

**Antecipação da Estação Reprodutiva em Cabras da
Raça Serrana ecótipo Transmontano. Inseminação
Artificial com Sémen Congelado**

Maria de Fátima Cardoso Azevedo Cortez

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

Orientado por

Prof. Doutor Ramiro Valentim

Prof^a. Doutora Teresa Montenegro

Bragança

2012

DEDICATÓRIA

AO MEU MARIDO E FILHAS POR TUDO O QUE REPRESENTAM

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ramiro Valentim, meu orientador científico, por todo o apoio, amizade, paciência, colaboração e auxílio na elaboração deste trabalho, sem o qual não teria sido possível a execução do mesmo.

À Professora Doutora Teresa Montenegro, minha co-orientadora Científica, por todo o seu apoio, amizade e disponibilidade demonstrada durante a realização deste trabalho.

A todos os professores da ESAB que acompanharam o meu percurso, me incentivaram e me dotaram de conhecimentos.

A todas as pessoas que trabalham na Quinta de Santa Apolónia e na Quinta do Pinheiro Manso e que contribuíram para a execução deste trabalho, nomeadamente, à Dona Céu, ao Sr. Luís Paulos e ao Sr. Zé por toda a sua boa vontade, disponibilidade, paciência, boa disposição e amizade. Também ao João David, pela disponibilidade, amizade e colaboração.

Ao David Venâncio, ao Óscar Mateus e a Andrea pelo companheirismo, colaboração e amizade

Finalizando e porque os últimos são os primeiros, ao meu marido Paulo Cortez, às minhas filhas Juliana, Marta e Helena pela compreensão, paciência, carinho e incentivo, sem eles não teria sido possível a finalização desta etapa.

A todas as pessoas, que de alguma forma estiveram presentes, o meu muito **Obrigado.**

RESUMO

Este estudo teve como principal objectivo avaliar a eficácia de 2 tratamentos hormonais diferentes na antecipação da estação reprodutiva, progestagénios e eCG (Grupo Controlo) *vs.* melatonina e progestagénios e eCG (Grupo Melatonina), em Cabras Serranas, ecótipo Transmontano. Por outro lado, procura avaliar a eficácia da aplicação da técnica de inseminação artificial (IA), com sémen congelado, em cabras desta raça autóctone Portuguesa.

Neste trabalho foram utilizadas 65 cabras adultas da raça Serrana ecótipo Transmontano. No início do mês de Março, 32 destas cabras receberam um implante subcutâneo de melatonina (18 mg). Cerca de cinquenta dias mais tarde, todas as cabras (n=65) foram tratadas com uma injeção intramuscular de 100 µg de prostaglandinas F_{2α} (PGF_{2α}) e com esponjas vaginais (20 mg de FGA). Cinco dias depois, após a remoção das esponjas vaginais, todas as cabras receberam uma injeção de 300 UI de eCG. Posteriormente, 15 cabras de cada um destes grupos (n = 30) foram inseminadas artificialmente com sémen congelado (grupo IA); as demais 35 foram beneficiadas por monta natural (grupo MN). Todas as cabras foram sujeitas a diagnóstico de gestação, por ultrasonografia, 41 dias após a realização da inseminação artificial. No fim do Inverno, 50,8% das cabras estavam em anestro. Depois de aplicados os tratamentos, 80,0% das cabras estudadas apresentaram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml. O tratamento de melatonina resultou num aumento da percentagem de cabras que apresentaram cio (Controlo: 83,3% *vs.* Melatonina: 94,1%). A IA causou uma redução significativa da taxa de fertilidade aparente (MN: 88,6% *vs.* IA: 30,0%). No geral a taxa de fertilidade aparente foi de 61,5%, a taxa de prolificidade de 2,1 e a de fecundidade de 130%.

Palavras chave: Cabra, eficiência reprodutiva, tratamentos hormonais, inseminação artificial, sémen congelado

ABSTRACT

This study's main objective was to evaluate the efficacy of two different hormonal treatments in anticipation of the breeding season, progestagen and eCG (control group) vs. progestagen and eCG and melatonin (Melatonin group), in 65 adult goats Serranas, Transmontano ecotype. On the other hand, seeks to assess the effectiveness of the application of artificial insemination (AI) with frozen semen in goats of this breed native Portuguese.

At the beginning of March 32 of these goats received a subcutaneous implant of melatonin (18 mg). About fifty days later, all goats (n = 65) were treated with an intramuscular injection of 100 mg prostaglandin F₂α (PGF₂) and vaginal sponges (20 mg FGA). Five days later, after the removal of vaginal sponges, all the goats were given an injection of 300 IU of eCG. Subsequently, 15 goats from each group (n = 30) were artificially inseminated with frozen semen (group IA) and the remaining 35 were benefited by natural mating (group MN). All goats were submitted to pregnancy diagnosis by ultrasonography, 41 days after artificial insemination. In late winter, 50.8% of the goats were in anoestrus. After applying the treatments, 80.0% studied animals has P₄ plasma levels above 0.5 ng / ml. Melatonin treatment resulted in a higher percentage of goats in estrus (control: 83.3% versus. Melatonin: 94.1%). IA caused a significant decrease in fertility (MN: 88.6% vs. IA: 30.0%). The fertility, prolificacy and fecundity rates were, respectively, 61,5%, 2.1 and 130%.

Keywords: Goat, reproductive efficiency, hormonal treatments, artificial insemination, frozen semen

ÍNDICE GERAL

I – INTRODUÇÃO	10
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1 – FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA CABRA	13
1.1– CICLO ÉSTRICO	13
1.1.1– ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ÉSTRICO	15
2– SAZONALIDADE REPRODUTIVA	16
3– MÉTODOS DE INDUÇÃO E DE SINCRONIZAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA.....	17
3.1– CONTROLO DA ACTIVIDADE OVÁRICA	18
3.2– "EFEITO MACHO"	19
3.3– O FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NO CONTROLO DA ACTIVIDADE OVÁRICA	20
3.4– INDUÇÃO COM IMPLANTES DE MELATONINA.....	20
4– INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) EM PEQUENOS RUMINANTES.....	21
4.1– SELECÇÃO DAS FÊMEAS PARA IA	22
4.2– RECOLHA E PRESERVAÇÃO DO SÉMEN.....	23
4.3– CRIOPRESERVAÇÃO DO SÉMEN.....	24
4.4– TÉCNICAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	25
III – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	27
1 – MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1.1 – ANIMAIS	27
1.2 – PESAGEM DOS ANIMAIS	27
1.3 – DETERMINAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO	28
1.4 – INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO	29
1.5 – DETECÇÃO DE CIOS	30
1.6 - DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	31
1.7 – DADOS DO PARTO	31
1.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
IV – RESULTADOS.....	32
1 – IDADE E PESO CORPORAL	32
2 – ACTIVIDADE OVÁRICA	32
3 – MANIFESTAÇÕES DE CIO.....	34
4 – DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	34
5 – PARÂMETROS REPRODUTIVOS: TAXA DE FERTILIDADE APARENTE, DE PROLIFICIDADE E DE FECUNDIDADE.....	35
V – CONCLUSÕES	37
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema representativo das alterações fisiológicas no ovário que ocorrem durante o ciclo éstrico da cabra	14
FIGURA 2 - Modelo neuroendócrino representativo da actividade sazonal nos caprinos	21
FIGURA 3 - Ovelhas da raça Serrana, ecótipo Transmontano	27
FIGURA 4 - Recolha de amostras de sangue periférico	28
FIGURA 5 - Colocação de esponjas vaginais	29
FIGURA 6 - Aplicação da injeção de eCG	29
FIGURA 7 - Aplicação da técnica de Inseminação Artificial via cervical (esquerda) e pormenor do pistolet, da bainha e da palhinha de inseminação contendo sémen descongelado (direita)	30

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1– Valores máximos e mínimos da idade e peso das cabras estudadas.....	32
QUADRO 2– Percentagem de cabras que apresentaram níveis plasmáticos de P4 superiores a 0,5 ng/ml, antes dos tratamentos de melatonina e de PGF ₂ α + FGA + eCG.....	33
QUADRO 3– Percentagem de cabras que apresentaram níveis plasmáticos de P4 superiores a 0,5 ng/ml, manifestações de cio e diagnóstico de gestação positivo pós-tratamentos	34
QUADRO 4– Taxas de fertilidade, prolificidade e de fecundidade das cabras dos diferentes grupos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANCRAS – Associação Nacional de Caprinicultores da Raça Serrana

ART – Técnicas de Reprodução Assistida

CL – Corpo Lúteo

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

FGA – Acetato de Fluorogestona

FSH – Hormona Folículo-Estimulante

g – Grama

GnRH – hormona libertadora de gonadotropina

hCG – Gonadotropina Coriônica humana

IA – Inseminação Artificial

IPB – Instituto Politécnico de Bragança

Kg – Quilograma

LH – Hormona Luteinizante

MAP – Medroxiprogesterona

mg – Miligrama

μg – Micrograma

ml – Mililitro

MN – Monta Natural

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

RIA – Radioimunoensaio

I – INTRODUÇÃO

Os caprinos terão sido dos primeiros animais a serem domesticados e utilizados na produção de alimentos (carne e leite) e de vestuário (pele). Estima-se que a sua domesticação tenha ocorrido por volta do ano 7.000 A.C.. Desde essa altura, estes animais constituem uma fonte de rendimento essencial para as populações humanas, particularmente para as que habitam regiões desfavorecidas onde a criação de outros animais é, técnica ou economicamente, mais difícil e menos rentável (Mascarenhas, 2006).

