções das glândulas anexas) (Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004 e Cebrián *et al.*, 2010a). De seguida, aplicam-se 1-3 estímulos mais prolongados (5-10 segundos) para estimular a ejaculação (Aisen e Venturino, 2004).

A electroejaculação tem várias desvantagens: no mínimo, é desconfortável para os animais (Ax *et al.*, 2004, Morello e Chemineau, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006, Lucena, 2010 e Leão, 2017). Alguns autores afirmam mesmo que se trata de uma operação dolorosa, pelo que recomendam a administração de um tranquilizante com propriedades analgésicas, como a xilacina (uma injeção intramuscular de 0,5 ml de xilacina a 2%/carneiro com 70 kg), 15 minutos antes da sua realização (Cebrián *et al.*, 2010a). A electroejaculação pode originar a produção de ejaculados mais volumosos e com menor concentração espermática (Leboeuf *et al.*, 2000, Ferra e Sereno, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Ledesma *et al.*, 2016 e Leão, 2017), a libertação simultânea de espermatozóides e de urina (amostra seminal estragada) (Morello e Chemineau, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Cebrián *et al.*, 2010a e Leão, 2017) e alterar a proporção natural de secreções das glândulas anexas ou acessórias (particularmente de proteínas de baixo peso molecular), com efeitos deletérios sobre a sobrevivência dos espermatozóides (Morello e Chemineau, 2004, Morrell, 2011, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Vázquez *et al.*, 2014, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016, Ledesma *et al.*, 2016 e Leão, 2017). Todavia, parece não alterar a motilidade espermática (Leboeuf *et al.*, 2000 e Leão, 2017). Algumas das proteínas dos fluidos produzidos pelas glândulas anexas parecem desempenhar um papel importante na prevenção e na reparação de danos associados ao choque térmico (Anel *et al.*, 2006, O'Meara *et al.*, 2007, Domínguez *et al.*, 2008, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Ledesma *et al.*, 2016). A alteração da proporção relativa destas proteínas no plasma seminal pode afectar a crio-resistência dos ejaculados (O'Meara *et al.*, 2007, Domínguez *et al.*, 2008, Bernardini *et al.*, 2011, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012ab, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Ledesma *et al.*, 2016). Este fenómeno parece ser fundamental nos bodes, mas não nos ovinos (O'Meara *et al.*, 2007 e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016).

A repetição da técnica de electroejaculação não altera a motilidade espermática total, o número de marcadores moleculares da apoptose não se correlacionam com os parâmetros da motilidade, embora seja possível identificar subpopulações de espermatozóides com diferentes cinéticas, desde que os dados individuais não tenham origem no sistema CASA, mas sim em citometria de fluxo (Vázquez *et al.*, 2014).

### 3.3.2 – MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN

Na maioria dos casos, a IA implica o transporte de sémen dos centros de recolha onde se encontram os machos até às explorações onde se encontram as ovelhas a inseminar (Palacios, 2010). O sémen pode ser usado imediatamente após a sua colheita (sémen fresco) – perus, seres humanos, entre outros –, refrigerado – equinos, suínos, cães, entre outros – ou criopreservado (congelados/descongelados) – bovinos, entre outros (Ferra e Sereno, 2006, Morrell, 2011 e Leão, 2017). A taxa de fertilidade é máxima quando a IA é feita de modo a permitir aos espermatozóides estarem aptos para fecundar quando da ovulação (Pinna *et al.*, 2008 e Fonseca *et al.*, 2010).

O sémen pode ser processado de três formas diferentes:

- Fresco, puro ou diluído (30-37°C) (Aisen, 2004b, Ferra e Sereno, 2006, Fonseca *et al.*, 2010 e Leão, 2017). Tem um intervalo útil de 1,5 horas (Aisen, 2004b).
- Refrigerado (0-5°C ou 15-5°C) (Ferra e Sereno, 2006, Cebrián *et al.*, 2010c, Fonseca *et al.*, 2010 e Leão, 2017). Tem um intervalo útil de 6-7 (Aisen, 2004b), 6-8 horas (Anel *et al.*, 2006), 8-10 horas (Cseh *et al.*, 2012), 12-24 horas (Aisen, 2004b, Granados *et al.*, 2006 e Leão, 2017) ou 72 horas (O'Hara *et al.*, 2010). Os intervalos mais elevados ocorrem quando se trabalha com sémen refrigerado a 5°C (Anel *et al.*, 2006 e Granados *et al.*, 2006). Porém, nem todas as alterações promovidas pelas baixas temperaturas são benéficas para os espermatozóides (Anel *et al.*, 2006 e Arando *et al.*, 2017). A 5°C, por exemplo, a concentração intracelular de Na<sup>+</sup> aumenta, devido à depressão da actividade das bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, o que prejudica a sobrevivência dos espermatozóides (Anel *et al.*, 2006).
- Congelado (-196°C). Tem um intervalo útil indefinido (Aisen, 2004b, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006, Dorado *et al.*, 2010, Fonseca *et al.*, 2010, Leahy *et al.*, 2010, Perry *et al.*, 2012 e Leão, 2017).

De seguida são discriminados os dois métodos utilizados no presente estudo: sémen fresco e refrigerado.

#### 3.3.2.1 – SÉMEN FRESCO

Nos pequenos ruminantes, a maioria das IA são realizadas com sémen fresco (David *et al.*, 2015, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Leão, 2017). O sémen fresco pode ser usado puro ou

diluído (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004b, Dendena, 2017 e Leão, 2017). A IA com sémen puro (não diluído) tem de ser feita até 20 minutos pós-recolha do ejaculado: doses de 0,1-0,5 ml (Steyn, 2003). O sémen fresco diluído mantém-se viável por um curto período de tempo – 1 hora (Dendena, 2017), 1,5 horas (Aisen *et al.*, 2004b), 1-2 horas (Steyn, 2003) ou 2 horas (Cebrián *et al.*, 2010c) –, o que constitui uma grande limitação ao seu uso em programas de melhoramento genético (O'Hara *et al.*, 2010 e Leão, 2017). Conservados em fresco, a motilidade e a viabilidade dos espermatozóides reduzem-se rapidamente (O'Hara *et al.*, 2010). Ocorre a acumulação de catabolitos provenientes da actividade metabólica dos espermatozóides, que acabam por se tornar tóxicos para os mesmos (Rojero *et al.*, 2009). Depois de colocado no genital feminino, o sémen fresco necessita de 4-6 horas (Leão, 2017) ou 5-6 horas (Steyn, 2003) para sofrer o processo de capacitação.

Na inseminação com sémen fresco por via cervical devem ser utilizadas doses seminais de 50-200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides, num volume de 0,02-0,1 ml (Aisen, 2004b e Leão, 2017). Santos-Neto *et al.* (2015) e Dendena (2017) usaram doses de 200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides, em palhinhas francesas de 0,25 ml.

### 3.3.2.2 – SÉMEN REFRIGERADO

Este método de preservação do sémen tem várias vantagens: é fácil de manusear, é barato e pode ser utilizado em inseminações cervicais (Sorensen Jr, 1979, Anel *et al.*, 2006 e Pérez-Clariget e Porras, 2008). Possibilita ainda o transporte de doses seminais até explorações geograficamente mais afastadas (Gordon, 1997, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Morrell, 2011 e Leão, 2017), onde se pretende inseminar um número limitado de fêmeas (Sorenson Jr., 1979).

A refrigeração do sémen resulta na redução temporária e reversível do metabolismo energético dos espermatozóides, de que resulta o prolongamento da sua viabilidade e da sua capacidade fecundante (Gordon, 1997, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Cebrián *et al.*, 2010c, Leahy *et al.*, 2010, Sariözkan *et al.*, 2010, Câmara e Guerra, 2011, Morrell, 2011, Memon *et al.*, 2012, Ledesma *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Leão, 2017 e Salmon *et al.*, 2017). O arrefecimento dos espermatozóides não pode ser feito de maneira brusca, pois o choque térmico promove alterações súbitas e irreversíveis da membrana plasmática (Steyn, 2003, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010c e Leão, 2017). A velocidade de refrigeração deve ser moderada e homogénea (Figura 15) (Baril *et al.*, 1993, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Cebrián *et al.*, 2010c e Leão, 2017): -0,2°C/minuto (Palacios, 2010) ou -0,1°C a -0,5°C/minuto

(Aisen, 2004b e Leão, 2017). Alcançada a temperatura de refrigeração, a etapa seguinte é denominada de “equilíbrio” (Aisen, 2004b). Durante cerca de 10 minutos, estabelece-se um equilíbrio entre o meio extra e intracelular (Aisen, 2004b e Leão, 2017).



Figura 15. Banho-maria refrigerado usado na refrigeração de sémen.

Na refrigeração, o ritmo de decréscimo da fertilidade é de 10-35%/dia (Salamon e Maxwell, 2000 e Cseh *et al.*, 2012). O processo de refrigeração (tal como o de criopreservação) pode antecipar a capacitação e a reacção acrossómica e, conseqüentemente, reduzir a viabilidade e o período fértil dos espermatozoides pós-inseminação (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006, Domínguez *et al.*, 2008, Bernardini *et al.*, 2011, Cseh *et al.*, 2012, Memon *et al.*, 2012 e Fonseca *et al.*, 2017). Estes eventos são acompanhados de um decréscimo do transporte e da sobrevivência dos espermatozoides no tracto genital feminino (Domínguez *et al.*, 2008 e Cseh *et al.*, 2012). Mais, a taxa de mortalidade embrionária precoce aumenta e tem sido associada, em várias espécies, à fecundação por espermatozoides “envelhecidos” (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006 e Cseh *et al.*, 2012). O tempo útil do sémen refrigerado pode ser aumentado (assim como o da sua capacidade fertilizadora) através da adição de agentes antioxidantes (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006, Cseh *et al.*, 2012 e Memon *et al.*, 2012), da programação cuidada e da aplicação exímia da técnica de IA (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006 e Cseh *et al.*, 2012).

Como o objectivo de se obterem boas taxas de fertilidade, as inseminações cervicais com sémen refrigerado devem ser realizadas nas primeiras 24 horas (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006 e Cseh *et al.*, 2012) ou 24-48 horas (Pérez-Clariget e Porras, 2008) de preservação. Porém, em condições especiais, o sémen de carneiro, preservado a 5°C, pode ser usado até 72 horas pós-refrigeração (Cseh *et al.*, 2012). Porém, Cebrián *et al.* (2010c) recomendam que não se ultrapasse as 6 horas.

Nos ovinos, cada dose seminal refrigerada (0,25 ml) deve conter entre 100-400 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Aisen, 2004b), 200 x 10<sup>6</sup> (Cseh *et al.*, 2012 e Dendena, 2017) ou 400 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993), se a deposição for vaginal (Cseh *et al.*, 2012). O refluxo cervical deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012 e Dendena, 2017), particularmente quando este é abundante (Dendena, 2017).

### 3.3.2.3 – DILUIDORES

Os diluidores seminais utilizados na preservação do sémen fresco são os mesmos que são usados na preservação de sémen refrigerado (Cebrián *et al.*, 2010c). Existem vários tipos de diluidores seminais: naturais (leite de vaca desnatado, gema de ovo, água de coco ou gel de aloé vera) ou sintéticos (Anel *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2016d e Leão, 2017).

Os diluidores seminais permitem aumentar o volume do sémen, estabilizar o pH (efeito tampão), manter a osmolaridade, garantir uma fonte de energia aos espermatozóides e protegê-los de possíveis infecções bacterianas ou fúngicas, para além de os proteger do choque térmico provocado pela redução da temperatura (Gordon, 1997, Aisen 2004, Ferra e Sereno, 2006, Cebrián *et al.*, 2010c, Lima, 2010, Morell, 2011, Cseh *et al.*, 2012, Valentin *et al.*, 2016d e Leão, 2017). A gema de ovo é um excelente protector do choque térmico (Cebrián *et al.*, 2010c).

Os compostos com capacidades tampão mais utilizados são o fosfato ou o citrato de sódio, o TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), o HEPES (Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-Piperacínil-Etanossulfónico) e o MOPS (Ácido 3-morfolinopropano sulfónico) (Cebrián *et al.*, 2010c e Lima, 2010). Estes compostos tem um efeito tampão superior ao do fosfato ou citrato de sódio, uma vez que conseguem penetrar no citoplasma celular e actuar como um tampão intracelulares (Abecia e Forcada, 2010 e Lima, 2010). Conseguem ainda aumentar a tolerância dos espermatozóides ao aumento dos catiões monovalentes presentes no interior da célula (Cebrián *et al.*, 2010c).

Os açúcares são a grande fonte de energia dos espermatozóides (Cebrián *et al.*, 2010c, Lima, 2010 e Leão, 2017). A frutose é o único hidrato de carbono presente no plasma seminal, embora os espermatozóides possam metabolizar a glicose e a manose (Cebrián *et al.*, 2010c e Leão, 2017). Estes ajudam a manter a pressão osmótica do diluente e consequentemente promovem a integridade da membrana espermática durante a preservação do sémen (Cebrián *et al.*, 2010c, Lima, 2010 e Leão, 2017). A presença de alguns sais minerais, como o bicarbonato ou o cálcio, facilita a ocorrência da capacitação espermática (Cebrián *et al.*, 2010c e Lima,

2010). A osmolaridade do diluidor deve rondar os 300mOsm/kg (isotónico para as células espermáticas) (Cebrián *et al.*, 2010c).

Os antibióticos e antifúngicos presentes nos diluidores seminais limitam o crescimento destes contaminantes e previnem a infecção da fêmea inseminada (Morrell, 2011, Cseh *et al.*, 2012 e Leão, 2017). Se o sémen for utilizado de imediato, a adição de antibióticos e de antifúngicos é dispensável (Cebrián *et al.*, 2010c). Na verdade, o tracto genital feminino dispõem de mecanismos fisiológicos bem desenvolvidos para lidar com as contaminações transmitidas durante a cópula (Morrell, 2011). Todavia, estes podem ser suplantados por uma multiplicação bacteriana extraordinária no diluidor seminal ou pela colocação do sémen num local não fisiológico (Morrell, 2011).

O nível de diluição do sémen depende da motilidade e da concentração espermática (Ferra e Sereno, 2006). Esta pode chegar a ser de 1:4 (Ferra e Sereno, 2006). Contudo a diluição mais comum é de 1:2 (Steyn, 2003 e Ferra e Sereno, 2006), dado que o uso de diluições superiores resulta, normalmente, numa baixa concentração espermática final e num aumento do risco de refluxo seminal nas inseminações cervicais pouco profundas (Bicudo, 2005). Por outro lado, facilita a ocorrência do choque térmico (Cseh *et al.*, 2012). Este pode, no entanto, ser evitado através da redução gradual de temperatura (Baril *et al.*, 1993 e Aisen, 2004b).