Os caprinos fornecem produtos e serviços importantes ao homem em todo o mundo. Nos países desenvolvidos são apreciados, principalmente, pela sua produção de leite, carne ou fibras, enquanto nos países em desenvolvimento são apreciadas, fundamentalmente, pela sua produção de carne seguida da de fibras, leite e peles. É nos países em desenvolvimento que, devido às suas carências económicas, sociais e culturais, os caprinos têm maior relevância socioeconómica. O facto de serem animais de pequenas dimensões é especialmente relevante e resulta em vantagens biológicas, económicas e de gestão (Devendra & Solaiman, 2010).

A capacidade reprodutiva é uma das características de produção mais importantes. Elevadas taxas de fecundação, fertilidade aparente e produtividade do sistema são muito apreciadas. Contudo, se as condições de produção não forem as adequadas, a elevação destas taxas pode traduzir-se em perdas de rentabilidade. Assim, por exemplo, o aumento da prolificidade pode resultar em cabritos mais pequenos ao nascimento, com um desenvolvimento mais lento e com um peso ao desmame mais baixo (Gurung & Solaiman, 2010).

Nas últimas décadas, o aumento da procura de produtos de origem caprina tem impulsionado a investigação conducente à melhoria da gestão das explorações caprinas, nomeadamente, através do controlo da actividade reprodutiva e do aumento das taxas reprodutivas e produtivas: fertilidade aparente, prolificidade, fecundidade, produtividade numérica e produtividade do sistema.

O controlo da actividade reprodutiva permite uma gestão integrada e realmente eficaz das explorações caprinas – manejo genético, manejo alimentar, manejo reprodutivo, manejo sanitário, mão-de-obra, compra de matérias-primas e venda de produtos tendo em conta a oscilação dos seus preços, entre outros. Ele permite

maximizar a rentabilidade destas explorações. Por outro lado, o controlo da actividade reprodutiva torna viável a aplicação de diferentes técnicas reprodutivas, nomeadamente da inseminação artificial (IA).

Nos pequenos ruminantes, particularmente nos caprinos, a utilização da técnica de IA desenvolveu-se essencialmente a partir da década de 70 do século passado (Mascarenhas & Simões, 2005). Contudo, nas últimas duas décadas, a sua adopção por parte das indústrias ovina e caprina diferiu significativamente no espaço Europeu. É mais comum no Norte da Europa do que no Sul.

A IA é uma técnica que possibilita a deposição artificial do sémen no interior do aparelho genital feminino, com recurso a instrumentos e a materiais específicos, em condições que garantem a ocorrência do fenómeno de fecundação. A IA engloba múltiplas actividades: preparação dos reprodutores, método de recolha do sémen, análise, processamento, embalagem e armazenamento do sémen, técnica de IA e diagnóstico de gestação (Bezerra, 2010a).

A IA foi a primeira grande biotecnologia aplicada à reprodução e ao melhoramento genético animal. Associada às demais biotecnologias reprodutivas: tecnologia seminal, sexagem, GIFT (transferência intra-tubária de gâmetas), fertilização *in vitro* (capacitação *in vitro*, maturação *in vitro* e fertilização *in vitro* propriamente dita), micromanipulação – PZD (dissecção parcial da zona pelúcida), SUZI (inseminação subzonal) ou ICSI (injecção intracitoplasmática de espermatozoide) –, clonagem, criopreservação de gâmetas femininos ou de embriões, transferência de embriões, permite avanços reprodutivos e genéticos ainda mais espectaculares e ajuda na conservação de raças raras ou em via de extinção (Morrell, 2011).

A IA quando correctamente aplicada é um instrumento valioso do melhoramento animal. A elevada variabilidade genética entre as raças caprinas, possibilita o desenvolvimento de diferentes programas de melhoramento genético, que atendam a diferentes exigências do mercado actual e futuro. Contudo, a variabilidade genética nestes animais tem vindo a diminuir a uma taxa alarmante, devido a causas naturais, desastres causados pelo homem, à perda de habitat, à negligência e à substituição das raças autóctones por outras exóticas (Shrestha & Galal, 2010).

Os objectivos deste estudo incluem a avaliação da eficácia da utilização de diferentes tratamentos hormonais na antecipação da estação reprodutiva e da aplicação

da técnica de inseminação artificial (IA), com sémen congelado, em caprinos da raça Serrana, ecótipo Transmontano.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA CABRA

A melhoria e a evolução das técnicas naturais e artificiais de reprodução assistida assentam sempre no conhecimento profundo dos mecanismos fisiológicos da reprodução (Simões & Mascarenhas, 2004; citados por Raposo, 2011).

1.1 – CICLO ÉSTRICO

O ciclo éstrico engloba todas as alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais nos ovários e no tracto genital feminino que conduz à expressão do cio (receptividade sexual), à preparação do tracto genital para a cópula, ovulação, fecundação e implantação embrionária (Fatet *et al.*, 2011).

Corresponde ao período entre dois cios em que ocorrem profundas variações hormonais, com impacto no tracto genital e no comportamento da fêmea.

O ciclo éstrico é regulado, endocrinologicamente, pela interacção das hormonas GnRH (Hormona Libertadora de Gonadotrofinas), FSH (Hormona Folículo-Estimulante), LH (Hormona Luteinizante) e dos esteróides sexuais (estrogénios e progesterona) (Granados *et al.*, 2006).

A duração da estação reprodutiva resulta, essencialmente, de interacções genéticas e ambientais (Greyling, 2010). Os caprinos são animais poliéstricos sazonais, pelo que as cabras podem ter vários ciclos éstricos consecutivos, dependendo o seu número da duração da época reprodutiva (Fatet *et al.*, 2011), do estado de saúde e do estado fisiológico (gestação).

Nos caprinos, a duração do ciclo éstrico é aproximadamente de 21 dias, podendo, no entanto, variar consideravelmente - 3 a 62 dias. Os ciclos anormalmente curtos (4-5 dias), que caracterizam o começo da estação reprodutiva, parecem resultar da falha do mecanismo de ovulação (anovulação), consequência da reduzida amplitude do pulso pré-ovulatório de LH, ou da regressão prematura do corpo lúteo (CL) (Hafez & Hafez, 2004; Greyling, 2010), causada pela inexistência de níveis circulantes de progesterona capazes de inibir os efeitos estimuladores da oxitocina (de origem folicular) sobre a secreção uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$).

A duração do cio é de, aproximadamente, 24 a 48 horas. Esta varia igualmente em função da genética (raça e indivíduo), do indivíduo (idade, estado de saúde), das condições ambientais, de factores sociais e outros. Os sinais mais visíveis do cio são: intranquilidade, vocalizações frequentemente e de maior amplitude, agitação rápida e constante da cauda, apetite reduzido, procura do macho, montas homossexuais, diminuição da produção de leite (se está em lactação), edema vulvar, eritema e corrimento vaginal (Hafez & Hafez, 2004).

O ciclo éstrico pode ser subdividido em quatro fases (Figura 1), caracterizadas por manifestações ou modificações orgânicas específicas e com diferentes períodos de duração. O proestro e o estro ocorrem na fase de desenvolvimento folicular (crescimento e maturação folicular), quando predominam os efeitos dos estrogénios (Grunert *et al.*, 2005 citado por Vitaliano, 2011). O metaestro e o diestro acontecem na fase lútea (formação e funcionamento do CL), quando prevalecem as acções progestagénicas (Grunert *et al.*, 2005 citados por Vitaliano, 2011).

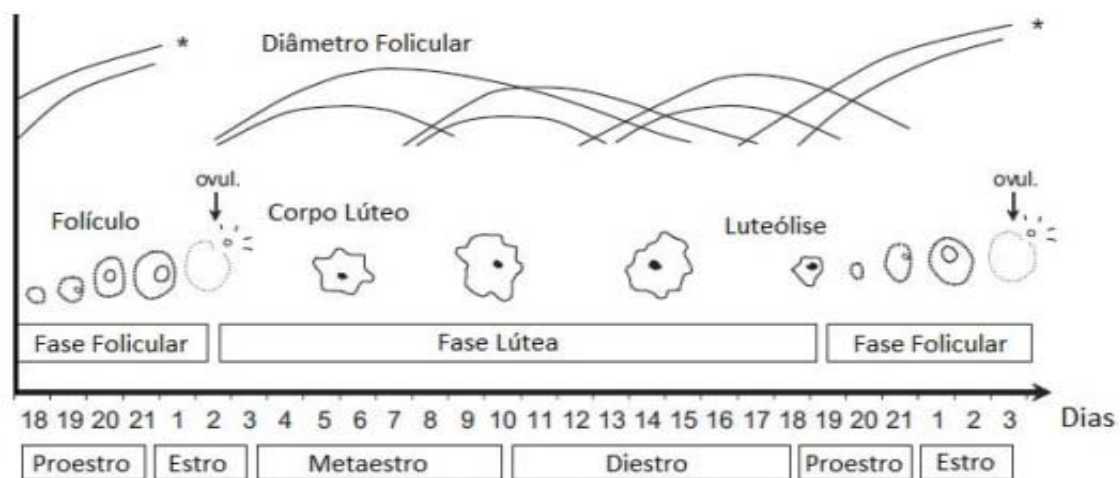


FIGURA 1 – Esquema representativo das alterações fisiológicas no ovário que ocorrem durante o ciclo éstrico da cabra: padrão do desenvolvimento folicular e o ciclo ovárico. (Adaptado de Fatet *et al.*, 2011)

O ciclo éstrico determina a formação de oócitos maduros e a preparação do aparelho genital para uma eventual gestação, caso haja fecundação (Miranda, 2010). Se o óvulo for fertilizado, o corpo lúteo é mantido durante toda a gestação, constituindo a fonte de progesterona imprescindível à manutenção da mesma; na cabra, a gestação é CL dependente (Granados *et al.*, 2006).

O período de gestação é, geralmente, definido como o período de tempo que medeia entre a concepção e o parto. Nos caprinos é, normalmente, de 149 dias, podendo no entanto variar entre 144-150 dias. São vários os factores que podem influenciar a duração do período de gestação: idade, número de partições anteriores, estado de saúde, condição corporal, estação do ano, número e sexo das crias, entre outros. Os efeitos da dieta sobre o desenvolvimento fetal, alteram a duração da gestação (encurtando-a ou alongando-a) em aproximadamente 1,5 dias (Greyling, 2010).

1.1.1 – ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ÉSTRICO

O ciclo éstrico é regulado por mecanismos neuroendócrinos. Neles estão envolvidos o hipotálamo (GnRH), a hipófise (FSH e LH) e os ovários (estrogénios e progesterona) (Miranda, 2010). Durante o ciclo éstrico, a regulação da secreção de gonadotropinas depende do balanceamento perfeito de complexas interações hormonais (Hafez & Hafez, 2004).

Existem cinco níveis de integração do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas. Do primeiro nível (hipotálamo) fazem parte os neurónios sensíveis aos esteróides ováricos e que registam as suas variações ao longo do ciclo éstrico e do ano (sazonalidade). No segundo nível (ainda no hipotálamo) estão integrados os neurónios secretores de GnRH, cuja actividade é controlada pelo primeiro nível de integração. O terceiro nível corresponde à libertação de GnRH no Sistema Porta Hipofisário, à sua ligação aos receptores das células gonadotrópicas presentes na hipófise anterior e à secreção das gonadotropinas - FSH e LH. O quarto nível produz-se a nível do ovário: as gonadotrofinas hipofisárias ligam-se aos seus receptores presentes nas células foliculares da teca e da granulosa e participam activamente no seu crescimento e desenvolvimento e na subsequente ovulação, formação e manutenção do CL. O quinto nível tem lugar noutros órgãos e tecidos periféricos, particularmente no endométrio, que sofrem importantes alterações estruturais em função da fase do ciclo, tendo em vista o possível estabelecimento da gestação (Miranda, 2010).

O eixo hipotálamo-hipofisário é crucial na ligação do indivíduo ao meio externo. É ainda responsável pela regulação de vários mecanismos internos essenciais: crescimento somático, maturação das gónadas, reprodução sazonal e controlo do ciclo éstrico, adaptação ao *stress* e produção de leite (Miranda, 2010). O sistema

neuroendócrino integra o ajustamento e as reacções do organismo às condições internas e externas (Constantinescu & Constantinescu, 2010)

O hipotálamo é uma estrutura do sistema nervoso central que se comporta como um transdutor endócrino, transformando a actividade nervosa em sinais hormonais. Aqui é produzida e libertada uma grande variedade de compostos tais como: neurotransmissores, necessários à transmissão nervosa pela sua acção a nível sináptico, outros neuropeptídeos que actuam como neuromodeladores estimulando ou inibindo a acção dos neurotransmissores e neurohormonas. O hipotálamo comporta-se como uma glândula endócrina, determinando a secreção hipofisária de várias hormonas peptídicas: a GH (Hormona de Crescimento), PRL (Prolactina), ACTH (Hormona Adrenocorticotrópica), TSH (Hormona estimulante da Tiróide), FSH e LH.

Do ponto de vista reprodutivo, a hormona hipotalâmica mais importante é a GnRH. Normalmente, as hormonas peptídicas ligam-se a receptores da membrana e iniciam reacções em cadeia no interior da célula (pelo que os seus efeitos são rápidos) através da activação enzimática (síntese de proteínas) e da modificação da permeabilidade da membrana plasmática (secreção hormonal) (Hafez & Hafez, 2004; Miranda, 2010).

2 – SAZONALIDADE REPRODUTIVA

Os caprinos são considerados animais de fácil adaptação ao meio em que se inserem e de elevada fertilidade. O seu ciclo reprodutivo anual caracteriza-se por um período de actividade sexual e por um período de anestro. Tal como já foi anteriormente referido são considerados animais poliéstricos sazonais.

O início e duração da época de reprodução dependem de vários factores tais como: a genética, a latitude, o fotoperíodo, as condições climáticas, a alimentação, a condição corporal, a idade, a saúde, o estado fisiológico, a presença de machos ou de fêmeas sexualmente activas (Mascarenhas, 2006; Fatet *et al.*, 2011).

Os caprinos são denominados de reprodutores de "dias curtos", pois reproduzem-se preferencialmente quando o fotoperíodo é decrescente (Leboeuf *et al.*, 1998). Próximo do solstício de Verão, começam a apresentar uma actividade ovárica cíclica. A partir do solstício de Inverno entram em anestro sazonal. Os "dias crescentes" do Inverno-Primavera ressensibilizam o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas e preparam-no

para o retorno à estação reprodutiva. Os "dias decrescentes" promovem a actividade reprodutiva (Simões & Mascarenhas, 2004, citados por Raposo, 2011).

Em França podem ocorrer dois picos de reprodução: na Primavera e no Outono. Na bacia do mediterrâneo, a reprodução é mais frequente no Verão-Outono do que na Inverno-Primavera. Nas regiões tropicais ou subtropicais não existe uma sazonalidade marcada, sendo a reprodução condicionada por outros factores ambientais (alimentação, pluviosidade, temperatura). Em Portugal, o fim da estação reprodutiva tende a ocorrer no mês de Janeiro e a de anestro entre Maio e Agosto. Resulta da acção não só do fotoperíodo, mas também da alimentação, da condição corporal e da temperatura do ar (Chemineau *et al.*, 1991; Mascarenhas, 2006; Fatet *et al.*, 2011).

O controlo da actividade reprodutiva em caprinos, tal como em outras espécies animais, tem vantagens tanto a nível da exploração como do progresso genético. Possibilita a escolha da altura do ano mais favorável ao desenvolvimento da actividade reprodutiva, tendo em conta as condições económicas e de gestão de recursos mais favorável, permitindo a sincronização dos nascimentos e a redução da taxa de mortalidade (melhor assistência neonatal), a formação de grupos homogéneos de fêmeas com crias, que podem ser alimentados de acordo com as suas necessidades nutricionais e a optimização da manipulação dos animais. Faculta ainda a manipulação e a preservação do património genético (Chemineau *et al.*, 1997; Fatet *et al.*, 2011).