Os diluidores devem ser mantidos à mesma temperatura de preservação do sémen (Ferra e Sereno, 2006). Desta forma, quando da diluição, previne-se a ocorrência do choque térmico (Ferra e Sereno, 2006).

### 3.4 – TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS

A beneficiação das fêmeas pode ser feita por monta natural, monta dirigida (livre ou controlada) ou por IA com sémen fresco (puro ou diluído), refrigerado ou congelado (Gordon, 1997, Anel *et al.*, 2006, Fonseca *et al.*, 2010, Palacios, 2010, Valentin *et al.*, 2016d e Leão, 2017). Nos pequenos ruminantes, a inseminação pode ser vaginal, cervical, transcervical ou uterina (laparoscopia ou laparotomia) (Anel *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Fonseca *et al.*, 2010, Valentin *et al.*, 2016d e Leão, 2017).

A IA deve ser feita o mais depressa possível, evitando que as fêmeas sejam sujeitas a elevados níveis de *stress* (Palacios, 2010, Dendena, 2017 e Leão, 2017). Quando a fêmea apresenta um fluxo vaginal pouco ou muito intenso, a taxa de fertilidade tende a diminuir (Palacios, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011, Morrell, 2011 e Dendena, 2017). No último caso à que proceder à eliminação do excesso de muco (Palacios, 2010 e Dendena, 2017). Quando da

colocação do espéculo vaginal há que evitar a introdução de fezes, de água ou de sabão, uma vez que todos eles promovem uma resposta espermicida (Palacios, 2010). Não inseminar ovelhas com vaginites, muco sanguinolento, cores e odores estranhos e fêmeas mal sincronizadas ou que perderam a esponja vaginal (Palacios, 2010). Quando a fêmea é muito grande, muito gorda ou quando está “demasiado” imobilizada, ela tende a contrair continuamente a vagina, o que dificulta a observação do Os externo (Palacios, 2010). Neste caso, o melhor é libertar a fêmea, esperar um pouco e depois voltar a tentar inseminá-la (Palacios, 2010).

De seguida é apresentada alguma informação relativa aos dois métodos de inseminação utilizados no presente estudo.

### 3.4.1 – VAGINAL

Na inseminação vaginal (“ tiro às escuras”), o sémen é depositado no fundo do saco vaginal, sem qualquer tentativa de localização do canal cervical (Ferra e Sereno, 2006, Palacios, 2010 e Dendena, 2017). Esta pode ser realizada com sémen fresco ou com sémen refrigerado (Ferra e Sereno, 2006 e Cseh *et al.*, 2012). O procedimento é rápido e fácil de executar em condições de campo (Ferra e Sereno, 2006 e Cseh *et al.*, 2012), ainda que as taxas de fertilidade sejam baixas: 30-50% (Cseh *et al.*, 2012) ou 40-65% (Buckrell *et al.*, 1991 e Ferra e Sereno, 2006). O uso de sémen congelado produz taxas de fertilidade aparente muito pobres (5-15%) (Cseh *et al.*, 2012).

Durante a estação reprodutiva, a IA vaginal resulta em melhores taxas de fertilidade depois de se proceder à identificação das ovelhas em cio (Steyn, 2003, Fonseca *et al.*, 2010, Palacios, 2010, Cseh *et al.*, 2012 e Alhamada *et al.*, 2017). ). Na generalidade das explorações, esta identificação não é fácil, prática e rápida de realizar, pois passa pela observação das fêmeas, no mínimo, cada 6-12 horas (Alhamada *et al.*, 2017). O uso de rufiões (machos munidos de avental ou vasectomizados) equipados com um arnês marcador facilita esta operação (Steyn, 2003, Palacios, 2010 e Theodosiadou *et al.*, 2014). Ainda assim estes procedimentos estão sujeitos a erros, como a timidez dos machos na presença de pessoas (Alhamada *et al.*, 2017). Mais, a presença dos machos altera as concentrações fisiológicas de estradiol nas fêmeas (Theodosiadou *et al.*, 2014). Alhamada *et al.* (2017) refere a existência de um equipamento que pode ser usado com sucesso na identificação das ovelhas em cio – Alpha Detector (Alpha-D) – , que regista o número total de montas realizadas pelos carneiros do rebanho. Depois de detectado o cio, a IA deve ser feita nas 12-18 horas seguintes (Bettencourt, 1999 e Ferra e

Sereno, 2006), assegurando a presença de espermatozóides viáveis na ampola quando da fecundação (Evans e Maxwell, 1987, Bettencourt, 1999 e Palacios, 2010). A IA vaginal também pode realizada a Tempo Fixo (Bettencourt, 1999, Ferra e Sereno, 2006, Holtz *et al.*, 2008, Palacios, 2010, Theodosiadou *et al.*, 2014, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018). Bettencourt (1999) e Ferra e Sereno (2006) recomendam que esta deve ser feita 48-58 horas pós-remoção das esponjas vaginais. Os demais autores realização a IA vaginal 55 horas pós-remoção das esponjas vaginais.

Nas ovelhas, as doses seminais para deposição vaginal devem conter entre 200-400 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Ax *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006 e Dendena, 2017) ou 300 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Aisen, 2004a) ou 400 x 10<sup>6</sup> (Cseh *et al.*, 2012). Idealmente, o volume da dose seminal deve ser de 0,2 ml (Cseh *et al.*, 2012). O uso de sémen congelado na inseminação vaginal não é recomendado (Cebrián *et al.*, 2010c). A taxa de fertilidade pós-inseminação vaginal com sémen fresco ou refrigerado é normalmente aceitável (Cseh *et al.*, 2012): 40-65% (Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2016d) ou 88,9% (Dendena, 2017).

### **3.4.2 – CERVICAL**

Nos ovinos, a conformação desalinhada das pregas cervicais dificulta a passagem do pistolete de inseminação (Baril *et al.*, 1993, Cebrián *et al.*, 2010c, Lima, 2010, Morrell, 2011, Valentim *et al.*, 2016d e Leão, 2017). Na inseminação cervical, o sémen é depositado no canal cervical (1-3 cm de profundidade) (Ferra e Sereno, 2006). As doses de sémen refrigerado devem conter 100-200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2009) ou 150-200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Aisen, 2004a e Dendena, 2017), garantindo uma taxa de fertilidade de 60-70% (Ax *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2009), de 66,7-88,2% (Dendena, 2017), de 66,7-88,3% (Conradi *et al.*, 2017) ou de 97,1% (Fornazari *et al.*, 2018). A fertilidade aumenta com o número de pregas ultrapassadas desde que não se force a entrada (Steyn, 2003, Aisen, 2004a, Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d). Este efeito não foi observado por Dendena (2017) e Conradi *et al.* (2017). A inflação ou a lesão da mucosa cervical diminui ainda mais o seu diâmetro interior do canal cervical e causa um afluxo anormal de células de defesa ao seu lúmen (Aisen, 2006a, Candappa e Bartlewski, 2011 e Fonseca *et al.*, 2010 e Valentim *et al.*, 2016d).

Nos ovinos, a inseminação cervical deve ser feita 48-58 horas (Bettencourt, 1999 e Ferra e Sereno, 2006) ou 48-60 horas após a remoção das esponjas vaginais (Buckrell *et al.*, 1991, Gordon, 1997, Ax *et al.*, 2004, Donovan *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Valentim *et al.*,

2016d e Leão, 2017). Se a inseminação for simples, Baril *et al.* (1993), Gordon (1997), Ax *et al.* (2004), Ferra e Sereno (2006), Conradi *et al.* (2017), Dendena (2017) e Fornazari *et al.* (2018) recomendam que esta seja feita 55 horas pós-tratamento. Se for dupla há que realizá-las 48-50 e 58-60 horas (Bettencourt, 1999 e Ferra e Sereno, 2006), 50 e 60 horas (Baril *et al.*, 1993) ou 48 e 60 horas pós tratamento (Ax *et al.*, 2004).

## II – TRABALHO EXPERIMENTAL

### 1 – MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em Carviçais, concelho de Torre de Moncorvo, região de Trás-os-Montes e Alto Douro, mais precisamente na exploração comercial Mateus Lda. (Latitude: 41° 10'N, Longitude: 6° 55'W e Altitude: 701 m), entre 01 de Abril e 20 de Julho 2017.

As ovelhas foram mantidas em estabulação permanente e alimentadas, em grupo, com feno de prados naturais (*ad libitum*) e de luzerna (1,0 kg/animal/dia) e suplementadas com alimento concentrado comercial ( $\approx$  1,0 kg/animal/dia). Durante a ordenha (2 vezes/dia), as ovelhas receberam ainda 500 g/animal de alimento concentrado comercial.

Este ensaio teve início com a pesagem das ovelhas em uma balança com jaula (sensibilidade mínima de 100 gramas) e a determinação da sua condição corporal (CC) segundo a tabela de classificação australiana (Russel *et al.*, 1969).

#### 1.1 – ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizadas 110 ovelhas cruzadas de Awassi x Sarda, com idades compreendidas entre 1-13 anos (primíparas e múltíparas). Todas as ovelhas tinham parido 5-6 meses antes do início do estudo e estavam em lactação.

#### 1.2 – AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA

A actividade ovárica das ovelhas foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de P<sub>4</sub>. A recolha das amostras de sangue foi feita com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através de punção da veia jugular. Após centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante (plasma sanguíneo), que foi pipetado para tubos de Eppendorf devidamente identificados. Posteriormente, estes foram congelados numa arca ultracongeladora (-70°C) (Thermo 960®, Electron Cooperation, Marlotta, EUA) até ao momento do doseamento hormonal.

Os níveis plasmáticos de P<sub>4</sub> foram determinados através da técnica de RIA (radioimunoensaio). Esta foi realizada com recurso a um leitor de cintilações DPC® Gamma C12 (Bertholt Technologies, Bad Wildbad, Alemanha) (Figura 16), segundo a técnica indicada pelo fabricante dos *kits* (DiaSource® ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 7,7 e 15,8%.



Figura 16. Contador de cintilações  $\gamma$  (esquerda) e colocação dos tubos de ensaio nos poços de leitura.

### **1.2.1 – AVALIAÇÃO DA CICLICIDADE PRÉ-TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS**

Nas duas semanas anteriores à realização dos tratamentos progestagénicos curtos + eCG (17-26 de Maio de 2017), com o objectivo de determinar o estado fisiológico das ovelhas (Cíclicas vs. Anestro), procedeu-se à colheitas de amostras de sangue, com 3-4 dias de intervalo. As colheitas foram feitas sempre no período da manhã. A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.2.

Considerou-se que as ovelhas estavam em anestro sazonal quando, na totalidade das amostras recolhidas, os níveis plasmáticos de  $P_4$  foram inferiores a 0,5 ng/ml.

### **1.2.2 – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS + eCG**

Com o intuito de identificar a formação do primeiro CL pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG, nos cinco dias pós-administração de eCG, procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para posterior determinação dos níveis plasmáticos de  $P_4$ . A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.2.

Considerou-se que o primeiro CL se havia formado quando os níveis plasmáticos de  $P_4$  ultrapassaram, pela primeira vez, os 0,5 ng/ml.

### **1.3 – TRATAMENTOS APLICADOS**

O presente trabalho teve início a 01 de Abril de 2017, com a colocação de um implante subcutâneo de melatonina (18 mg; Melovine<sup>®</sup>, CEVA, Portugal) em 63 ovelhas (grupo Melatonina) (Figura 17). As demais ovelhas constituíram o grupo Controlo (n = 47).



Figura 17. Material necessário à colocação de implantes subcutâneos de melatonina. Pistola, agulha, carreto com implantes e implante que é colocado na base exterior da orelha.

No dia 01 de Junho de 2017 as ovelhas do grupo Melatonina foram divididas em dois subgrupos – FGA (n = 36) e MAP (n = 27) (Quadro II). As ovelhas do subgrupo FGA receberam uma esponja vaginal impregnada com 20 mg de FGA (Chrono-Gest<sup>®</sup>, Intervet, Portugal) e as do subgrupo MAP uma esponja vaginal com 60 mg de MAP (Sincro-Gest<sup>®</sup>, Laboratorios Ovejero, Espanha) (Figura 18). As ovelhas do grupo Controlo foram tratadas com 20 mg de FGA. Quando da colocação das esponjas vaginais, todas as ovelhas receberam uma injeção intramuscular (i.m.) de 100 µg de cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>, MSD Animal Health, Portugal) – análogo sintético da PGF<sub>2α</sub>. O tratamento progestagénico teve a duração de sete dias.

Quadro II. Divisão das ovelhas de acordo com os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva aplicados

Número Total de Ovelhas Utilizadas (n = 110)		
Controlo (n = 47)	Melatonina (n = 63)	
PGF <sub>2α</sub> + FGA (7 dias) (n = 47)	PGF <sub>2α</sub> + FGA (7 dias) (n = 36)	PGF <sub>2α</sub> + MAP (7 dias) (n = 27)

Quando da remoção das esponjas vaginais (07 de Junho de 2017), todas as ovelhas receberam uma injeção i.m. de 750 UI de eCG (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet, Portugal).



Figura 18. Material necessário à colocação de esponjas vaginais.

#### 1.4 – RECOLHA DO SÉMEN

Neste estudo foram utilizados 2 carneiros (1-2 anos de idade) da raça Assaf, pertencentes à Exploração Comercial Mateus Lda. O sémen foi recolhido por electroejaculação (Electrojac™ Ideal, Minesota, EUA), pois os carneiros não estavam treinados para a recolha por VA. De cada macho foram recolhidos 4 ejaculados: 2 no período da manhã e 2 no período da tarde. Os machos não ejaculavam há 3 dias.

Depois da colheita, os tubos colectores foram rapidamente transportados para laboratório e mantidos num banho-maria (Grant International, Cambridge, Inglaterra), a 37°C (Figura 19). No mesmo equipamento tinham sido colocados os diluidores seminais.



Figura 19. Banho-maria, palhinhas francesas e pó polivinílico.

A quantidade e a qualidade do sémen foram avaliadas visualmente: o volume foi medido através da graduação dos tubos colectores ( $\approx 2$  ml) (Figura 20), a concentração do ejaculado foi

classificada de muito cremosa ( $4-6 \times 10^9$  espermatozoides/ml) e a motilidade massal de muito boa ( $\geq 90\%$  de espermatozoides móveis) segundo a Tabela de Steyn (2003). Estima-se que cada dose seminal continha, pelo menos,  $200 \times 10^6$  espermatozoides.