3 – MÉTODOS DE INDUÇÃO E DE SINCRONIZAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA

Na actualidade o controlo da actividade ovárica é um instrumento fundamental da gestão racional de qualquer exploração animal. Pode ser conseguida através de métodos hormonais, do "efeito macho" ou da manipulação do fotoperíodo. A resposta depende sempre da condição corporal da fêmea (Valentim, 2012 informação pessoal).

Os primeiros protocolos hormonais, baseados no uso de progesterona/progestagénios ou de PGF_{2α} e de eCG (Gonadotrofina Coriónica equina), foram estabelecidos há mais de quatro décadas (Traldi *et al.*, 2007; Fatet *et al.*, 2011).

3.1 – CONTROLO DA ACTIVIDADE OVÁRICA

O controlo da actividade ovárica assenta na utilização de hormonas exógenas que mimetizam artificialmente as variações das secreções endócrinas endógenas. A hormona mais utilizada é um progestagénio (análogo da progesterona), o FGA (acetato de fluorogesterona) que simula a fase lútea. É administrada durante alguns dias, via esponjas vaginais bloqueando a ovulação até a esponja vaginal ser removida e a hormona ser eliminada da circulação sanguínea (Mascarenhas, 2006).

O método de controlo da actividade ovárica mais comum em todo o mundo baseia-se no uso de esponjas vaginais impregnadas com progestagénios FGA ou MAP (acetato de medroxiprogesterona). O progestagénio é libertado gradualmente para a corrente sanguínea.

Os primeiros protocolos recomendavam a colocação de esponjas vaginais por períodos de 12 a 14 dias. Resultavam em elevadas taxas de indução da actividade ovárica, mas as taxas de fertilidade eram baixas. Ao que tudo indica, este tratamento prolongado originava um período de crescimento folicular excessivo e, conseqüentemente, provocava o envelhecimento do oócito (Granados *et al.*, 2006). Presentemente, na estação reprodutiva, recomenda-se a utilização de tratamentos progestagénicos curtos (7-9 dias), associados à administração de PGF_{2α}. A injeção adicional de eCG ou de hCG (Gonadotropina Coriónica humana) garante o crescimento folicular, a ovulação e a formação e manutenção do CL. A dose de eCG deve ser ajustada a cada animal e variar em função da estação do ano, da raça, da idade e do peso. Tratamentos repetidos com eCG podem causar, nalgumas cabras, a produção de anticorpos circulantes, o que diminui ou anula os seus efeitos. Por isso recomenda-se não tratar a mesma cabra mais do que uma vez por ano com eCG (Lebouef *et al.*, 1998; Simões *et al.*, 2008).

Cerca de 24 horas após a remoção das esponjas vaginais, as cabras entram em cio. A IA deve ser feita, numa aplicação única, cerca de 43 horas depois da remoção das esponjas vaginais (Chemineau *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 1997; Lebouef *et al.*, 1998; Baldassarre & Karatzas, 2004; Mascarenhas & Simões, 2005; Granados *et al.*, 2006; Traldi *et al.*, 2007; Bezerra, 2010a; Fatet *et al.*, 2011).

Para aumentar a eficácia do tratamento de controlo da actividade ovárica e da IA, as fêmeas a inseminar devem ser escolhidas segundo os seguintes critérios: terem parido normalmente no ano anterior e há mais de 150 dias, excluindo as que abortaram e as que

não pariram, terem mais de 1 ano e menos de 4 anos de idade, as cabras velhas e as chibas apresentam taxas de fertilidade mais baixas pós-IA e não devem apresentar sinais de pseudogestação, detectada por ecografia nos 10 dias que precedem a colocação das esponjas vaginais (ANCRAS, 2003; Mascarenhas & Simões, 2005; Simões *et al.*, 2008).

3.2 – "EFEITO MACHO"

Nos animais, as feromonas (libertadas junto com a urina, o muco vaginal, as fezes ou a partir de glândulas situadas em diversas partes do corpo) podem promover alterações nos sistemas endócrino e reprodutivo (Espescht, 1998; Traldi *et al.*, 2007). O "efeito macho" é uma forma de bioestimulação.

As cabras devem estar isoladas dos bodes inteiros por um período de pelo menos, 3-4 semanas. Alguns autores recomendam que esta separação tenha uma duração mínima de 60 dias (maximização da resposta). As cabras não podem ter qualquer contacto visual, auditivo, olfactivo e táctil com os machos. A reintrodução dos bodes junto das cabras determina um aumento da frequência de secreção de GnRH/LH (Espescht, 1998; Granados *et al.*, 2006).

O "efeito macho" é muito condicionado pelo fotoperíodo. A resposta dos animais depende da profundidade do anestro sazonal. Este tende a ser mais elevado entre as cabras originárias das zonas do globo com maior latitude. As cabras da raça Creole, das ilhas Guadalupe, respondem bem ao "efeito macho" em qualquer altura do ano (Chemineau, 1983, citado por Pellicer-Rubio *et al.*, 2007).

Em raças muito sazonais, o "efeito macho" *per se* só antecipa o início da época de reprodução em algumas semanas. A meio da estação de anestro é incapaz de induzir um recomeço satisfatório da actividade reprodutiva (Mascarenhas, 2006), (Restall, 1992; Walkden-Brown *et al.*, 1999; citados por Pellicer-Rubio *et al.*, 2007). Na estação de anestro a sua associação a um tratamento fotoperiódico produz efeitos benéficos (Chemineau *et al.*, 1986; Chemineau *et al.*, 1996, citado por Pellicer-Rubio *et al.*, 2007).

3.3 – O FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NO CONTROLO DA ACTIVIDADE OVÁRICA

Nos pequenos ruminantes, o principal factor ambiental condicionador da actividade reprodutiva é a variação anual da duração do período diário de luz, conhecido por fotoperíodo. Todavia, a sua acção é modulada por diversos factores endógenos e exógenos (Miranda, 2010).

Os regimes luminosos de "dias curtos" e de "dias longos" aumentam e diminuem, respectivamente, a secreção de melatonina. A melatonina é uma hormona natural, sintetizada e libertada exclusivamente durante a noite. Os animais percebem o fotoperíodo através da secreção desta hormona (Espescht, 1998; Granados *et al.*, 2006).

A manipulação do fotoperíodo permite a indução do cio e da ovulação na estação de anestro. Um fotoperíodo de "dias longos" pode ser artificialmente mimetizado, durante 30 ou 60 dias, através de um regime luminoso de 16 horas de luz artificial/8 horas de escuridão ou de *flashes* de luz artificial, de 1-2 horas, aplicados 15-18 horas após o amanhecer. No fim do tratamento os animais regressam à situação de fotoperíodo natural e 60 dias mais tarde retomam a actividade ovárica cíclica (Espescht, 1998; Granados *et al.*, 2006).

3.4 – INDUÇÃO COM IMPLANTES DE MELATONINA

De acordo com os conhecimentos actuais a informação luminosa depois de captada pela retina é transmitida, por via nervosa, até à glândula pineal condicionando a secreção de melatonina. A melatonina é uma hormona (indolamina) que está naturalmente presente no organismo de todos os mamíferos e que atravessa as paredes celulares por difusão passiva. É produzida segundo um ritmo endógeno diário durante o período nocturno definido pelos núcleos supraquiasmáticos e sincronizado pelo fotoperíodo (Figura 2). A sua principal acção produz-se a nível do sistema nervoso central e está relacionada com a modificação da frequência de libertação de GnRH/LH e da actividade das gónadas (Valentim *et al.*, 2006; Traldi *et al.*, 2007; Miranda, 2010; Raposo, 2011).

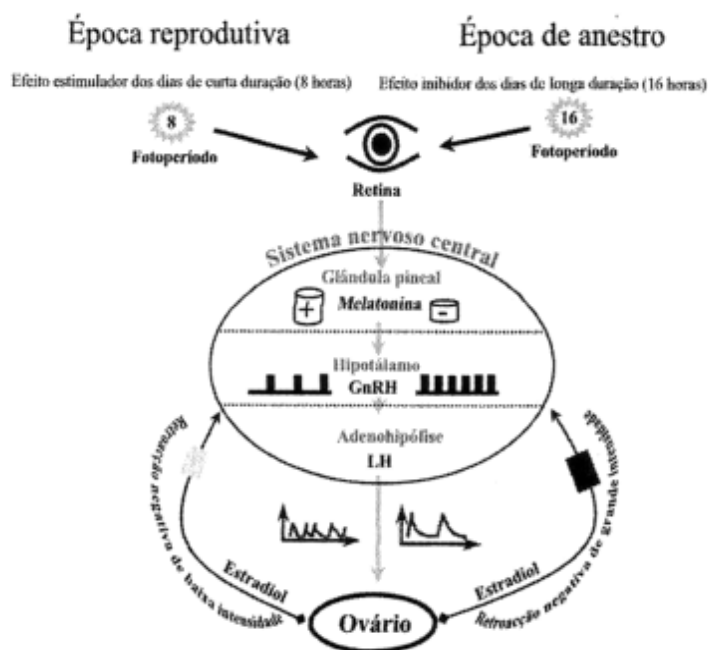


FIGURA 2 - Modelo neuroendócrino representativo da actividade sazonal nos caprinos (Adaptado de Simões & Mascarenhas, 2004; por Raposo, 2011).