Figura 20. Avaliação visual de algumas características seminais.

### 1.5 – DOSES SEMINAIS (FRESCAS E REFRIGERADAS)

Cada ejaculado foi diluído (1:1) com um de dois diluidores comerciais: Andromed<sup>®</sup> (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) ou OviXcell<sup>®</sup> (IMV Technologies, L'Aigle, França) (Quadro III).

Quadro III. Doses de sémen fresco ou refrigerado, diluído com Andromed<sup>®</sup> (Andro) ou com OviXcell<sup>®</sup>

Controlo (n = 47)				Melatonina (n = 63)			
Fresco (n = 23)		Refrigerado (n = 24)		Fresco (n = 33)		Refrigerado (n = 30)	
Andro (n = 13)	OviXcell (n = 10)	Andro (n = 14)	OviXcell (n = 10)	Andro (n = 16)	OviXcell (n = 17)	Andro (n = 15)	OviXcell (n = 15)

Após 10 minutos de repouso a 37°C, a temperatura dos ejaculados recolhidos de manhã foi reduzida, durante cerca de 120 minutos, de 37°C para 15°C, com recurso a um banho-maria refrigerado (Neslab<sup>®</sup> RTE 221, Newington, EUA) (Figura 21). Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. As palhinhas brancas continham sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> (n = 29) e as vermelhas sémen diluído com OviXcell<sup>®</sup> (n = 25). As inseminações ocorreram todas no intervalo máximo de 120 minutos pós-refrigeração (15°C).



Figura 21. Banho-maria refrigerado.

Os espermatozoides recolhidos de tarde também foram diluídos (1:1) com Andromed<sup>®</sup> ou com OviXcell<sup>®</sup>. Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. As palhinhas brancas continham sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> (n = 29) e as vermelhas sémen diluído com OviXcell<sup>®</sup> (n = 27). As palhinhas de sémen refrigerado foram transportadas numa arca refrigeradora da Minitüb (Tiefenbach, Alemanha) à temperatura de 15°C. As palhinhas de sémen fresco foram transportadas num banho-maria de transporte da IMV (L'Aigle, França), a 37°C (Figura 22). Entre a preparação das doses seminais de sémen fresco e o começo da IA passaram menos de 30 minutos.



Figura 22. Banho-maria (esquerda) e arca refrigeradora (direita) para transporte, respectivamente, de sémen fresco e refrigerado.

#### 1.6 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL A TEMPO FIXO

Todas as ovelhas foram inseminadas, independentemente de terem manifestado cio, 55 + 1 horas depois da administração de eCG (Baril *et al.*, 1993, Greyling *et al.*, 1997, Palacios,

2010, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018). Começou-se por inseminar as ovelhas com sémen fresco.



Figura 23. Classificação ao tipo de *Os* externo: a) bico de pato, b) aba, c) rosa, d) papila e e) fenda (Kershaw *et al.*, 2005).

As IA foram realizadas por apenas um inseminador. Quando da IA registaram-se os seguintes parâmetros: cor da mucosa vaginal (Rosa *vs.* Rosa Pálido *vs.* Hemorrágica), grau de lubrificação vaginal (Reduzida *vs.* Boa *vs.* Abundante), tipo de *Os* externo (Figura 23), viscosidade do muco cervical (Líquida *vs.* Viscosa), local de deposição de sémen (Vaginal *vs.* 1ª prega *vs.* 2ª prega) e se houve ou não refluxo.



Figura 24. Equipamento e material de inseminação utilizado.

A deposição do sémen foi feita sempre de forma a não forçar a penetração, evitando inflamar ou ferir a mucosa do canal cervical. No procedimento, utilizou-se um vaginoscópio, um sistema de luz LED e pistoletas Quicklock® e bainhas Minitub® (Tiefenbach, Alemanha) (Figura 24).

Terminadas as IA, o pessoal envolvido retirou-se calmamente do local, as ovelhas foram libertadas e deixadas sozinhas durante 4 horas. Por outro lado, é importante salientar que, nos 30 dias seguintes se manteve o aporte energético/proteico da dieta.

### 1.6.1 – POSIÇÃO DAS FÊMEAS DURANTE A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

As ovelhas foram inseminadas na sala de ordenha. Para facilitar a observação de *Os* externo, um ou dois membros da equipa elevaram os membros posteriores das ovelhas, mantendo, no entanto, os membros anteriores sempre em contacto com o solo (Figura 25).



Figura 25. Posição de inseminação das ovelhas.

### 1.7 – DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Trinta e oito dias (17 de Julho de 2017) após a IA (09 de Junho de 2017) procedeu-se ao diagnóstico de gestação por ultra-sonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet e de uma sonda rectal multifrequência (5,0-10,0 MHz) (Figura 26). A frequência mais utilizada foi a de 5,0 MHz.



Figura 26. Ecógrafo Mindray Z5Vet e sonda rectal multifrequência.

## 1.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

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



## 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início deste estudo, a idade média das ovelhas Awassi x Sarda era de  $3,3 \pm 2,5$  anos (c.v. = 76,1%). As diferenças de idade registadas entre as ovelhas dos grupos Controlo e Melatonina revelaram-se estatisticamente significativas ( $P \leq 0,001$ ) (Quadro IV). Na verdade, as ovelhas Melatonina incluíam a maioria das ovelhas com mais de 8 anos de idade (1-7 anos: 22,2% vs.  $\geq 8$  anos: 77,8%) ( $\chi^2 = 62,7$ ;  $P \leq 0,001$ ). O mesmo sucedeu relativamente às ovelhas tratadas com FGA ou MAP ( $P \leq 0,05$ ). Neste caso, todas as ovelhas mais velhas ( $\geq 8$  anos) foram tratadas com FGA e nenhuma foi tratada com MAP. A idade dos grupos inseminados com sémen fresco ou refrigerado ou com sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> ou com OviXcell<sup>®</sup> não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ).

Quadro IV. Idade, peso corporal e condição corporal (CC) das ovelhas estudadas, de acordo com os tratamentos hormonais aplicados, com o processo de preservação e o tipo de diluidor

	<b>Idade</b> (anos)	<b>Peso</b> (kg)	<b>CC</b> (pontos)
<b>Controlo</b>	$4,7^b \pm 2,9$	$54,7^a \pm 10,2$	$2,8^a \pm 0,5$
<b>Melatonina</b>	$2,4^a \pm 1,7$	$58,2^a \pm 8,8$	$2,9^a \pm 0,4$
<b>FGA</b>	$3,7^a \pm 2,7$	$56,2^a \pm 9,6$	$2,8^a \pm 0,5$
<b>MAP</b>	$2,3^c \pm 1,4$	$56,2^a \pm 10,4$	$2,9^a \pm 0,5$
<b>Fresco</b>	$3,1^a \pm 2,3$	$56,7^a \pm 10,3$	$2,8^a \pm 0,5$
<b>Refrigerado</b>	$3,7^a \pm 2,8$	$55,6^a \pm 9,1$	$2,9^a \pm 0,5$
<b>Andromed</b>	$3,5^a \pm 2,8$	$57,2^a \pm 10,2$	$2,8^a \pm 0,5$
<b>OviXcell</b>	$3,2^a \pm 2,5$	$55,0^a \pm 9,1$	$2,9^a \pm 0,5$

a=a, para  $P > 0,05$ ; a**b**, para  $P \leq 0,001$ ; a**c**, para  $P \leq 0,05$  (entre linhas, mesmo parâmetro).

As ovelhas pesavam, em média,  $56,2 \pm 9,7$  kg (c.v. = 17,3%) e apresentavam uma CC média de  $2,9 \pm 0,5$  (c.v. = 16,3%). As diferenças de peso corporal e de CC entre ovelhas Controlo e Melatonina, tratadas com FGA + eCG ou MAP + eCG, inseminadas com sémen fresco ou refrigerado, diluído com Andromed<sup>®</sup> ou com OviXcell<sup>®</sup> foram estatisticamente não significativas ( $P > 0,05$ ). As ovelhas apresentavam um peso e uma CC média adequada à cobertura – 2,5-3,5 pontos (O’Brein, 2002, Scaramuzzi e Martin, 2008 e Karikari e Blasu, 2009) ou 3,0-4,0 pontos (Palacios, 2010 e Valentim *et al.*, 2016b).

## 2.1 – ESTADO FISIOLÓGICO PRÉ-TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS

Nas duas semanas anteriores (Maio) à aplicação dos tratamentos progestagénicos curtos + eCG, todas as ovelhas Awassi x Sarda apresentaram em, pelo menos uma das tomas de sangue, níveis plasmáticos de P<sub>4</sub> superiores a 0,5 ng/ml, o que significa que, estavam “cíclicas”. Este resultado era já esperado, pois o trabalho foi realizado com ovelhas cruzadas de raças mediterrânicas, na zona da Terra Quente Transmontana, durante a Primavera – temperaturas do ar mais amenas, com menores gastos energéticos em termorregulação, mais energia disponível para a reprodução (Salama *et al.*, 2014, Palacios e Abecia, 2015, Abecia *et al.*, 2016 e Silva *et al.*, 2016). Na mesma altura, ainda que na Terra Fria Transmontana e trabalhando com ovelhas da raça Churra Galega Bragançana, Conradi (2018) verificou igualmente que todas as ovelhas apresentaram níveis plasmáticos de P<sub>4</sub> superiores a 0,5 ng/ml. Mateus (2014) verificou que, na primeira quinzena de Março, 43,9% das ovelhas Awassi x Sarda já apresentava actividade ovárica completa. Porém este trabalho foi realizado no mês de Março.

Nem a idade, nem o peso corporal, nem a CC afectaram significativamente o estado fisiológico pré-tratamentos progestagénicos curtos + eCG ( $P > 0,05$ ). A administração prévia de melatonina também não teve qualquer efeito significativo ( $P > 0,05$ ) porque todas as ovelhas já estavam cíclicas (Controlo *vs.* Melatonina).

## 2.2 – RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS CURTOS + ECG

No presente trabalho os implantes subcutâneos de melatonina foram colocados desconhendo-se o estado fisiológico (Cíclicas *vs.* Anestro) inicial das ovelhas. A decisão de os colocar baseou-se na necessidade de aumentar as taxas reprodutivas, particularmente, se as ovelhas estivessem em anestro (Forcada *et al.*, 2001, Sánchez *et al.*, 2003 e Santander *et al.*, 2003, Valentim *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2009). A eficácia dos dois tratamentos progestagénicos curtos + eCG foi total – 100,0%. No estudo desenvolvido por Conradi (2018), a resposta das ovelhas Churras Bragançanas ao tratamento curto FGA + eCG foi igualmente de 100,0%. Tanto no presente trabalho, como no de Conradi (2018), os efeitos da administração prévia de melatonina exógena revelaram-se estatisticamente não significativos ( $P > 0,05$ ). As condições ambientais particularmente favoráveis, a ciclicidade apresentada pelas ovelhas, o seu peso e a sua CC são alguns dos factores que poderão ter contribuído para este resultado.

De acordo com Bartlewski *et al.* (1999b), os níveis circulantes de P<sub>4</sub> começam a elevar-se 3-7 dias depois da detecção do cio. Neste trabalho a primeira elevação dos níveis plasmáticos de P<sub>4</sub> surgiu, em média, 30,5 ± 12,6 horas (c.v. = 41,1%) pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG. Este resultado é semelhante ao encontrado por Conradi (2018) em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana (≈ 32 horas; em 2017) e por Fornazari (2018) em ovelhas Assaf (28,9 ± 11,5 horas; em 2017). Contudo, ele difere significativamente do observado por Dendena (2017) em ovelhas Churras Bragançanas (53,1 ± 15,6 horas; em 2016) e por Conradi *et al.* (2017) em ovelhas Lacaune (50,9 ± 33,5 horas; em 2017). Os tratamentos progestagénicos produzem respostas reprodutivas variáveis (Evans, 2003 e Martinez *et al.*, 2015), possivelmente porque não controlam o crescimento folicular (Menchaca e Rubianes, 2004 e Martinez *et al.*, 2015) e porque promovem a maturação de folículos pré-ovulatórios (Martin *et al.*, 1986, Chemineau *et al.*, 1987 e Contreras-Solis *et al.*, 2008). Por outro lado, Driancourt *et al.* (1987) demonstraram que a quantidade de gonadotropinas que é necessária à indução do crescimento folicular final é muito variável. Os resultados encontrados no presente estudo indicam variações raciais e anuais na resposta das ovelhas aos tratamentos progestagénicos “curtos” + eCG. A administração prévia de melatonina não afectou significativamente a duração do intervalo entre a remoção das esponjas vaginais e a PENPP<sub>4</sub> (P>0,05).

A diferença entre progestagénios utilizados revelou-se estatisticamente não significativa (FGA 31,2 ± 13,4 horas vs. MAP – 28,4 ± 9,5 horas) (P>0,05). Segundo Romano (1996) nos pequenos ruminantes o FGA tem uma semivida mais curta do que o MAP. Aparentemente, o FGA promove um regresso mais rápido à actividade ovárica cíclica e ao cio (maior precisão e concentração dos cios) do que o MAP, sem alterar a duração do cio (Romano, 1996). Contudo, Ungerfeld e Rubianes (2002), Zeleke *et al.* (2005), Abecia *et al.* (2012), Mateus (2014), Afonso (2015), Dendena (2017) e Fornazari *et al.* (2018) não encontraram qualquer diferença estatisticamente significativa na resposta reprodutiva de ovelhas tratadas com FGA + eCG ou com MAP + eCG. Os dados encontrados no presente trabalho suportam as observações dos últimos autores. Por outro lado, eles revelam a rapidez com que as ovelhas começaram a produzir níveis plasmáticos de P<sub>4</sub> superiores a 0,5 ng/ml. Este facto pode ter resultado da elevada dose de eCG administrada (750 UI). Contudo, Conradi (2018) obteve o mesmo resultando após administração de apenas 500 UI de eCG.

Nos programas de IA o sucesso da inseminação cervical a tempo fixo depende da resposta ao tratamento de controlo da actividade reprodutiva, da taxa ovulatória e do momento de realização da mesma (Baril *et al.*, 1993, Drion *et al.*, 2001, Menchaca e Rubianes 2004, Ustuner *et al.*, 2007 e Kukovics *et al.*, 2011). A melhor altura difere segundo o autor: 46 horas

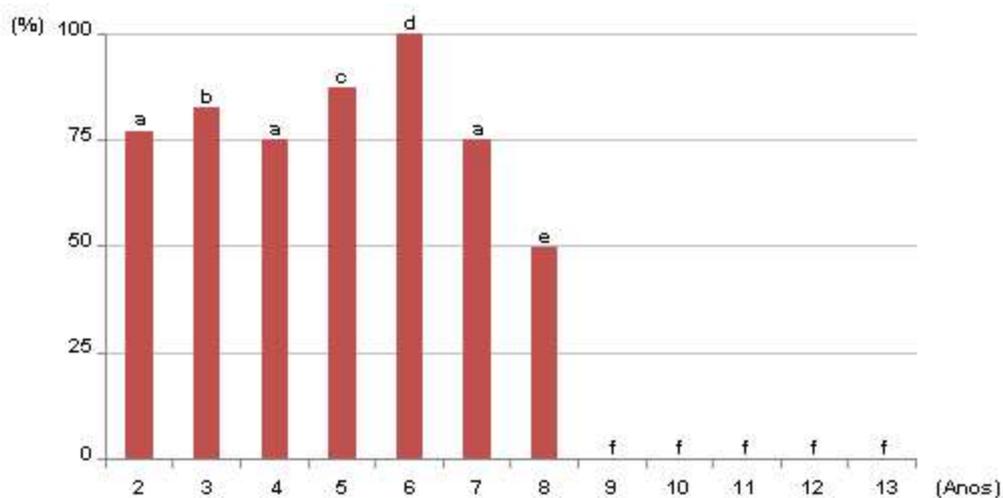
(Fernandez-Abella *et al.*, 2003 e Kukovics *et al.*, 2011), 48-72 horas (Karagiannidis *et al.*, 2001 e Kukovics *et al.*, 2011), 55 horas (Valentim *et al.*, 2009, Cortez, 2012, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018) e 58-63 horas (Donovan *et al.*, 2001, 2004 e Kukovics *et al.*, 2011). A escolha das 55 horas pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG parece ter sido adequada.

### 2.3 – RESPOSTA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Trinta e oito dias após a IA 74,5% das ovelhas Awassi x Sarda estavam gestantes. Neste trabalho, a taxa de fertilidade foi superior ou igual aos valores médios de fertilidade indicados na bibliografia para ovinos: 50-65% (Baril *et al.*, 1993, Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009) e 65-75% (Colas e Guérin, 1979; citados por Cognié, 1988). Na verdade, se fossem eliminados os resultados relativos às ovelhas com mais de 7 anos de idade, a taxa de fertilidade alcançada seria de 80,0%. Vários autores referem valores de fertilidade de 70-82% (Donovan *et al.*, 2001, 2004 e Kukovics *et al.*, 2011), de 76,5% (Fornazari *et al.*, 2018), de 82,2% (Hill *et al.*, 1998 e Ehling *et al.*, 2003 e Kukovics *et al.*, 2011), 84,1% (Conradi, 2018), 85,1% (Dendena, 2017) e de 80-90% (Kukovics *et al.*, 2011).

#### 2.3.1 – IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL

A idade afectou a taxa de fertilidade ( $P \leq 0,01$ ). Contudo, quando a comparação é feita entre ovelhas primíparas e ovelhas múltiparas este efeito desaparece (Primíparas: 79,3% vs. Múltiparas: 72,9%) ( $\chi^2 = 1,0$ ;  $P > 0,05$ ). Este resultado está certamente relacionado com a elevada heterogeneidade de idades das ovelhas múltiparas – 2-13 anos de idade (Figura 27). Segundo Forcada (2010), as ovelhas com idades superiores a 10 anos apresentam uma redução significativa das funções hipotalâmicas e hipofisárias. Os resultados observados no presente trabalho sugerem que esta redução surge nas ovelhas Awassi x Sarda mais cedo – 8-9 anos. Se só se tiverem em conta os resultados de fertilidade das ovelhas com até 7 anos de idade, as taxas de fertilidade das ovelhas primíparas e das ovelhas múltiparas seriam ainda mais próxima (Primíparas: 79,3% vs. Múltiparas: 80,0%) ( $\chi^2 = 0,0$ ;  $P > 0,05$ ). Anel *et al.* (2006) recomendam que, em programas de IA, não sejam utilizadas ovelhas com mais de 5 anos de idade. Os resultados encontrados no presente trabalho indicam que se deve evitar a inseminação de ovelhas Awassi x Sarda com mais de 7 anos de idade.



a=a, para  $P>0,05$ ; a**b** e b**c** para  $P\leq 0,05$ ; a**c** e b**d** para  $P\leq 0,01$ ; a**d**, a**e** e b**e** para  $P\leq 0,001$ ; a**f**, b**f**, c**f**, d**f** e e**f**, para  $P\leq 0,0001$ .

Figura 27. Variação da taxa de fertilidade em função da idade das ovelhas Awassi x Sarda.

Nem o peso nem a CC condicionaram a taxa de fertilidade ( $P>0,05$ ). Na verdade, apesar das fêmeas estarem em lactação, o regime alimentar praticado era equilibrado, como demonstra o valor da CC média (2,9 pontos). Segundo O’Brein (2002), Scaramuzzi e Martin (2008) e Karikari e Blasus (2009) a CC ideal, no momento da inseminação, deve situar-se entre 2,5-3,5 pontos. Palacios (2010) e Valentim *et al.* (2016b) propõem um intervalo ligeiramente mais elevado – 3,0-4,0 pontos.

### 2.3.2 – MELATONINA EXÓGENA

Em França, a administração de melatonina exógena melhora as taxas reprodutivas de fertilidade e de prolificidade (Valentim *et al.*, 2006 e Forcada, 2010). Em Espanha, os seus efeitos são evidentes essencialmente no que se refere à taxa de prolificidade (Forcada, 2010). A melhoria da taxa de fertilidade está associada à indução da actividade ovárica (Forcada, 2010). No presente trabalho o tratamento prévio com melatonina não influenciou a taxa de fertilidade (Controlo: 70,2% vs. Melatonina: 78,6%) ( $\chi^2 = 0,0$ ;  $P>0,05$ ). O mesmo foi encontrado por Conradi (2018). Possivelmente, todas as ovelhas estudadas já teriam entrado na estação reprodutiva. Contudo, há que ter presente que os efeitos de um bom regime alimentar podem camuflar os efeitos positivos da administração de melatonina exógena sobre as taxas reprodutivas (Valentim *et al.*, 2006 e Forcada, 2010). O mesmo sucede com os tratamentos progestagénicos + gonadotropinas (Valentim *et al.*, 2006).

### 2.3.3 – TIPO DE PROGESTAGÉNIO

O FGA e o MAP são igualmente eficácia na inibição temporária do ciclo éstrico (Ungerfeld e Rubianes, 2002, Zeleke *et al.*, 2005, Abecia *et al.*, 2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015), embora o FGA tenha o dobro da eficiência do MAP (Robinson, 1979 e Romano, 1996) e 25 vezes mais do que a da P<sub>4</sub> (Robinson, 1965 e Romano, 1996). Nos pequenos ruminantes, o FGA tem uma semivida mais curta do que o MAP (Romano, 1996). Neste sentido, alguns autores afirmam que o FGA promove um regresso mais rápido à actividade ovárica cíclica e ao cio (maior precisão e concentração) do que o MAP, ainda que não altere a duração do cio (Romano, 1996). Contudo, Ungerfeld e Rubianes (2002), Zeleke *et al.* (2005), Mateus (2014) e Afonso (2015) não encontraram qualquer diferença significativa na resposta reprodutiva de ovelhas tratadas com FGA e com MAP. No presente trabalho os resultados alcançados suportam os dados destes últimos autores, visto que, a taxa de fertilidade não variou em função do tipo de progestagénio usado (FGA: 72,3% vs. MAP: 81,5%) ( $\chi^2 = 2,1$ ;  $P > 0,05$ ).

#### **2.3.4 – DOSE DE ECG**

Durante a estação reprodutiva, a administração de eCG reduz o intervalo entre a remoção das esponjas vaginais e o cio e melhora a eficiência do tratamento de sincronização de cio e a taxa de ovulação (Ustener *et al.*, 2007). Por outro lado, a taxa de fertilidade pós-IA depende da quantidade de eCG administrada: 200 UI – 62,4%, 250 UI – 72,9%, 300 UI – 79,1% e 375 UI – > 69,4% (Hill *et al.*, 1998). Dendena (2017) utilizou uma dose de 500 UI e obteve uma taxa de fertilidade de 85,1% (ovelhas da raça Churra Galega Bragançana). Neste trabalho, a dose de 750 UI de eCG produziu uma taxa de fertilidade de 74,5%. Todavia, se só se tivessem em conta os resultados das ovelhas com até 7 anos de idade, a taxa de fertilidade atinja 80,0%. Conradi (2018) obteve um resultado muito semelhante com ovelhas da raça Churra Galega Bragançana (84,1%) e Fornazari *et al.* (2018) com ovelhas da raça Assaf (76,5%). Apesar de Gordon (1997) e Anel *et al.* (2006) afirmarem que existem diferenças raciais quanto à taxa de fertilidade pós-IA, os resultados encontrados no presente trabalho (ovelhas até 7 anos de idade) não diferem significativamente dos encontrados por Dendena (2017) e Fornazari *et al.* (2018). Os resultados encontrados confirmam que a idade condiciona a resposta das ovelhas à administração de eCG (Valentim *et al.*, 2015b), capaz de mascarar possíveis diferenças associadas à dose de eCG administrada.

#### **2.3.5 – NÚMERO DE PARTOS**

Nos pequenos ruminantes, o número de partos pode afectar o sucesso da IA (Lima, 2010 e Abecia *et al.*, 2016). Nos ovinos, o tipo de *Os* externo pode modificar-se com o parto, aumentando de tamanho (Kershaw *et al.*, 2005, Candappac e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011) e de complexidade (Kershaw *et al.*, 2005 e Anel *et al.*, 2006). Windsor *et al.* (1994), Buckrell *et al.* (1994), Milczewski *et al.* (2000) e Lima (2010) referem que as ovelhas múltiparas apresentam uma abertura cervical maior do que a das ovelhas nulíparas, o que facilita a introdução do pistolete de IA nas primeiras. Porém, Kaabi *et al.* (2006) afirmam que um cérvix mais complexo impede uma penetração mais profunda do pistolete, pelo que causam taxas de fertilidade pós-inseminação cervical mais baixas. No presente trabalho, 26,4% das ovelhas eram primíparas e as demais 73,6% eram múltiparas ( $\chi^2 = 46,1$ ;  $P \leq 0,001$ ). Todavia, a diferença de fertilidade entre estes dois grupos de ovelhas revelou-se estatisticamente não significativa (Primíparas: 79,3% vs. Múltiparas: 72,8%) ( $\chi^2 = 1,0$ ;  $P > 0,05$ ).

### **2.3.6 – CARNEIRO**

Nos ovinos de leite, os machos reprodutores influenciam a taxa de fertilidade pós-IA (Campbell *et al.*, 1996 e Anel *et al.*, 2005, 2006). Neste trabalho foram usados como dadores de sémen dois carneiros. A taxa de fertilidade das ovelhas variou em função do carneiro dador de sémen (Carneiro 501: 82,3% vs. Carneiro 627: 66,0%) ( $\chi^2 = 6,7$ ;  $P \leq 0,01$ ). Neste caso, é possível que esta variação esteja associada à diferença de idade dos machos dadores – o carneiro 627 tinha 1 ano e o carneiro 501 tinha 2 anos de idade. A produção quantitativa e qualitativa de sémen varia com a idade (Aisen e Venturino, 2004), que condiciona o tamanho das reservas epididimais de espermatozóides e a sua qualidade (Sorenson Jr, 1977, Baril *et al.*, 1993 e Gordon, 1997).

### **2.3.7 – MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN**

De um modo geral, as taxas de fertilidade são mais altas após inseminação com sémen fresco do que com sémen refrigerado (Gergatz e Gyoker, 1997, Fernandez-Abella *et al.*, 2003, Aral *et al.*, 2011 e Kukovics *et al.*, 2011). Pelo contrário, Dendena (2017) obteve uma taxa de fertilidade superior entre as fêmeas inseminadas com sémen refrigerado do que com sémen fresco (Fresco: 79,4% vs. Refrigerado: 90,9%). Por seu turno, Fornazari *et al.* (2018) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de fertilidade pós-IA com sémen fresco ou com sémen refrigerado (Fresco: 81,3% vs. Refrigerado: 72,2%). No presente

trabalho a taxa de fertilidade também não variou significativamente em função da técnica de preservação do sémen utilizada (Fresco: 78,6% vs. Refrigerado: 70,4%) ( $\chi^2 = 2,1$ ;  $P > 0,05$ ).

### **2.3.8 – DILUIDOR SEMINAL**

O tipo de diluidor seminal condiciona a viabilidade dos espermatozóides conservados, dependendo das suas propriedades osmóticas, tampão e de protecção antibacterianas e antifúngicas e contra o choque térmico (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, O'Meara *et al.*, 2007, Cebrián *et al.*, 2010b, Bernardini *et al.*, 2011, Morrell, 2011, Amidi *et al.*, 2016, Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Arando *et al.*, 2017). No presente trabalho, o tipo de diluidor seminal não afectou significativamente a taxa de fertilidade (Andromed<sup>®</sup>: 72,4% vs. OviXcell<sup>®</sup>: 76,9%) ( $\chi^2 = 0,7$ ;  $P > 0,05$ ). Fornazari *et al.* (2018) obteve resultados semelhantes (Andromed<sup>®</sup>: 77,8% vs. OviXcell<sup>®</sup>: 75,0%). Dendena (2017) também não encontrou diferenças significativas nas taxas de fertilidade associadas ao tipo de diluidor seminal utilizado (Andromed<sup>®</sup>: 83,9% vs. INRA 96<sup>®</sup>: 83,3%).

Ainda que o Andromed<sup>®</sup> (com glicerol) tendo sido desenvolvido para preservar sémen de bovino e o OviXcell<sup>®</sup> (sem glicerol) para preservar sémen de ovino, os efeitos de ambos sobre a fertilidade do sémen diluído de carneiros Assaf foram iguais. Se por um lado, o glicerol tem efeitos tóxicos sobre os espermatozóides (Watson, 1992 e Watson, 1995) e fragiliza a sua membrana plasmática (Curry *et al.*, 1995, Watson, 1995 e Seifi-Jamadi *et al.*, 2017), por outro, durante o processo de refrigeração, ele protege os espermatozóides do choque térmico (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006 e Forouzanfar *et al.*, 2010). De acordo com os resultados alcançados, os possíveis efeitos deletérios do glicerol sobre os espermatozóides não foram detectáveis. Porém, é possível que os seus efeitos protectores tenham contribuído para que a taxa de fertilidade do sémen refrigerado tenha sido igual à do sémen fresco. Todavia o choque térmico pode ter sido prevenido apenas porque se aplicou uma taxa regular de refrigeração do sémen diluído (Baril *et al.*, 1993, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b e Anel *et al.*, 2006).