A melatonina exógena utilizada na promoção da actividade ovárica pode ser administrada através de implantes subcutâneos (com 18 mg de melatonina), colocados na base posterior da orelha, de injecções diárias ou no alimento. A administração deve ter início 30-40 dias antes da cobrição (Espeschit, 1998; Granados *et al.*, 2006; Miranda, 2010). Os resultados reprodutivos são por vezes contraditórios, devido a diferenças relacionadas com o animal, com o manejo e com a metodologia utilizada. A melatonina exógena produz melhores resultados quando é aplicada a animais em bom estado físico e de saúde (Valentim *et al.*, 2006).

4 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA) EM PEQUENOS RUMINANTES

A IA pode ser considerada como a mais antiga das técnicas de reprodução assistida (ART) e contribuiu para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético ao ter facilitado a identificação de machos de elevado valor genético (Baldassarre & Karatzas, 2004).

Algumas das vantagens da IA são: estender os limites geográficos e temporais da cobrição natural, possibilitar a utilização de machos de elevado valor genético que

apresentem anomalias físicas, fisiológicas ou comportamentais temporárias ou definitivas (mas não transmissíveis às futuras gerações), contribuir fortemente para o melhoramento genético dos efectivos melhorar o controlo das actividades reprodutora e produtiva, permitir a adopção das técnicas de manejo mais adequadas, aumentar a segurança física dos criadores, comportar grandes vantagens económicas e auxiliar na prevenção da transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (Mascarenhas & Simões, 2005; Bezerra, 2010a).

As principais desvantagens estão relacionadas com os custos dos equipamentos, a necessidade de infraestruturas que permitam a obtenção de bons resultados, a necessidade de pessoal especializado, a contaminação das fêmeas quando o sémen não é testado do ponto de vista sanitário e a redução da qualidade do rebanho se as características genéticas de um macho forem inferiores à média encontrada na população (Bezerra, 2010a).

4.1 – SELECÇÃO DAS FÊMEAS PARA IA

Os resultados da IA dependem de vários parâmetros, nomeadamente das características das fêmeas a inseminar. A sua selecção deve preencher alguns requisitos chave. As chibas que vão ser fecundadas pela primeira vez devem apresentar um peso corporal mínimo de 60% do peso médio das fêmeas adultas do rebanho. Uma boa fêmea reprodutora apresenta um padrão racial adequado, um bom desenvolvimento corporal, ausência de taras ou defeitos hereditários, ausências de doenças sexualmente transmissíveis, boa conformação do úbere, com simetria das duas metades e presença de apenas duas tetas, produção superior à média das fêmeas do rebanho, bom comportamento maternal, cascos e aprumos fortes e saudáveis, fertilidade comprovada e histórico de gestações de termo e de parto eutócico (Simplício & Simplício, 2006; citados por Bezerra, 2010a).

4.2 – RECOLHA E PRESERVAÇÃO DO SÉMEN

Neste estudo, a recolha de sémen e a sua preservação foi feita por uma entidade exterior ao IPB-ESA. Ainda assim entendeu-se adequado fazer uma breve referência a este assunto.

Na IA o sémen é, normalmente, transportado dos centros de recolha até às explorações onde vai ser usado. No caso de reprodutores de elevado valor genético, há que obter o maior número possível de doses seminais e conservá-las em boas condições pelo maior período de tempo possível (Pérez *et al.*, 2010).

Nos caprinos o sémen pode ser recolhido com o auxílio de uma vagina artificial ou de um electroejaculador. O método da vagina artificial é o mais popular uma vez que permite a criação de condições de temperatura, de pressão e de humidade similares às naturais, não causa grandes níveis de *stress*, é rápido, é simples e garante a obtenção de ejaculados de elevada qualidade. Implica o treino prévio dos bodes dadores. Nestes animais a electroejaculação é pouco utilizada. Esta baseia-se na estimulação eléctrica, via transrectal, dos centros nervosos que controlam a erecção e especificamente a ejaculação. Este método é utilizado em bodes não treinados, indisciplinados, com libido diminuída ou com qualquer outro problema que os impeça, temporária ou permanentemente de realizar a monta natural, que sejam férteis e possuam um elevado interesse genético (Castelo *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010).

Recolhida a amostra de sémen deve-se proceder rapidamente à avaliação dos seguintes parâmetros seminais: volume, cor, cheiro, viscosidade, motilidade massal e individual, percentagem de espermatozoides vivos, percentagem de espermatozoides normais e concentração espermática (Donovan *et al.*, 2001; Mascarenhas & Simões, 2005; Pérez *et al.*, 2010).

A IA pode ser feita com sémen fresco, refrigerado ou congelado. O sémen fresco deve ser utilizado até 2 horas pós-recolha. Deve ser mantido à temperatura de 30-33°C e pode ser puro ou diluído em meio adequado. Os diluidores seminais são soluções aquosas que permitem aumentar o volume do ejaculado até se obter a concentração desejada, mantendo a integridade e a funcionalidade das células espermáticas ou seja, a sua capacidade fertilizadora.

O sémen refrigerado é primeiramente diluído e depois é refrigerado a 5-8°C. A capacidade fertilizadora dos espermatozoides é prolongada através da redução reversível da sua motilidade e do seu metabolismo. Nas primeiras 48 horas de

refrigeração não ocorre uma diminuição significativa da motilidade. O sémen refrigerado pode ser usado até 96 horas sem que se produza uma redução significativa da taxa de fertilidade aparente. Neste sentido a refrigeração do sémen constitui um método eficaz de armazenamento a curto prazo ainda que apresente alguns efeitos deletérios sobre os espermatozoides: diminuição da taxa de viabilidade, da integridade estrutural, da motilidade e da taxa de fertilidade aparente (Baldassarre, & Karatzas, 2004; Bezerra, 2010b; Pérez *et al.*, 2010; Lemma, 2011).

O sémen congelado é processado em centros especializados. É congelado e armazenado em azoto líquido, à temperatura de -196°C , depois de acondicionado em palhinhas francesas de PVC (0,5 ml ou 0,25 ml), mini-palhinhas (0,25 ml) ou em *pellets* (1 ml). O sémen congelado pode ser conservado por extensos períodos de tempo (muito para lá da morte do macho dador), ser utilizado durante todo o ano e ser comercializado à escala mundial (Baldassarre & Karatzas, 2004).

4.3 – CRIOPRESERVAÇÃO DO SÉMEN

A criopreservação de sémen é uma importante biotecnologia reprodutiva pois possibilita a conservação do germoplasma masculino por tempo indeterminado. Quando associada à IA, torna-se num instrumento eficaz de promoção e difusão do material genético de excelente qualidade (Castelo *et al.*, 2008). É uma técnica complexa, cujos resultados dependem de factores como: características seminais, diluição, congelação e descongelação (Castelo *et al.*, 2008; Bezerra, 2010b). Segundo Dorado *et al.* (2010), a maior barreira à utilização de sémen congelado é o processo de congelação/dcongelação. Este ainda se traduz numa diminuição da percentagem de espermatozóides móveis e viáveis, devido aos danos que inflige quer a nível da sua ultra-estrutura quer da integridade da sua membrana.

Durante o processo de congelação/dcongelação podem surgir danos associados à refrigeração (*cold-shock*), ao *stress* osmótico, à toxicidade dos agentes crioprotectores e à formação e dissolução dos cristais de gelo (Pérez *et al.*, 2010).

A capacidade crioprotectora do glicerol foi descoberta acidentalmente (Pegg, 2002; citado por Bezerra, 2010b). Em 1948, Smith, Polge e Parks descobriram que o glicerol elevava a taxa de sobrevivência dos espermatozoides de aves, quando congelados a -70°C (Polge *et al.*, 1949, citados por Bezerra, 2010b). Essa descoberta

teve origem num erro de identificação da embalagem que continha glicerol, albumina e água; esperava-se que contivesse uma solução de frutose. O primeiro relato de sucesso na criopreservação de sémen de caprino foi feito, em 1950, por Polge e Smith (Bezerra, 2009).