### **2.3.9 – Os EXTERNO**

No presente trabalho foram encontrados todos os tipos de Os externo da Tabela de Kershaw *et al.* (2005) (Quadro V). O mesmo sucedeu no trabalho desenvolvido por Conradi *et al.* (2017), Dendena (2017), Conradi (2018) e Fornazari *et al.* (2018). No presente trabalho, a distribuição percentual foi relativamente uniforme.

A distribuição percentual encontrada por Dendena (2017) e Conradi (2018), em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana, por Conradi *et al.* (2017), em ovelhas Lacaune e por Fornazari *et al.* (2018), em ovelhas da raça Assaf, foi diferente e reflecte possíveis diferenças genéticas, de idade e do número de partos (Kershaw *et al.*, 2005 e Aral *et al.*, 2011). No presente trabalho, o tipo de *Os* externo exerceu uma influência pouco significativa sobre a taxa de fertilidade (Quadro V). A que produziu uma taxa de fertilidade mais elevada foi o tipo aba (83,3%). A papila resultou em um valor intermédio (77,7%). O bico de pato (70,8%), a rosa (69,0%) e a fenda (76,5%) produziram as taxas de fertilidade mais baixas. Fornazari *et al.* (2018) encontraram uma taxa de fertilidade mais baixa entre as ovelhas com um *Os* externo do tipo aba (mais reduzida). Conradi *et al.* (2017) registaram a taxa de fertilidade mais baixa entre as ovelhas com um *Os* externo do tipo Fenda. Pelo contrário, Conradi (2018) verificou que a taxa de fertilidade mais elevada estava associada ao *Os* externo do tipo Fenda. Dendena (2017) refere que as melhores taxas de fertilidade foram encontradas nos tipos papila e fenda.

Quadro V. Configuração anatómica da entrada no canal cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

<i>Os</i> externo	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Bico de Pato	21,8% <sup>a</sup> (24/110)	70,8% <sup>x</sup> (17/24)
Aba	16,4% <sup>a</sup> (18/110)	83,3% <sup>y</sup> (15/18)
Rosa	26,4% <sup>a</sup> (29/110)	69,0% <sup>x</sup> (20/29)
Papila	20,0% <sup>a</sup> (22/110)	77,7% <sup>x,y</sup> (17/22)
Fenda	15,5% <sup>a</sup> (17/110)	76,5% <sup>x</sup> (13/17)

a=a, para P>0,05; x=x, para P>0,05, x≠y, para P≤0,05 (entre linhas, mesmo parâmetro).

### 2.3.10 – COR DA MUCOSA E LUBRIFICAÇÃO

Todas as ovelhas Awassi x Sarda apresentavam uma mucosa vaginal cor rosa (100,0%). Fornazari *et al.* (2018) obtiveram resultados iguais. Conradi *et al.* (2017) e Dendena (2017) encontraram maioritariamente uma mucosa vaginal de cor rosa.

Fonseca *et al.* (2017) acreditam que o aspecto macroscópico das secreções vaginais pode ser usado na estimativa do momento da fase folicular em que a fêmea se encontra. Estas são mais cristalinas e mais abundantes quando o ovário é “dominado” por folículos antrais de grandes dimensões (Fonseca *et al.*, 2017). Quando da ovulação, as secreções vaginais são fundamentalmente estriadas/caseosas (Fonseca *et al.*, 2017). No presente estudo, 97,3% das ovelhas estudadas apresentaram uma boa lubrificação (estriada ou estriada/caseosa) e 2,7% uma lubrificação abundante (cristalina ou cristalina/estriada) ( $\chi^2 = 176,7$ ; P≤0,001). O tipo de lubrificação não afectou significativamente a taxa de fertilidade (Boa: 74,8% vs. Abundante:

66,7%) ( $\chi^2 = 1,6$ ;  $P > 0,05$ ). O mesmo foi referido por Fornazari *et al.* (2018). Pelo contrário, Conradi *et al.* (2017) e Dendena (2017) observaram melhores taxas de fertilidade quando a lubrificação vaginal era líquida e abundante (cristalina ou cristalina/estriada).

### **2.3.11 – VISCOSIDADE DAS SECREÇÕES CERVICAIS**

O transporte do espermatozóide no tracto genital feminino é condicionado pela qualidade do muco cervical (Santolaria *et al.*, 2011). Fonseca *et al.* (2017) acreditam mesmo que o aspecto macroscópico do muco cervical pode ser utilizado na determinação do momento ideal para proceder à IA. Este varia de cristalino a caseoso entre o início e o fim do cio (Siqueira *et al.*, 2009 e Fonseca *et al.*, 2017). Todas as ovelhas estudadas ostentavam um muco cervical de reduzida viscosidade (cristalina ou cristalina/estriada). Na verdade, este tipo de secreções facilita a entrada e a progressão dos espermatozóides no canal cervical (McKusick *et al.*, 1998 e El-Shahat e Alsafy, 2009). Os resultados encontrados relacionam-se, certamente, com os tratamentos aplicados e o momento em que se procedeu à IA e mostram que as ovelhas estavam bem alimentadas, saudáveis e no período de cio. Conradi (2018) e Fornazari *et al.* (2018) obtiveram resultados muito semelhantes.

### **2.3.12 – LOCAL DE DEPOSIÇÃO DE SÉMEN**

Na inseminação cervical, a taxa de fertilidade é maior quanto mais profundamente for deixado o sémen (Steyn, 2003, Ferra e Sereno, 2006, Fonseca *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d), desde que não se force a passagem pelo canal cervical (Steyn, 2003, Aisen, 2004a, Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d). De acordo com Kaabi *et al.* (2006), as raças espanholas com menores taxas de fertilidade (Assaf e Churra) têm um cérvix complexo, incompatível com uma penetração profunda. No presente trabalho, o sémen foi depositado maioritariamente após a 1ª prega (Quadro VI). As deposições mais profundas (2ª e 3ª pregas) ocorreram na mesma percentagem de ovelhas que foram inseminadas vaginalmente. Contudo, a melhor taxa de fertilidade verificou-se nas inseminações cervicais profunda e a pior nas vaginais. No estudo de Fornazari *et al.* (2018), o sémen foi depositado na vagina ou depois da 1ª prega. Enquanto as inseminações vaginais resultaram numa taxa de fertilidade de 0,0%, as realizadas depois da 1ª prega produziram uma taxa de fertilidade de 78,8%. Resultados semelhantes foram observados por Conradi (2018). Por seu turno, Conradi *et al.* (2017) verificaram que as inseminações cervicais mais profunda (2ª prega cervical) resultaram em melhores taxas de fertilidade. Pelo contrário, Dendena (2017) registou as piores

taxas de fertilidade nas inseminações mais profundas (2ª prega). A inseminação vaginal produziu uma taxa de fertilidade igual à inseminação cervical pós-1ª prega (Dendena, 2017).

Quadro VI. Local da deposição do sémen (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Local deposição do sémen	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Vaginal	3,6% <sup>a</sup> (4/110)	25,0% <sup>x</sup> (1/4)
1ª prega	92,7% <sup>b</sup> (102/110)	75,0% <sup>y</sup> (77/102)
2ª prega	2,7% <sup>a</sup> (3/110)	100,0% <sup>z</sup> (3/3)
3ª prega	0,9% <sup>a</sup> (1/110)	100,0% <sup>z</sup> (1/1)

a=a, para P>0,05, a≠b, para P≤0,001; z=z, para P>0,05, x≠y, x≠z e y≠z, para P≤0,001 (entre linhas, mesmo parâmetro).

### 2.3.13 – REFLUXO VAGINAL

As ovelhas que produzem refluxo cervical apresentam taxas de fertilidade mais baixas (Palacios, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011, Morrell, 2011 e Dendena, 2017). O refluxo cervical deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018), particularmente quando este é abundante (Palacios, 2010 e Dendena, 2017).

No presente trabalho, a maioria das ovelhas inseminadas cervicalmente não fez refluxo (Quadro VII). Todavia a melhor taxa de fertilidade verificou-se entre as ovelhas que apresentaram um ligeiro refluxo cervical (Ligeiro: 90,0% vs. Sem: 73,3%) ( $\chi^2 = 9,6$ ; P≤0,01). O mesmo foi observado por Dendena (2017). Por seu turno, Conradi *et al.* (2017) e Conradi (2018) não conseguiram estabelecer qualquer relação estatisticamente significativa entre a taxa de fertilidade e o refluxo cervical.

Quadro VII. Refluxo cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Refluxo Seminal	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Sem	81,1% <sup>a</sup> (86/106)	73,3% <sup>x</sup> (63/86)
Ligeiro	18,9% <sup>b</sup> (20/106)	90,0% <sup>y</sup> (18/20)

a≠b, para P≤0,001; x≠y para P≤0,01 (entre linhas, mesmo parâmetro).



### 3 – CONCLUSÕES

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

- Na segunda quinzena de Maio, todas as ovelhas Awassi x Sarda estavam cíclicas.
- Ambos os tratamentos progestagénios curtos (FGA e MAP) + eCG foram 100,0% eficazes.
- A administração prévia de melatonina não afectou a percentagem de ovelhas que ovularam em resposta aos tratamentos progestagénicos + eCG.
- O FGA e o MAP foram igualmente eficazes na sincronização do momento de formação do primeiro CL.
- Trinta e oito dias após a IA, 74,5% das ovelhas Awassi x Sarda estavam gestantes.
- A taxa de fertilidade foi significativamente influenciada pela idade das ovelhas, pelo carneiro dador de sémen (Carneiro 501: 82,3% vs. Carneiro 627: 66,0%), pelo tipo de Os externo, pelo local de deposição do sémen (Vaginal: 25,0% vs. 1ª prega: 75,0% vs. 2ª prega: 100,0% vs. 3ª prega: 100,0%) e pelo refluxo cervical (Sem: 73,0% vs. Ligeiro: 90,0%).
- A taxa de fertilidade não foi significativamente alterada pelo tratamento prévio com melatonina (Controlo: 70,2% vs. Melatonina: 78,6%), o tipo de progestagénio (FGA: 72,3% vs. MAP: 81,5%) pelo número de partos (Primíparas: 79,3% vs. Multíparas: 72,8%), pelo método de preservação do sémen (Fresco: 78,6% vs. Refrigerado: 70,4%), pelo tipo de diluidor (Andromed<sup>®</sup>: 72,4% vs. OviXcell<sup>®</sup>: 76,9%), pela cor da mucosa vaginal (Rosa: 100%), pelo grau de lubrificação (Boa: 74,8% vs. Abundante: 66,7%) e pela viscosidade das secreções cervicais (líquida: 100%).



### III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, A.M., 2010. El morueco. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Abecia, J.A., Arrébola, F., Macías, A., Laviña, A., González-Casquet, O., Benítez, F. e Palacios, C., 2016. Temperature and rainfall are related to fertility rate after spring artificial insemination in small ruminants. *International Journal of Biometeorology*, **60**, 1603-1609.
- Abecia, J.A., Forcada, F. e González-Bulnes, A., 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**, 173-179.
- Abecia, J.-A., Forcada, F., Valares, J.-A., Zúñiga, O. e Kindahl, H., 2003. Effect of exogenous melatonin on in vivo and in vitro prostaglandin secretion in Rasa Aragonesa ewes. *Theriogenology*, **60**, 1345-1355.
- Abecia, J.A., Máñez, J., Macias, A., Laviña, A. e Palacios, C., 2017. Climate zone influences the effect of temperature on the day of artificial insemination on fertility in two Iberian sheep breeds. *Journal of Animal Behavior Biometeorology*, **5**, 124-131.
- Afonso, F.M.T., 2015. Antecipação da Estação Reprodutiva em Ovelhas da Raça Churra Galega Bragança. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Aisen, E.G. e Venturino, A., 2004. Recolección e evaluación del semen. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 5, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp.
- Aisen, E.G., 2004a. Procesamiento y conservación del material seminal. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 6, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Aisen, E.G., 2004b. Inseminación artificial de ovejas y cabras. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 8, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Alhamada, M., Debus, N., Lurette, A. e Bocquier, F., 2017. Automatic oestrus detection system enables monitoring of sexualbehaviour in sheep. *Small Ruminant Research*, **149**, 105-111.
- Alila-Johansson, A., Eriksson, L., Soveri, T. e Laakso, M.-L., 2001. Seasonal variation in endogenous serum melatonin profiles in goats: a difference between spring and fall? *Journal of Biology Rhythms*, **16** (2), 254-263.

- Amidi, F., Pazhohan, Maryam, A., Nashtaei, S., Khodarahmian, M. e Nekoonam, S., 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: A review. *Cell Tissue Bank*, **17**, 745-756.
- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E. e de Paz., P., 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction Domestic Animal*, **41** (Suppl 2), 30-42.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., de la Fuente, L.F. e de Paz., P., 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay. *Theriogenology*, **63**, 1235-1247.
- Aral, F., Temamoğullari, F. e Aral, S.S., 2011. Mechanical and pharmacologic applications of artificial insemination in ewes. *In: Veterinary medicine and science*. M. Manafi (Ed), Cap 14, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp.
- Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B. e Bellin, M.E., 2004. Inseminação artificial. *In: Reprodução animal*. E.S.E. Hafez e B. Hafez (Eds), 7ª edição, Manole Editor, São Paulo, Brasil, 531 pp.
- Azevedo, J.M., Valentim, R.C. e Correia, T.M., 2006. Controlo hormonal da actividade ovárica em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, **2** (6), 4-8.
- Baird, D.T., Campbell, B.K., Mann, G.E. e McNeilly, A.S., 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, **43** (Suppl), 125-138.
- Banday, M.N., Lone, F.A., Rasool, F., Rashid, M. e Shikari, A., 2017. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*, **74**, 25-30.
- Baril, G., Chemineau, P., Cognié, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P. e Vallet, J.-C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. *In: Étude FAO Production et Santé Animales*, Roma, Itália, 193 pp..
- Barrett, D.M.W., Bartlewski, P.M., Batista-Arteaga, M., Symington, A. e Rawlings, N.C., 2004. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, **61** (2), 311-327.
- Bartlewski, P.M., Alexander, B.D. e King, W.A., 2008. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. *Small Ruminant Research*, **75**, 210-216.