O sémen de caprinos apresenta particularidades que o diferenciam do de outras espécies. A mais importante é, provavelmente, a síntese e a secreção de várias enzimas a partir das glândulas bulbo-uretrais que integram o plasma seminal. Estas enzimas possuem actividade fosfolipase e hidrolisam a lecitina em lisolecitinas e em ácidos gordos (produtos tóxicos para os espermatozoides). A lecitina é o fosfolípido mais abundante da membrana plasmática. Está também presente na gema-de-ovo. Nestes animais, a composição enzimática do sémen e a bioquímica dos diluidores é muito importante nos processos de conservação do sémen, refrigerado ou congelado (Leboeuf *et al.*, 2000; Castelo *et al.*, 2008; Simplício & Machado, 1989; citados por Bezerra, 2010b).

4.4 – TÉCNICAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Nos ovinos e nos caprinos (particularmente, nos primeiros), as pregas do canal cervical constituem um obstáculo natural à passagem do *pistolet* de inseminação e, conseqüentemente, à implementação da técnica de IA entre estes animais. Estas pregas são compostas por tecido cartilágneo de consistência rígida (Granados *et al.*, 2006).

Nos caprinos, a deposição das doses seminais pode ser feita a nível da vagina, do canal cervical e do útero (via cervical ou intrauterina, por laparoscopia). Na inseminação vaginal, o sémen é depositado no fundo do saco vagina. As taxas de fertilidade aparente são muito variáveis. Não é aconselhada quando se trabalha com sémen congelado. Na inseminação cervical o sémen é depositado no canal cervical. Frequentemente é possível ultrapassar a abertura do cérvix, mas não o canal cervical. Forçar a passagem pode provocar lesões na mucosa e a conseqüente invasão do lúmen por células de defesa e conseqüentemente baixar a taxa de fertilidade aparente. É o método mais comum. Determina boas taxas de fertilidade aparente, quando se utiliza sémen fresco ou refrigerado.

Na inseminação uterina, o sémen é depositado na cavidade uterina (corpo do útero). Só deve ser utilizado quando existe uma dilatação suficientemente boa do canal cervical. Deve-se procurar ultrapassar, delicadamente, as 4-6 pregas cervicais. Se não

for possível alcançar o corpo uterino, recomenda-se a deposição do sémen depois da 1-2ª prega cervical.

Na inseminação intra-uterina, após uma rápida localização do útero, realizada por laparoscopia, o sémen é injectado directamente nos cornos uterinos usando um *pistolet* e uma bainha próprios. Deste modo, evita-se a barreira cervical e eleva-se a taxa de fertilidade aparente. É particularmente útil quando a IA é feita com sémen congelado. Por outro lado, a dose seminal necessita de um número mais pequeno de espermatozoides - um ejaculado dá origem a um número mais elevado de doses seminais (difusão mais ampla de genótipos valiosos). Tem como desvantagens o facto de ser um método invasivo, de requer mão-de-obra especializada e do equipamento necessário ser caro (Chemineau *et al.*, 1997; Donovan *et al.*, 2001; ANCRAS, 2003; Bezerra, 2010a).

III – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1 – MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança mais precisamente na Quinta do Pinheiro Manso (Latitude 41° 48' 33''N, Longitude 6° 44' 3''W e Altitude 670 metros) pertencente ao Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária (IPB-ESA), entre Fevereiro e Junho de 2011.

1.1 – ANIMAIS

Na realização do presente trabalho foram utilizadas 65 cabras adultas (3-9 anos) da raça autóctone portuguesa Serrana ecótipo Transmontano (Figura 3), pertencentes ao rebanho experimental do IPB-ESA. Estas cabras foram alimentadas em pastoreio de prados naturais (*ad libitum*) e suplementadas diariamente com 300-400 g/animal de alimento concentrado comercial.



FIGURA 3– Ovelhas da raça Serrana, ecótipo Transmontano

1.2 – PESAGEM DOS ANIMAIS

O trabalho experimental iniciou-se a 22 de Fevereiro de 2011, com a pesagem de todas as cabras numa balança com jaula (sensibilidade mínima de 100 g).

1.3 – DETERMINAÇÃO DO ESTADO FISIOLÓGICO

A actividade ovárica inicial das cabras foi avaliada entre 22 de Fevereiro e 3 de Março de 2011, com um intervalo de 3 a 4 dias entre recolhas (avaliação pré-tratamento com melatonina). Entre 19 e 28 de Abril de 2011, a actividade ovárica foi novamente avaliada (avaliação pré-tratamento progestagénico). O mesmo foi feito 24 horas após a remoção das esponjas vaginais e, diariamente, nos 5 dias subsequentes (avaliação da actividade ovárica pós-tratamentos).

A avaliação da actividade ovárica foi feita através da determinação dos níveis plasmáticos de Progesterona (P_4). Para o efeito, procedeu-se à recolha de amostras de sangue com o auxílio de tubos de recolha de sangue vacuonizados e heparinizados, por punção da veia jugular (Figura 4). Depois de recolhido, o sangue foi centrifugado a 3000 r.p.m., durante 15 minutos. Procedeu-se então à separação do sobrenadante ou seja do plasma sanguíneo para posterior avaliação dos níveis plasmáticos de P_4 através da técnica de RIA (radioimunoensaio).

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



FIGURA 4– Recolha de amostras de sangue periférico

1.4 – INDUÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

No dia 10 de Março de 2011, o nosso grupo inicial (n=65) foram aleatoriamente divididas em dois grupos, o grupo da Melatonina (n=32) e o grupo Controlo (n=33). Nesse dia às cabras do grupo Melatonina foi colocado um implante subcutâneo de melatonina (18 mg) na base da orelha.

Cerca de cinquenta dias mais tarde (28 de Abril), as cabras do grupo Melatonina foram tratadas com uma injeção intra-muscular (i.m.) de 100 µg de PGF_{2α} e esponjas vaginais impregnadas com 20 mg de FGA (Figura 5). Nessa altura, as cabras do grupo Controlo (n = 33) também foram tratadas com uma injeção i.m. de 100 µg de PGF_{2α} e esponjas vaginais com 20 mg de FGA. O tratamento progestagénico teve uma duração de 5 dias.



FIGURA 5 – Colocação de esponjas vaginais

Quando da remoção das esponjas vaginais (3 de Maio), todas as cabras receberam uma injeção de 300 UI de eCG (Fig.6).

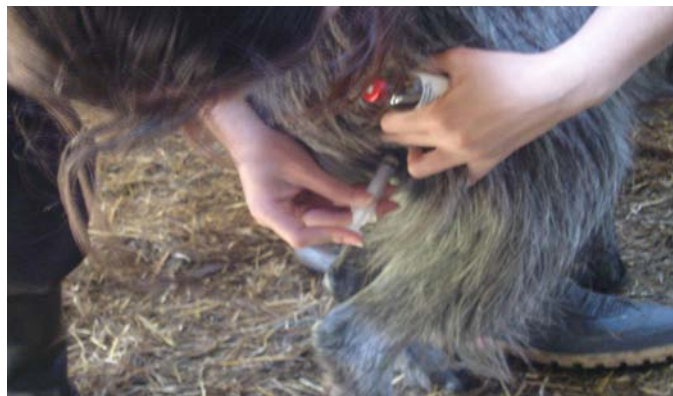


FIGURA 6– Aplicação da injeção de eCG

Posteriormente 15 cabras de cada um destes grupos (n = 30) – Controlo e Melatonina- foram seleccionadas, aleatoriamente, para serem inseminadas artificialmente com sémen congelado (grupo IA); as demais 35 foram beneficiadas por Monta Natural (grupo MN). Para o efeito foram utilizados 3 bodes adultos.



FIGURA 7– Aplicação da técnica de Inseminação Artificial via cervical (esquerda) e pormenor do pistolet, da bainha e da palhinha de inseminação contendo sémen descongelado (direita)

A IA foi realizada com sémen congelado, 43 + 1 horas após a remoção das esponjas vaginais (Figura 7). O sémen utilizado foi fornecido pela ANCRAS (Associação Nacional de Caprincultores da Raça Serrana). A seriação dos animais para a inseminação foi aleatória. O sémen foi depositado, maioritariamente, no canal cervical.

1.5 – DETECÇÃO DE CIOS

Quando da remoção das esponjas vaginais, no grupo MN, 3 bodes inteiros munidos de arneses marcadores foram colocados junto das cabras, para detecção dos cios. A identificação e o registo dos cios foram feitos duas vezes por dia, de manhã e de tarde. Os bodes permaneceram junto das cabras durante sete dias. Foram retirados por um período de dez dias. Posteriormente, voltaram a ser integrados na cabrada.

As cabras do grupo IA foram inicialmente separadas e colocadas num espaço contíguo, onde aguardaram até à aplicação da técnica. Voltaram a ser misturadas com as cabras do grupo MN, imediatamente antes dos bodes serem reintroduzidos na cabrada.