- Bartlewski, P.M., Baby, T.E. e Giffin, J.L., 2011. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, **124**, 259-268.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P. e Rawlings, N.C., 1999b. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, **52**, 115-130.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A. e Rawlings, N.C., 1999. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *Journal of Reproduction and Fertility*, **115**, 111-124.
- Beccavin, C., Malpoux, B. e Tillet, Y., 1998. Effect of estradiol and photoperiod on TH mRNA concentrations in A15 e A12 dopamine cell groups in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology*, **10**, 59-66.
- Bernardini, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Fornés, M.W., Alberio, R.H. e Cesari, A., 2011. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*, **76**, 436-447.
- Bettencourt, E.M.V., 1999. Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 106 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Maia, M.S., Sousa, D.B. e Rodello, L., 2005. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Science Veterinary*, **33**, 127-130.
- Bicudo, S.D., Sousa, D. e Takada, L., 2003. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **27** (2), 120-127.
- Binkley, S.A., 1995. Endocrinology. Harper Collins College Publishers, Nova Iorque, EUA, 539 pp..
- Bister, J.L. e Paquay, R., 1983. Fluctuations in the plasma levels of folliclestimulating hormone during estrous cycle, anestrus, gestation and lactation: evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, **19**, 565-582.
- Bister, J.L., Noel, B., Perrad, B., Mandiki, S.N., Mbayahaga, J. e Paquay, R., 1999. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*, **17**, 315-328.
- Bittman, E.L., Kaynard, A.H., Olster, D.H., Robinson, J.E., Yellon, A.M. e Karsch, F.J., 1985. Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology*, **40**, 409-418.

- Blache, D., Maloney, S.K. e Revell, D.K., 2008. Use and limitations of alternative feed resources to sustain and improve reproductive performance in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology*, **147**, 140-157.
- Bromfield, J.J., 2016. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction*, **152**, R223-R232.
- Buckrell, B.C., Buschbeck, C., Gartley, C.J., Kroetsch, T., McCutcheon, W., Martin, J., Penner, W.K. e Walton, J.S., 1994. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, **42**, 601-611.
- Buckrell, B.C., Halbert, G.W., Gartley, C.J. e Bretzlaff, K.N., 1991. Artificial insemination of small ruminants. *Theriogenology*, **10**, 87-91.
- Bukar, M.M., Yusoff, R., Haron, A.W., Dhaliwal, G.K., Khan, M.A.G e Omar, M.A., 2012. Estrus response and follicular development in Boer does synchronized with flugestone acetate and PGF<sub>2α</sub> or their combination with eCG or FSH. *Tropical Animal Health Production*, **44**, 1505-1511.
- Campbell, J.A., Harvey, T.G., McDonald, M.F. e Sparksman, R.I., 1996. Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, **45**, 1535-1544.
- Candappa, I.B.R. e Bartlewski, P.M., 2011. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *Open Reproduction Science Journal*, **3**, 162-175.
- Cebrián, J.A.P., Muiño, M.T.B., Pérez, R.P. e Casao, A.G., 2010a. Obtención del semen. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Cebrián, J.A.P., Muiño, M.T.B., Pérez, R.P. e Casao, A.G., 2010b. Evaluación del semen. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Cebrián, J.A.P., Muiño, M.T.B., Pérez, R.P. e Casao, A.G., 2010b. Manejo e conservación del semen. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - A review. *Livestock Production Science*, **17**, 135-147.

- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiéry, J.C., Pellicer-Rubio, M.T. e Malpoux, B., 2008. Seasonality of reproduction in mammals: Intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reproduction in Domestic Animals*, **43** (Suppl. 2), 40-47.
- Chemineau, P., Malpoux B., Guž Rin, Y., Maurice, F., Daveau, A. e Pelletier, J., 1992. Lumière et mélatonine pour la maitrisé de la reproduction des ovins et des caprins. *Annales de Zootechnie*, **41**, 247-261.
- Chemineau, P., Malpoux, B., Pelletier, J., Lebouf, B., Delgadillo, J.A., Deletang, F., Pobel, T. e Brice, G., 1996. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Producción Animales*, **9** (1), 45-60.
- Clifford, G., 2017. Ram go for your flock of sheep. The new, successful, non-surgical sheep artificial insemination. <http://countrysidenetwork.com/topics/livestock-topics/sheep-livestock-topics/ramgo/> (9 de Outubro de 2017)
- Cognié, Y., 1988. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *INRA Producción Animales*, **1** (2), 83-92.
- Conradi, A., 2018. Sincronização da actividade ovárica e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Efeitos da administração de melatonina exógena, de um tratamento progestagénico curto + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação do sémen. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 77 pp.. (Tese de *Mestrado*)
- Conradi, A., Correia, T., Mateus, Ó., Quintas, H., Maurício, R., Francisco, L., Fornazari, R., Pereira, F., Álvaro, A. e Valentim, R., 2017. Controlo reprodutivo e inseminação artificial com sémen refrigerado em ovelhas da raça Lacaune. *In: II Congresso Nacional de Escolas Superiores Agrárias*, Escola Superior Agrária de Elvas, Elvas, Portugal, 227-228.
- Contreras-Solis, I., Gomez-Brunet, A., Encinas, T., Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J. e Lopez-Sebastian, A., 2008. Influence of vehicle on kinetics of exogenous progesterone administered either by subcutaneous and intramuscular routes to sheep. *Research in Veterinary Science*, **85** (1), 162-165.
- Contreras-Villarreal, V., Meza-Herrera, C.A., Rivas-Muñoz, R., Angel-Garcia, O., Luna-Orozco, J.R., Carrillo, E., Mellados M. e Véliz-Deras, F.G., 2016. Reproductive performance of seasonally anovular mixed bred dairy goats induced to ovulate with a combination of progesterone and eCG or estradiol. *Animal Science Journal*, **87**, 750-755.

- Correia, T., Azevedo, J., Mendonça, A., Fontes, P., Galvão, L., Cardoso, M., Velasco, H., Maurício, R. and Valentim, R., 2010. Effects of PGF<sub>2α</sub> administration at the onset or the end of a short-term progestagen treatment in Serrana goats. *Reproduction in Domestic Animals*, **45** (Suppl 3), 83.
- Correia, T.M.M.A.A., 1996. Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana. Centro Internacional de Altos Estudos Agronómico Mediterrânico/Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (CIHEAM-IAMZ), Saragoça, Espanha, 84 pp.. (*Master Thesis*)
- Cortez, M.F.C.A., 2012. Antecipação da estação reprodutiva em caprinos. Inseminação artificial. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 46 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Cortez, M.F.C.A., 2012. Antecipação da estação reprodutiva em caprinos. Inseminação artificial. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 46 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Costa, R.L.D. da, 2007. Aspectos reprodutivos das ovelhas. *Pesquisa & Tecnologia*, **4** (1), 12.
- Cseh, S., Faigl, V. e Amiridis, G.S., 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**, 187-192.
- Curry, M., Redding, B. e Watson, P., 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa, *Cryobiology*, **32**, 175-181.
- David, I., Kohnke, P., Lagriffoul, G., Praud, O., Plouarboué, F., Degond, P. e Druart, X., 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, **161**, 75-81.
- Dayan, M.O., Beşoluk, K., Eken, E. e Ozkadif, S., 2010. Anatomy of the cervical canal in the Angora goat (*Capra hircus*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **16** (5), 847-850.
- Dendena, M.W., 2017. Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 52 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Dobson, H., e Smith, R.F., 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, 60-61, 743-752.
- Domínguez, M.P. Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A. e Alberio, R.H., 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, **69**, 564-573.

- Donovan A, Hanrahan, J.P., Kummer, E., Duffy, P. e Boland, M.P., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, **84** (3-4), 359-368.
- Donovan, A., Hanrahan, J.P., Lally, T., Boland, M.P., Lonergan, G.P. e O'Neil, D.J., 2001. AI for sheep using frozen-thawed semen. ARMIS 4047 Project Report, Under the Research Stimulus Fund; OPARDF Measure 5b.
- Driancourt, M.A., 2012. Chronogest CR and Folligon. [http://www.merck-animal-health.com/binaries/Chronogest\\_and\\_Folligon-tcm50-262063.ppt](http://www.merck-animal-health.com/binaries/Chronogest_and_Folligon-tcm50-262063.ppt)
- Driancourt, M.A., Fry, R.C., Clarke, I.J. e Cahill, L.P., 1987. Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, **79**, 635-641.
- Drion, P.V., Furtoss, V., Baril, G., Manfredi, E., Bouvier, F., Pougard, J.L., Bernelas, D., Caugnon, P., McNamara, E.M., Remy, B., Sulon, J., Beckers, J.F., Bodin, L. e Lebouf, B., 2001. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: Effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reproduction Nutrition Development*, **41**, 401-412.
- Duarte, G., Flores, J.A., Malpaux, B. e Delgadillo, J.A., 2008. Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domestic Animal Endocrinology*, **35**, 362-370.
- Dunn, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**, 52-64.
- Ehling, C., Wirth, P., Schindler, L., Hadeler, K.-G., Döpke, H.-H., Lemme, E., Herrmann, D. e Niemann, H., 2003. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen-thawed semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*, **60**, 777-787.
- El-Alamy, M.A., Foote, R.H. e Hare, E., 2001. Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long-and short-day lighting. *Theriogenology*, **58**, 839-854.
- El-Maaty, A.M.A. e El-Gawad, M.H.A., 2014. Follicle growth, ovulation rate, body weight change, and antioxidant and metabolic status in three fat-tailed sheep breeds fed a half-maintenance diet. *Open Access Animal Physiology*, **6**, 21-31.

- El-Shahat, K.H.M. e Alsafy A.M., 2009. The anatomical structures of sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating catheter into the uterine lumen. *Veterinary Medicine Journal of Giza*, **57** (2), 211-222.
- Evans, A.C., 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, **78**, 289-306.
- Evans, G. e Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth, Sydney, Austrália, 194 pp..
- Fernandez-Abella, D., Becu-Villalobo S.D., Lacau-Mengido, I.M., Villegas, N. e Bentancur, O., 1999. Sperm production, testicular size, serum gonadotrophins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds. *Reproduction Nutrition Development*, **39** (5-6), 617-624.
- Fernandez-Abella, D., Preve, M.O. e Villegas, N., 2003. Insemination time and diluting rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*, **60**, 21-26.
- Ferra, J.C e Sereno, J.R.B., 2006. Inseminação artificial em ovinos. EMBRAPA Cerrados, Planaltina, Goiás, Brasil, 26 pp..
- Filho, J.A.A., 2006. Aspectos zoológicos do caprino e do ovino nas regiões semiáridas. Documentos 61, Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, Brasil, 28 pp.
- Fitzgerald, J.A. e Stellflug, J.N., 1991. Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *Journal of Animal Science*, **69**, 264-275.
- Folch, J.P., 1983. Estacionalidad sexual del morueco. Influencia de la época de nacimiento. *In: Simposio sobre Reproducción de ovinos y Bovinos de Carne. Estado actual y posibilidades de aplicar a la reproducción las técnicas de manejo y de selección, Colección Monografías INIA, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Espanha*, **42**, 177-206.
- Fonseca J.F. da e Souza, J.M.G. de, 2011. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos. *In: Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte - 5º SINCORTE, João Pessoa, Paraíba, Brasil*, 1-21.
- Fonseca, J.F. da, Cruz, R.C., Oliveira, M.E.F., Souza, J.M.G. de e Ferreira, M.I.C., 2012. Técnicas aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Zootecnia*, **22**, Cuiabá, Brasil, 13 p. (1 CD-Rom)

- Fonseca, J.F. da, Cruz, R.C., Pinto P. H.N. e Facó, O., 2010. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. *In: I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia, BA-UESC, Ilhéus, Bahia, Brasil*, 1-30.
- Fonseca, J.F., 2005. Estratégias para o controlo do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, Goiânia, Brasil, 1-9.
- Forcada, F., Abecia, J.A. e Zuñiga, O., 2001. Efecto de la melatonina sobre la secreción de progesterona in vivo y el desarrollo embrionario *in vitro*. *Producción Ovina y Caprina*, **XXVI**, 1010-1015.
- Forcada, F., 2010. Control de la actividad reproductiva mediante el tratamiento con melatonina. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Fornazari, R., Mateus, Ó., Correia, T., Quintas, H., Maurício, R., Conradi, A., Francisco, L., Álvaro, A. and Valentim, R., 2018. Estrus synchronization and artificial insemination with fresh and chilled semen in Assaf ewes. *Agricultural Sciences*, **9** (1), 8-22.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R. e Nasr-Esfahani, M.H., 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **73**, 480-487.
- Freitas, V.J. de F. e Rubianes, E., 2004. Preparación de las hembras. Detección e control del estro y de la ovulación. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 7, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Garcia, A.J.D., Landete, T.C. e Gallego, L.M., 2004. Manejo reproductivo para la producción de carne y leche. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 4, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Gates, P.J., Hemningsson, T., Tengroth e Forsberg, M., 1998. Effects of melatonin, progestagens, and the ram on out-of-season reproduction in Swedish Landrace Finewool sheep. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **39**, 499-510.
- Gergátz, E. e Gyökér, E., 1997. Cervico-uterinal insemination method with cooled and deep frozen ram semen. *In: 48<sup>th</sup> Annual Meeting of EAAP, Book of Abstract*, Vienna, Aústria, 319-325.

- Goldman, B.D., 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biology Rhythms*, **16** (4), 283-301.
- Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R. e Freitas, V.J.F., 2001. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Livraria Varela, São Paulo, Brasil, 340 pp..
- Gonzálvez-Bulnes, A., Vázquez, M.I. e Pallarés, P., 2010. Métodos de control del ciclo sexual. Progestagenos y prostaglandinas. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Goodman, R.L. e Karsch, F.J., 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone. Differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*, **107**, 1286-1292.
- Goodman, R.L., 1988. Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. *In: The physiology of reproduction*. E. Knobil e J.D. Neil (Eds), Raven Press, Nova Iorque, EUA, 1929-1969.
- Gordon, I., 1997. Controlled reproduction in sheep & goats. *Controlled Reproduction in Farm Animals Series*, Vol. 2, CAB International, Cambridge, Reino Unido, 450 pp..
- Granados, L.B.C., Dias, A.J.B. e Sales, M.P., 2006. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. *In: Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em reprodução de caprinos e ovinos*, Rio de Janeiro, Brasil, 54 pp.
- Greyling, J.P.C., Erasmus, J.A., Taylor, G.J. e Van der Merwe S., 1997. Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Ruminant Research*, **26**, 137-143.
- Hafez, E.S.E. e Hafez, B., 2004. Ciclos Reprodutivos. *In: Reprodução animal*. E.S.E. Hafez e B. Hafez (Eds), 7ª Edição, Editora Manole, Barueri, Brasil, 531 pp..
- Hafez, E.S.E., 1987. Reproductive cycles. *In: Reproduction in farm animals*. E.S.E. Hafez (Ed), 5ª Edição, Lea & Febiger, Filadélfia, EUA, 649 pp..
- Halbert, G.W., Dobson, H. e Walton, J.S., 1990. The structure of cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, **33**, 977-992.
- Hansen, P.J., 1985. Photoperiodic regulation of reproduction in mammals breeding during long days versus mammals breeding during short days. *Animal Reproduction Science*, **9**, 301-315.

- Haresign, W., 1993. New techniques for reducing seasonal breeding in males and females. *In*: 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Aarhus, Dinamarca.
- Hileman, S.M., Kuehl, D.E. e Jackson, G.L., 1998. Photoperiod affects the ability of testosterone to alter proopiomelanocortin mRNA, but not luteinizing hormone-releasing hormone mRNA, levels in male sheep. *Journal of Neuroendocrinology*, **10**, 587-592.
- Hill, J.R., Thomson, J.A. e Perkins, N.R., 1998. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: A survey. *Theriogenology*, **49**, 697-709.
- Holtz, W., Sohnrey, B., Gerland, M., Driancourt, M.-A., 2008. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. *Theriogenology*, **69**, 785-792.
- Hugo, H.M. e Chemineau, P., 2004. Características anatómicas e funcionales del sistema reproductor de la hembra. *In*: Reproducción Ovina y Caprina, E.G. Aisen (Ed), Cap. 2, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp.
- Hunter, M.G., 1991. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility*, **43** (Suppl), 91-99.
- Hyde, N., 1988. Wool fabric of history. *National Geographic Magazine*, **173** (5), 552-583 pp..
- Jackson, C.G. Neville, T.L., Mercadante, V.R.G., Waters, K.M., Lamb, G.C., Dahlen, C.R. e Redden, R.R., 2014. Efficacy of various five-day estrous synchronization protocols in sheep. *Small Ruminant Research*, **120**, 100-107.
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J.J. e Soler, A.J., 2015. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, **71**, 85-90.
- Jiménez-Rabadán, P., Morrell, J.M., Johannisson, A., Ramona, M., Garcia-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Alvaro-Garcia, P.J., Perez-Guzman, M.D., Fernandez-Santos, M.R., Garde, J.J., Soler, A.J., 2012b. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtiberica buck semen. *Animal Reproduction Science*, **136**, 47-54.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., del Olmo, E., Pérez-Guzmán, M.D., Bisbal, A., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J. e Soler A.J.,

- 2012a. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*, **132**, 88-95.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A.J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M.R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M.D. e Garde, J.J., 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **167**, 103-108.
- Johnson, L., Ing, N.H., Welsh, T.H., Varner, D.D., Scrutchfield, W.L. e Martin, M.T., 2001. Efficiency of spermatogenesis in animals and humans. *In: ASAS National Meeting*, **80 E** (Suppl 2), 1-47.
- Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C.A., Boixo, J.C., de Paz, P. e Anel, L., 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*, **66**, 1876-1883.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Alexopoulos, C. e Amarantidis, I., 2000. Seasonal variations in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. *Small Ruminant Research*, **37**, 125-130.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G. e Brozos, C., 2001. Effect of time of artificial insemination on fertility of progestagen and PMSG treated indigenous Greek ewes, during non-breeding season, *Small Ruminant Research*, **39**, 67-71.
- Karikari, P.K. e Blasu, E.Y., 2009. Influence of nutritional flushing prior to mating on the performance of West African Dwarf goats mated in the rainy season. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8** (7), 1068-1073.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Program in Hormone Research*, **40**, 185-225.
- Kaya, A., Aksoy, M. e Tekeli, T., 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*, **44**, 153-158.
- Kaya, S., Kaçar, C., Kaya, D. e Aslan, S., 2013. The effectiveness of supplemental administration of progesterone with GnRH, hCG and PGF<sub>2α</sub> on the fertility of Tuj sheep during the non-breeding season. *Small Ruminant Research*, **113**, 365-370.

- Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G. e Scaramuzzi, R.J., 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, **64** (5), 1225-1235.
- Keyes, P.L., Gadsby, J.E., Yuh, K.C. e Bill, C.H., 1983. The corpus luteum. *International Review and Physiology*, **27**, 57-97.
- Knights, M., Ramgattie, R., Siewa, N., Singh-Knights, D. e Bourne, G., 2011. Effectiveness of a short-term treatment with progesterone injections on synchrony of lambing and fertility in tropical hair sheep. *Animal Reproduction Science*, **126**, 70-75.
- Konyali, C., Tomas, C., Blanch, E., Gomez, E.A., Graham, J.K. e Mocé, E., 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*, **67**, 124-131.
- Kukovics, S., Gyökér, S., Németh, T. e Gergátz, E., 2011. Artificial insemination of sheep – possibilities, realities and techniques at the farm level. *In: Veterinary medicine and science*. M. Manafi (Ed.), Cap 3, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Lau, T.M., Kerton, D.J., Gow, C.B. e Fairclough, R.J., 1993. Role of progesterone in the control of endometrial oxytocin receptors at luteolysis in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, **98**, 229-233.
- Leahy, T., Marti, J.I., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A., Evans, G. e Maxwell, W.M.C., 2010. High pre-freezing dilution improves post-thaw function of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, **119**, 137-146.
- Leão, A.S., Mateus, O., Maurício, R., Pereira, F., Correia, T., Carloto, A., Quintas, H., Dendena, M., e Valentim, R., 2016. Maneio alimentar em ovinos e caprinos. *In: Redovicapra, ACOB/ANCRAS, Bragança/Mirandela, Portugal, 22 p.*  
[<http://www.acob.org.pt/index.php/artigos-tecnicos/28-maneio-alimentar-em-ovinos-e-caprinos>];  
[<http://www.ancras.pt/artigos-tecnicos/74-maneio-alimentar-em-ovinos-e-caprinos>]; consultados a 13 de Abril de 2017.
- Leão, A.S.M., 2017. Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial de cabras da raça Serrana – Ecótipo Transmontano. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 61 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Leboeuf, B., Restall, B. e Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, **62**, 113-141.

- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F. e Cesari, A., 2016. Seminal plasma proteins interacting with sperm surfacerevert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal Reproduction Science*, **173**, 35-41.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F. e Cesari, A., 2016. Seminal plasma proteins interacting with sperm surfacerevert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal Reproduction Science*, **173**, 35-41.
- Leethongdee, S., Kershaw-Young, C.M., Scaramuzzi, R.J. e Khalid, M., 2010. Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology*, **73**, 1257-1266.
- Leethongdee, S., Khalid, M., Bhatti, A., Ponglowhapan, S., Kershaw, C.M. e Scaramuzzi, R.J., 2007. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, **67**, 767-777.
- Legan, S.J. e Karsch, F.J., 1979. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biology Reproduction*, **20**, 74-85.
- Lehloenya, K.C., 2013. Preliminar results evaluating a simplified superovulation protocol in Boer goats. *Small Ruminant Research*, **113**, 171-174.
- Letelier, C.A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R.A., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Flores, J.M., e Gonzalez-Bulnes, A., 2009. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*, **71** (4), 676-682.
- Leyva, V., Buckrell, B.C. e Walton, J.S., 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestogen. *Theriogenology*, **50**, 395-416.
- Lima, F.R.G., 2010. Pesquisa de novo método de congelação para sémen de ovinos Santa Inês. Universidade Federal do Ceará/Universidade Federal da Paraíba/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fortaleza, Brasil, 121 pp.. (*Tese de Doutorado*)
- López-Sebastian, A., González-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Díaz-Delfa, C., Santiago-Moreno, J. e Gómez-Brunet, A., 2007. New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology*, **68**, 1081-1087.

- Lucena, J.A.O., 2010. Inseminação artificial em ovinos. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil, 50 pp.. (*Tese de Doutorado*)
- Maia, M.S., 2010. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. EMPARN, Natal, Brasil, 95 pp..
- Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H. e Chemineau, P., 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biology Rhythms*, **16** (4), 336-347.
- Malpaux, B., Vigié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Pelletier, J. e Chemineau, P., 1996. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, **42**, 109-117.
- Marshall, F.H.A., 1904. The oestrous cycle and the formation of the corpus luteum in the sheep *Philos. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Serie B*, **196**, 47-97.
- Martemucci, G. e D'Alessandro, A.G., 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF<sub>2α</sub>, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal Reproduction Science*, **123**, 32-39.
- Martin, G.B., Hötzel, M.J., Blache, D., Walkden-Brown, S.W., Blackberry, M.A., Boukhliq, R., Fischer, J.S. e Miller, D.W., 2002. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reproduction, Fertility and Development*, **14**, 165-175.
- Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Banchemo Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R. e Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **82-83**, 231-246.
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognié, Y. e Pearce, D.T., 1986. The physiological response of anovulatory ewes to the introduction of rams - A review. *Livestock Production Science*, **15**, 219-247.
- Martinez, M.F., McLeod, B., Tattersfield, G., Smaill, B., Quirke, L.D. e Juengel, J.L., 2015. Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH + progesterone oestrus synchronisation protocol. *Animal Reproduction Science*, **155**, 28-35.
- Masoudi, R., Shahneh, A.Z., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A. e Sharafi, M., 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*, **74**, 77-80.

- Mateus, O., Correia, T., Maurício, R., Pereira, F., Quintas, H., Carloto, A., Dendena, M. e Valentim, R., 2016. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. *In: Redovicapra, ACOB/ANCRAS, Bragança/Mirandela, Portugal, 22 p.* [<http://www.acob.org.pt/index.php/artigos-tecnicos/36-maneio-reprodutivo>]; [<http://www.ancras.pt/artigos-tecnicos/82-maneio-reprodutivo>]; consultados a 13 de Abril de 2017.
- Mateus, O.J.P., 2014. Controlo reprodutivo em ovelhas Awassi x Sarda. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Maxwell, W.M.C e Salomon, S., 1993. Liquid storage of ram semen. *Reproduction and Fertility Development*, **5**, 613-638.
- Mazariegos, V., Garrido, C., Vázquez, J.M. e Vicente, M.I., 2012. Obtención y valoración del semen en los centros de inseminación artificial. *In: Gestión integral del macho en las explotaciones de ovino y caprino. L.M.M. Ferrer, J.J.A. Ramos e D.L. Lacasta (Eds), Cap 10, ICE Salud & Vet S.L., Barcelona, Espanha, 174 pp.*
- McCracken, J.A., Custer, E.E. e Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiology Review*, **79** (2), 263-323.
- McDonald, L.E., 1991. Veterinaria: Reproducción y endocrinología. 6ª Edição, Mejico D.F., México, 294-344.
- McKusick, B.C., Thomas, D.L., Gottfredson, R.G., Zelinsky, R.D. e Berger, Y.M., 1998. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. *In: Proceedings 46<sup>th</sup> Annual Spooner Sheep Day, Universidade do Wisconsin-Madison, Wisconsin, EUA, 69-76 pp.*
- Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M. e Nadia, F.M., 2012. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Animal Reproduction Science*, **136**, 55-60.
- Menassol, J.-B., Collet, A., Chesneau, D., Malpaux, B. e Scaramuzzi, R.J., 2012. The interaction between photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the ewe. *Biology Reproduction*, **86** (2), 52, 1-12.
- Menchaca A. e Rubianes, E., 2004: New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility, and Development*, **16**, 403-413.
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, **16**, 403-413.

- Milczewski, V., Kozicki, L.E., Luz, S.L.N. e Neves, J.P., 2000. Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen fresco. *Archives of Veterinary Science*, **5**, 35-39.
- Mohtar, M.S.M., Haron, A.W., Yussof, R., Bakar, M.Z.A. e Malik, A., 2014. Effect of high dosis of equine chorionic gonadotrophin (eCG) treatments on follicular developments, ovulation and pregnancy rate in Boer goats. *African Journal of Biotechnology*, **13** (12), 1374-1378.
- Moor, R.M., Osborn, J.C. e Crosby, I.M., 1985. Gonadotrophin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, **74**, 167-172.
- Moraes, J.C.F., Souza, C.J.H. e Gonçalves, P.B.D., 2003. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. *In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. P.B.D. Gonçalves, J.R. Figueiredo e V.J.F. Freitas (Eds), Cap. 3, Editora Varela, São Paulo, Brasil, 340 pp..
- Morello, H.H. e Chemineau, P., 2004. Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor de la hembra. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 2, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Morrell, J.M., 2011. Artificial insemination: Current and future trends. *In: Artificial insemination in farm animals*. M. Manafi (Ed), InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Moura, D.S., Lourenço, T.T., Moscardini, M.M., Scott, C., Fonseca, P.O. e Souza, F.F., 2011. Aspectos morfológicos da cérvix de ovelhas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **31** (Suppl 1), 33-38.
- Murphy, B.D., e Martinuk, S.D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, **12** (1), 27-44.
- Naqvi, S.M.K., Pandey, G.K., Gautam, K.K., Joshi, A., Geethalakshmi, V. e Mittal, J.P., 2005. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Animal Reproduction Science*, **85**, 337-344.
- Nunes, J.F., 2002. Inseminação artificial em caprinos. *In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. P.B.D. Gonçalves, J.R. Figueiredo e V.J.F. Freitas (Eds), Livraria Varela, São Paulo, Brasil, 340 pp..
- O'Brein, A., 2002. Flushing the ewe flock: Is it beneficial? *In: Animal Science FactSheets*, Ministério da Agricultura e Alimentação, Ontário, Canadá, 2 pp..