1.6 - DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Quarenta e um dias após a realização da IA, todas as cabras foram sujeitas a diagnóstico de gestação por ultrasonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo ALOKA SSD-500 e de uma sonda rectal de 5 MHz. Este diagnóstico foi realizado, separadamente, por dois técnicos diferentes um da ANCRAS e o outro do IPB-ESA.

1.7 – DADOS DO PARTO

A data de parto de todas as cabras foi registada, assim como o número de crias nascidas por fêmea. De seguida calcularam-se as taxas de fertilidade aparente, de prolificidade e de fecundidade.

1.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

No sentido de identificar diferenças estatisticamente significativas entre alguns parâmetros, efectuaram-se análises de variância (Steel & 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 Qui-quadrado (χ^2) (Snedecor & Cochran, 1980).

IV – RESULTADOS

1 – IDADE E PESO CORPORAL

No início deste estudo, o peso médio das cabras era de $47,0 \pm 5,9$ kg (c.v. = 12,6%). A sua idade média era de $5,1 \pm 1,7$ anos (c.v. = 33,3%) (Quadro I). Nem o peso, nem a idade afectaram significativamente nenhum dos parâmetros reprodutivos avaliados ($P > 0,05$).

QUADRO 1– Valores máximos e mínimos da idade e peso das cabras estudadas

	Idade (anos)	Peso (kg)
Mínimo	3	34,5
Máximo	9	62,0

2 – ACTIVIDADE OVÁRICA

Entre 22 de Fevereiro e 3 de Março, antes da colocação dos implantes subcutâneos de melatonina, 49,2% ($n = 32$) das cabras apresentaram níveis plasmáticos de P_4 superiores a 0,5 ng/ml (Quadro II). As demais 50,8% ($n = 33$) estavam em anestro sazonal. Resultados semelhantes foram registados por Simões *et al.* (2005) - 63,6% ($\chi^2 = 3,458$; $P > 0,05$). Esta percentagem foi mais elevada no estudo levado a cabo por Azevedo *et al.* (2002) - 87,5% ($\chi^2 = 32,292$; $P \leq 0,001$). Aparentemente, quando do início do presente trabalho, a estação de anestro sazonal das cabras Serranas já havia começado (mais de 50% das cabras apresentaram sempre níveis plasmáticos de progesterona inferiores a 0,5 ng/ml), ainda que uma elevada percentagem delas continua-se a apresentar actividade ovárica "completa".

QUADRO 2– Percentagem de cabras que apresentaram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml, antes dos tratamentos de melatonina e de PGF_{2α} + FGA + eCG

	Pré-melatonina	Pré-PGF_{2α} + FGA + eCG
Controlo	49,2% ^a	6,1% ^a
Melatonina	-	71,9% ^b

a ≠ b, para P ≤ 0,001 (mesma coluna).

Entre 19 e 28 de Abril, antes do tratamento com PGF_{2α} + FGA + eCG, 6,1% (n = 2) das cabras Controlo apresentava níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml (Quadro II). Nos estudos realizados por Correia *et al.* (2006, 2007, 2009) e Valentim *et al.* (2010), nenhuma cabra Serrana o fez ($\chi^2 = 6,186$; P < 0,05). Neste período, a percentagem de cabras Serranas em anestro sazonal era superior à observada no início do estudo. O tratamento com melatonina resultou numa maior percentagem de cabras com níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml - 71,9% (n = 23) ($\chi^2 = 91,551$; P < 0,001), ou seja, este tratamento mostrou-se eficaz na promoção da actividade ovárica "completa". Resultado idêntico foi observado por Azevedo *et al.* (2003), num estudo com chibas da mesma raça.

Cerca de 80,0% (n = 52) das cabras estudadas apresentaram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml, pós-tratamentos aplicados. Destas, 81,3% (n = 27) pertenciam ao grupo Controlo e 78,1% (n = 25) ao grupo Melatonina ($\chi^2 = 0,276$; P > 0,05) (Quadro III). No trabalho desenvolvido por Azevedo *et al.* (2002), a administração de melatonina exógena, associada a um tratamento FGA + eCG, determinou um aumento significativo da percentagem de cabras Serranas com níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml. Nas chibas, o uso de melatonina exógena promove igualmente um acréscimo significativo da percentagem de fêmeas que mostram actividade ovárica "completa" (Azevedo *et al.*, 2003).

QUADRO 3– Percentagem de cabras que apresentaram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml, manifestações de cio e diagnóstico de gestação positivo pós-tratamentos

	Progesterona elevada	Cio	Gestantes
Controlo	81,3% ^a	83,3% ^a	78,8% ^a
Melatonina	78,1% ^a	94,1% ^b	78,1% ^a
Média	80,0%	88,6%	78,5%

a = a, para P>0,05 (mesma coluna)

a ≠ b, para P≤0,05 (mesma coluna).

A percentagem de cabras que apresentaram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml não apresentaram diferenças significativas entre os grupos MN e IA – 82,9% (n = 29) vs. 76,7% (n = 23) ($\chi^2 = 1,125$; P> 0,05). Neste sentido, possíveis diferenças reprodutivas, entre as cabras dos grupos MN e IA, não resultam de diferenças na percentagem de cabras que produziram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml.

3 – MANIFESTAÇÕES DE CIO

Cerca de 88,6% (n = 31) das cabras do grupo MN manifestaram sinais detectáveis de cio (Quadro III). Destas, 83,3% (n = 15) pertenciam ao grupo Controlo e 94,1% (n = 16) ao grupo Melatonina ($\chi^2 = 5,944$; P≤0,05). Estes resultados indicam que o tratamento prévio com melatonina exógena influenciou positivamente a percentagem de cabras que apresentaram cio. O mesmo verificou-se no trabalho de Azevedo *et al.* (2002).

4 – DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Quarenta e um dias após o término dos tratamentos, o diagnóstico de gestação foi positivo em 78,5% (n = 51) das cabras estudadas. Cerca de 78,8% (n = 26) pertenciam ao grupo Controlo e 78,1% (n = 25) ao grupo Melatonina ($\chi^2 = 0,000$; P> 0,05). Ao que tudo indica, a administração de melatonina exógena não afectou significativamente a percentagem de cabras com diagnóstico de gestação positivo.

A percentagem de cabras com diagnóstico de gestação positivo foi maior entre as cabras do grupo MN do que entre as cabras do grupo IA – 85,7% (n = 30) vs. 70,0% (n = 21) ($\chi^2 = 7,459$; $P \leq 0,01$). Este resultado era já esperado, pois sabe-se que a IA origina, frequentemente, uma perda da fertilidade, mesmo quando se trabalha com sémen fresco. No estudo realizado por Correia *et al.* (2007), a percentagem de cabras gestantes após IA com sémen refrigerado foi de 80,0% ($\chi^2 = 2,667$; $P > 0,01$). Já no trabalho de Valentim *et al.* (2010), a IA com sémen refrigerado resultou numa percentagem de cabras gestantes de 54,5% ($\chi^2 = 5,433$; $P \leq 0,05$). Os resultados com sémen congelado são, normalmente, mais modestos (ver adiante).

5 – PARÂMETROS REPRODUTIVOS: TAXA DE FERTILIDADE APARENTE, DE PROLIFICIDADE E DE FECUNDIDADE

Neste estudo, a taxa de fertilidade aparente foi de 61,5% (n = 40), a taxa de prolificidade de 2,1 e a de fecundidade de 130% (Quadro IV). No total, nasceram 84 crias.

QUADRO 4– Taxas de fertilidade, prolificidade e de fecundidade das cabras dos diferentes grupos

Grupo	Controlo	Melatonina	Monta Natural	Inseminação Artificial
Fertilidade Aparente	57,6% ^a	65,6% ^a	88,6% ^a	30,0% ^b
Prolificidade	2,1 ^a	2,0 ^a	2,2 ^a	1,8 ^a
Fecundidade	121,2%	137,5%	194,3%	53,3%

a=a, para $P > 0,05$ (entre colunas, mesmo tratamento)

a≠b, para $P \leq 0,001$ (entre colunas, mesmo tratamento).

A administração de melatonina exógena não condicionou significativamente as taxas de fertilidade aparente e de prolificidade. No estudo de Azevedo *et al.* (2002), o tratamento com melatonina exógena originou um aumento das taxas de fertilidade aparente e de prolificidade.