- O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Vans, A.C.O. e Lonergan, O., 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, **73**, 541-549.
- O'Meara, C.M., Donovan, A., Hanrahan, J.P., Duffy, P., Fair, S., Evans, A.C.O e Lonergan, P., 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*, **67**, 1262-1268.
- Omontese, B.O., Rekwot, P.I. Makun, H.J., Ate1, I.U. e Rwuaan, J.S., 2012. Induction of estrus in Sahel goats using Fluorogestone Acetate (FGA) sponges and equine Chorionic Gonadotrophin (eCG). *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, **10** (2), 21-25.
- Palacios, C. e Abecia, J.A., 2015. Meteorological variables affect fertility rate after intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: A 7-year study. *International Journal of Biometeorology*, **59**, 585-592.
- Palacios, C.R., 2010. Manejo del semen e inseminación artificial. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada. (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Pérez-Clariget, R. e Porras, A.A., 2008. Ovinos. *In: Reproducción de animales domésticos*. C. Galina e J. Valencia (Eds), 3ª Edição, Cap 25, Limusa, México D.F., México, 582 pp..
- Perry, K., Haresign, W., Wathes, D.C. e Khalid, M., 2010. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, **74**, 1685–1690.
- Pinna, A.E., Brandão, F.Z., Cavalcanti, A.S., Borges, A.M., Loureiro, A.P.P. e Fonseca, J.F., 2008. Fertilidade de ovelhas cíclicas submetidas à sincronização de estro utilizando implantes intravaginais (CIDR) novos e reutilizados. *Acta Scientiae Veterinariae*, **36** (2), 581.
- Quirke, J.F., Hanrahan, J.P., Loughnane, W. e Triggs, R., 1986. Components of the breeding and non-breeding seasons in sheep: breed effects and repeatability. *Irish Journal Agricultural Research*, **25**, 167-172.
- Ramos, J.J., Ferrer, L.M. e Lacasta, D., 2012. Evaluación del aparato reproductor. *In: Gestión integral del macho en las explotaciones de ovino y caprino*. L.M.M. Ferrer, J.J.A. Ramos e D.L. Lacasta (Eds), Cap 9, ICE Salud & Vet S.L., Barelona, Espanha, 174 pp..
- Riesenberg, S., Meinecke-Tillmann, S. e Meinecke, B., 2001. Ultrasonic survey of follicular development following superovulation with a single application of pFSH, eCG or hMG in goats. *Small Ruminant Research*, **40**, 83-93.

- Robertson, S.A., 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Research*, **322**, 43-52.
- Robinson, J.E., Kaynard, A.H. e Karsch, F.J., 1986. Does melatonin alter pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in the ewe? *Neuroendocrinology*, **43**, 635-640.
- Robinson, J.J., Ashworth, C.J., Rooke, J.A., Mitchell, L.M. e McEvoy, T.G., 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*, **126**, 259-276.
- Robinson, T.J., 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature*, **206**, 39-41.
- Robinson, T.J., 1979. Controlled breeding of sheep and goats. *In: Sheep breeding*. G.J. Tomes, D.E. Robertson, R.J. Lighfoot e W. Haresign (Eds), 2ª Edição, Studies in Agricultural and food sciences, Butterworths & Co Ltd, Londres, RU, 596 pp..
- Rocha, C.S., Martins, A.D., Rato, L., Silva, B.M., Oliveira, P.F. e Alves, M.G., 2014. Melatonin alters the glycolytic profile of Sertoli cells: Implications for male fertility. *Molecular Human Reproduction*, **20**, 1067-1076.
- Rocha, R.M.P., Matos, M.H.T., Lima, L.F., Saraiva, M.V.A., , 2011. Melatonina e reprodução animal: Implicações na fisiologia ovariana. *Acta Veterinária Brasileira*, **5**, 147-157.
- Rojero, R.D.M., Reyna-Santamaria, L., Michel-Aceves, A.C., Mastache-Lagunas, A.A., Hernandez-Ignacio, J. e Rojas-Maya, S., 2009. Cervical or intrauterine artificial insemination in Pelibuey ewes, with chilled semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8** (12), 2621-2625.
- Romano, J.E., 1996. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal pessaries for estrus synchronization in dairy goats. *Small Ruminant Research*, **22**, 219-223.
- Romano, J.E., Alkar, A. e Amstalden, M., 2017. Onset of luteolytic action of exogenous prostaglandin F<sub>2</sub> during estrous cycle in goats. *Theriogenology*, **92**, 45-50.
- Rosa, H.J.D. e Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, **48**, 155-178.
- Russel, A., 1991. Body condition scoring of sheep and goat. *In: Sheep and goat practice*. E. Boden (Ed), Bailliere-Tindall, Filadélfia, EUA, 272 pp..

- Russel, A.J.F., Doney, J.M. e Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of fat in live sheep. *Journal of Agriculture Science*, **72**, 451-454.
- Safari, J., Kifaro, G.C., Mushi, D.E., Mtenga, L.A., Adnøy, T. e Eik, L.O., 2012. Influence of flushing and season of kidding on reproductive characteristics of Small East African goats (does) and growth performance of their kids in a semi arid area of Tanzania. *African Journal of Agricultural Research*, **7** (35), 4948-4955.
- Salama, A.A.K., Caja, G., Hamzaoui, S., Badaoui, B., Castro-Costa, A., Façanha, D.A.E., Guilhermino, M.M. e Bozzi, R., 2014. Different levels of response to heat stress in dairy goats. *Small Ruminant Research*, **121**, 73-79.
- Salamon, S. e Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 77-111.
- Salamonsen, L.A., Jonas, H.A., Burger, H.G., Buckmaster, J.M., Chamley, W.A., Curnming, I.A., Findlay, J.K. e Goding, J.R., 1973. A heterologous radioimmunoassay for follicle-stimulating hormone: application to measurement of FSH in the ovine estrous cycle and in several other species including man. *Endocrinology*, **93**, 610-618.
- Salmon, V.M., Castonguay, F., Demers-Caron, V., Leclerc, P. e Bailey, J.L., 2017. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*, **177**, 1-11.
- Sánchez, A., Serrano, M.A., Deletang, F., Martin, S. e Martino, A., 2003. Resultados reproductivos con implantes de melatonina en ovejas cruce Merino/Fleischschaff en la Coop ALANSER. Interpretación de curvas de partos. *Producción Ovina y Caprina*, **XXVIII**, 212-214.
- Santander, L., Salinas, M.S., Martin, S. e Martino, A., 2003. Índices reproductivos obtenidos utilizando el método de sincronización con esponjas vaginales e inducción con implantes de melatonina en raza Rasa Aragonesa. *Producción Ovina y Caprina*, **XXVIII**, 215-217.
- Santos-Neto, P.C. dos, García-Pintos, C., Pinczak, A. e Menchaca, A., 2015. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science*, **182**, 125-128.
- Sariözkan, S., Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Taşdemir, U., Kine, H. e Ulutaş, P.A., 2010. Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative

- stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm. *Theriogenology*, **73**, 316-323.
- Sayre, B.L. e Lewis, G.S., 1996. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, **45**, 1523-1533.
- Scaramuzzi, R., Campbell, B., Downing, J., Kendall, N., Khalid, M., Muñoz- Gutiérrez, M. e Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*, **46**, 339-354.
- Scaramuzzi, R.J. e Martin, G.B., 2008. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction Domestic Animal*, **43** (Suppl 2), 129-36.
- Sebastian Lopez, A., 1989. Estacionalidad de la reproducción. *Ovis*, **1**, 59-73.
- Seifi-Jamadi, A., Ahmad, E., Ansari, M. e Hamid Kohram, 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*, **75**, 15-20.
- Shabankareh, H.K., Seyedhashemi, S.B., Torki, M., Kelidari, H. e Abdolmohammadi, A., 2012. Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG-superovulated Sanjabi ewes. *Tropical Animal Health Production*, **44**, 1865-1871.
- Sieme, H., Oldenhof, H. e Wolkers, W.F., 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, **169**, 2-5.
- Silva, T.P. D., Torreão, J.N. da C., Marques, C.A.T., Araújo, M.J. de, Bezerra, L.R., Dhanasekaran, K.D. e Sejian, V., 2016. Effect of multiple stress factors (thermal, nutritional and pregnancy type) on adaptive capability of native ewes under semi-arid environment. *Journal of Thermal Biology*, **59**, 39-46.
- Silvia, W.J. e Raw, R.E., 1993. Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> from the ovine uterus by ovarian steroids. *Journal of Reproduction and Fertility*, **98** (2), 341-347.
- Simões, J., Mascarenhas, R. e Baril, G., 2008. Inseminação artificial em caprinos. E-book para técnicos de expressão portuguesa, 44 pp.
- Simonetti, L., 2008. Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Valência, Espanha, 230 pp.. (Tese de *Doutoramento*)

- Siqueira, A.P., Fonseca, J.F., Silva Filho, J.M., Bruschi, J.H., Viana, J.H.M., Palhares, M.S., Bruschi, M.C.M. e Peixoto, M.P., 2009. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **61** (2), 299-305.
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- Snoeck, P.P.N., Moura, L.C.O., Silva, M.C., Machado-Neves, M., Melo, M.I.V., Heneine, L.G.D. e Henry, M. 2017. Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **75**, 88-90.
- Sorensen Jr., A.M., 1979. Animal reproduction. Principles and practices. McGraw-Hill Book Company, Columbus, Ohio, EUA, 496 pp..
- Sousa, C.E.C., da Silveira Cruz-Machado, S. e Tamura, E.K., 2008. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, **27** (1/2), 15-20.
- Sousa, L.M., Campos, D.B., Fonseca V.U., Viau, P., Kfoury, J.R., Oliveira, C.A., Binelli, M., Buratini, J. e Papa, P.C., 2012. Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) modulates bovine placenta steroidogenesis *in vitro*. *Placenta*, **33**, 788-794.
- Souza M.I.L., 1993. A via cervical na inseminação artificial ovina com sêmen congelado. Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil, 47 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Souza, C.J., Campbell, B.K., Baird, D.T., 1998. Follicular waves and concentrations of steroids and inhibin A in ovarian venous blood during the luteal phase of the oestrous cycle in ewes with an ovarian autotransplant. *Journal of Endocrinology*, **156**, 563-572.
- Steel, R.G.D. e Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. 2ª Edição, McGraw-Hill Company, Nova Iorque, EUA, 633 pp..
- Steyn, J.J., 2003. Application of artificial insemination (AI) on commercial sheep and goat production. *In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte*, 2. Simpósio Internacional sobre Agronegócio da Caprinocultura Leiteira. EMEPA-DA, João Pessoa, Brasil, 367-379.
- Thatcher, W.W. e Hansen, P.J., 1993. Environment and reproduction. *In: Reproduction in domesticated animal*. G.J. King (Ed), World Animal Science B.9., Elsevier, Nova Iorque, EUA, **16**, 433-441.

- Thatcher, W.W. e Hansen, P.J., 1993. Environment and reproduction. *In: Reproduction in domesticated animal*. G.J. King (Ed), World Animal Science B.9., Elsevier, Nova Iorque, EUA, **16**, 433-441.
- Theodosiadou, E. Amiridis, G.S. e Tsiligianni, T., 2014. Relationship between electrical resistance of cervical mucus and ovarian steroid concentration at the time of artificial insemination in ewes. *Reproductive Biology*, **14**, 234-237.
- Thiéry, J.-C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M. e Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, **23**, 87-100.
- Ungerfeld, R. e Rubianes, E., 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, **46**, 63-66.
- Ustuner, B., Günay, V., Nur, Z. e Ustuner, H., 2007. Effects of long and short term progestagen treatments combined with PMSG on oestrus synchronization and fertility in Awassi ewes during the breeding season. *Acta Veterinaria Brunensis*, **76**, 391-397.
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., e Correia, T., 2009. Antecipación de la estación reproductiva en ovejas de la raza Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial. *In: 34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Barbastro, Espanha, 403-407.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., 2015a. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 4. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos naturais. *Agrotec*, **17**, 19-23.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., 2015b. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 5. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos hormonais. *Agrotec*, **18**, 25-28.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., 2016a. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 6. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – Flushing alimentar. *Agrotec*, **20**, 12-15.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., 2016b. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 7. Inseminação artificial em ovinos e caprinos. *Agrotec*, **21**, 10-13.

- Valentim, R.C. Correia, T.M. e Azevedo, J.M., 2006. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. *Albéitar Portuguesa*, **2** (6), 18-22.
- Valentim, R.C., 2004. Estudo da sazonalidade sexual em carneiros da Raça Churra Galega Bragançana. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 179 pp.. (*Tese de Doutoramento*)
- Vázquez, A.J.F., Cedillo, M.J., Quezada, V.J, Rivas, A.C., Morales, E.C.L., Ayala, E.M.E., Hernández, M.J., González, R.A. e Aragón, M.A., 2015. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Animal Reproduction Science*, **154**, 29-38.
- Vázquez, A.J.F., Cedillo, M.J., Quezada, V.J, Rivas, A.C., Morales, E.C.L., Ayala, E.M.E., Hernández, M.J., González, R.A. e Aragón, M.A., 2015. Effects of repeated electroejaculations on kinematic sperm subpopulations and quality markers of Mexican creole goats. *Animal Reproduction Science*, **154**, 29-38.
- Venâncio, D., 2012. Diferentes tratamentos de antecipação da estação reprodutiva em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 34 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Viana J.G.A. e Silveira V.C.P. 2009. Análise econômica da ovinocultura na metade sul do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, **39** (4), 1176-1181.
- Vijil, E., 1989. Dependencia ambiental de la calidad seminal en el ganado ovino. *In: IV Simposium Internacional de Reprodução Animal, Volume II, Lisboa, Portugal, 159-197.*
- Vilariño, M., Rubianes, E. e Menchaca, A., 2013. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, **79**, 206-210.
- Villegas, N. e Bentancur, O., 1999. Sperm production, testicular size, serum gonadotrophins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds. *Reproduction Nutrition Development*, **39** (5-6), 617-624.
- Vincent, J.N., McQuown, E.C. e Notter, D.R., 2000. Duration of the seasonal anestrus in sheep selected for fertility in a fall-lambing system, *Journal of Animal Science*, **78**, 1149-1154.
- Viñoles, C., Forsberg, M., Rubianes, E., 2000. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in the ewe. Proceedings of the 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, **1**, 26 (abstr).

- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B. e Restall, B.J., 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, **52** (Suppl), 243-257.
- Watson, P., 1992. Semen technology. *In: Curso Superior de Reproducción Animal*, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, Saragoça, Espanha, 25 pp.. (*Documento Interno*)
- Watson, P., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction, Fertility and Development*, **7**, 871-891.
- Weems, C.W., Weems Y.S. e Randel, R.D., 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal*, **171**, 206-228.
- Williams, L.M. e Helliwell, R.J.A., 1993. Melatonin and seasonality in the sheep. *Animal Reproduction Science*, **33**, 159-182.
- Windsor, D.P., 1994. Széll, A.Z., Buschbeck, C., Edward, A.Y., Milton, J.T.B. e Buckrell, B.C., 1994. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, **42**, 147-157.
- Windsor, D.P., 1995. Factors influencing the success of transcervical insemination in merino ewes. *Theriogenology*, **43**, 1009-1018.
- Zamiri, M.J. e Hosseini, M., 1998. Effects of human Chorionic Gonadotropin (hCG) and Phenobarbital on the reproductive performance of fat-tailed Ghezel ewes. *Small Ruminants Research*, **30**, 157-161.
- Zelege, M., Greyling, J.P.C., Schwalbach, L.M.J., Muller, T. e Erasmus, J.A., 2005. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research*, **56**, 47-53.