A IA traduziu-se numa redução significativa da taxa de fertilidade aparente; já a taxa de prolificidade manteve-se inalterada. No estudo de Correia *et al.* (2007), a IA com sémen refrigerado, realizada após tratamento progestagénico (sem administrar melatonina exógena), originou uma taxa de fertilidade aparente de 60% e de

prolificidade de 2,0. Correia *et al.* (2006) referem uma taxa de prolificidade de 2,0. Valentim *et al.* (2010) de 1,8. De acordo com Ritar *et al.* (1983), Lebouef *et al.* (2003) e Dorado (2007) (citados por Bezerra, 2009), o processo de congelação/descongelação do sémen de caprino reduz a sua viabilidade e a taxa de fertilidade aparente das fêmeas inseminadas. Nesta espécie, após IA com sémen congelado, os valores desta taxa variam entre 30 e 70% (Bezerra, 2009). Barbas *et al.* (2005), trabalhando com sémen congelado de bodes da raça Serrana (ecótipo Transmontano), constatou uma taxa de fertilidade aparente média de 27%, uma taxa de prolificidade média de 2,1 e uma taxa de fecundidade média de 56%.

Entre o diagnóstico de gestação (41 dias pós-término dos tratamentos) e o parto, a percentagem de fêmeas "gestantes" diminuiu significativamente (78,5% vs. 61,5%) ($\chi^2 = 6,948$; $P < 0,01$). Tendo em conta que o diagnóstico de gestação foi feito, separadamente, por dois técnicos experientes, de duas entidades diferentes (IPB-ESA e ANCRAS), esta diferença parece resultar de morte fetal. A morte fetal pode estar relacionada com os tratamentos aplicados, do manejo a que as fêmeas estiveram sujeitas (nomeadamente alimentar) ou de problemas sanitários.

V – CONCLUSÕES

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

- Entre 22 de Fevereiro e 3 de Março, 50,8% das cabras Serranas estavam em anestro.
- Entre 19 e 28 de Abril, 93,9% das cabras do grupo Controlo estavam em anestro sazonal.
- Depois de aplicados todos os tratamentos, 80,0% das cabras estudadas apresentaram níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml.
- A administração de melatonina exógena não afectou significativamente a percentagem de cabras que apresentou actividade ovárica "completa" (Controlo: 81,3% vs. Melatonina: 78,1%).
- Cerca de 88,6% das cabras do grupo Monta Natural (MN) manifestaram cio.
- O tratamento de melatonina resultou numa maior percentagem de cabras que apresentaram cio (Controlo: 83,3% vs. Melatonina: 94,1%).
- Quarenta e um dias depois de terminados os tratamentos, o diagnóstico de gestação foi positivo em 78,5% das cabras estudadas.
- A aplicação de melatonina não influenciou significativamente a percentagem de cabras que tiveram um diagnóstico positivo (Controlo: 78,8% vs. Melatonina: 78,1%).
- A Inseminação artificial (IA) determinou uma redução da percentagem de cabras com diagnóstico de gestação positivo (MN: 85,7% vs. IA: 70,0%).
- A taxa de fertilidade aparente foi de 61,5%, a taxa de prolificidade de 2,1 e a de fecundidade de 130%.
- A administração de melatonina exógena não condicionou significativamente as taxas de fertilidade aparente (Controlo: 57,6% vs. Melatonina: 65,6%) e de prolificidade (Controlo: 2,1 vs. Melatonina: 2,0).

- A IA causou uma redução significativa da taxa de fertilidade aparente (MN: 88,6% vs. IA: 30,0%); já a taxa de prolificidade manteve-se inalterada (MN: 2,2 vs. IA: 1,8).
- Entre o diagnóstico de gestação e o parto, a percentagem de fêmeas "gestantes" diminuiu significativamente (78,5% vs. 61,5%).

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemayehu, L., 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. *In: Artificial Insemination in Farm Animals*. Milad Manafi (Ed.), InTech, Rijeka, Croácia, 300 pp.
- Azevedo, J.M.; Correia, T.M.; Almeida, J.C.; Valentim, R.C.; Fontes, P.; Coelho, A., 2002. Interrupção do anestro sazonal em cabras da raça Serrana, ecótipo Transmontano, recorrendo a tratamentos hormonais. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 97 (543): 135-138.
- Azevedo, J.M.; Correia, T.M.; Almeida, J.C.; Valentim, R.C.; Fontes, P.J.; Galvão, L.; Mendonça, A.; Coelho, A., 2003. Utilización de dos gonadotropinas en el control de la actividad ovárica inducida con implantes de melatonina en chivas de la raza Serrana. *In: Ponencias y Comunicaciones del IV Congreso Ibérico de Reproducción Animal*, Arucas (Las Palmas de Gran Canaria), Espanha, 70.
- Baldassarre, H. & Karatzas, C. N., 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science* 82–83, 255–266.
- Barbas, J. P.; Horta, A. E. M.; Marques, C. M.; Baptista, M. C.; Vasques, M. I.; Mascarenhas, R. D.; Pereira, R. M.; Gonçalves, S. C., 2005. Influência da época do ano sobre a congelabilidade do sêmen de bode da raça Serrana e a sua capacidade fertilizante in vivo e in vitro. Relatório final do Projecto PIDDAC nº 842, EZN – INIAP. Estação Zootécnica Nacional. Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas.
- Bezerra, F.S.B., 2009. Criopreservação do Sêmen Caprino: Efeito de Diferentes Palhetas, taxas de Descongelamento e Crioprotetores. Mossoro – RN – Brasil
- Bezerra, F.S.B., 2010a. Inseminação artificial em caprinos. *Acta Veterinária Brasília*, v. 4 (Supl), S26-S29.
- Bezerra, F.S.B., 2010b. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelamento. *Acta Veterinária Brasília*, v. 4 (Supl), S20-S25.
- Chemineau, P., 1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing Creole goats to the male at three times of the year. *Journal of Reproduction and Fertility*, 67, 65-72.

Citado por Pellicer-Rubio, M-T., Lebouef, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J. L., Bonné, J. L., Senty, E.; Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induce by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Journal of Animal Reproduction Science*, 98:241-258.

Chemineau, P.; Baril, G.; Lebouef, B.; Maurel, M. C.; Cognie, Y., 1997. Recent Advances in the Control of Goat Reproduction. *CIEHEAM – Options Mediterraneennes*, v.25. IAMZ, Zaragoza.

Chemineau, P.; Cagnié, Y.; Guérin, Y.; Orgeur, P.; Vallet, J. C., 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. *FAO Animal Production and Health Paper*.

Chemineau, P.; Malpoux, B.; Pelletier, J.; Leboeuf, B.; Delgadillo, J.A.; Deletang, F.; Pobel, T.; Brice, G., 1996. Emploi des implantés de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Production Animal*, 9, 45-60. Citado por Pellicer-Rubio, M-T., Lebouef, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J. L., Bonné, J. L., Senty, E.; Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induce by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Journal of Animal Reproduction Science*, 98:241-258.

Chemineau, P.; Normant, E.; Ravault, J.P.; Thimonier, J., 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goats after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonii and the male effect. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78, 497-504. Citado por Pellicer-Rubio, M-T., Lebouef, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J. L., Bonné, J. L., Senty, E.; Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induce by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Journal of Animal Reproduction Science*, 98:241-258.

- Constantinescu, G. M. & Constantinescu, I. A., 2010. Functional anatomy of the goat. *In* Solaiman S.G., 2010. Goat Science and Production. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 425 pp.
- Correia, T.; Azevedo, J.; Valentim, R.; Almeida, J.; Galvão, L.; Simões, J.; Maurício, R.; Fontes, P.; Mendonça, A.; Medeiros, S., 2006. Administração de diferentes doses de eCG na sincronização de cios de cabras da raça Serrana no início da estação reprodutiva. *In*: I Reunião Nacional de Caprinicultura, Bragança, Portugal, 66-69.
- Correia, T.; Azevedo, J.; Valentim, R.; Simões, J.; Galvão, L.; Fontes, P.; Mendonça, A.; Velasco, H.; Maurício, R.; Cardoso, M.; Medeiros, S., 2007. Administración de diferentes dosis de eCG en la sincronización del celo en cabras de raza Serrana al principio de la estación reproductiva. *In*: Producción Ovina y Caprina nº XXXII, XXXII Jornadas Científicas y XI Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Maiorca, Espanha, 321-323.
- Correia, T.; Azevedo, J.; Simões, J.; Galvão, L.; Fontes, P.; Mendonça, A.; Almeida, J.; Velasco, H.; Maurício, R.; Cardoso, M.; Valentim, R., 2009. Aplicación de tratamientos com diferentes duraciones en el control de la actividad ovárica de cabras de raça Serrana. XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC). Comunicaciones.
- Corteel, J.M., Leboeuf, B.; Baril, G., 1988. Artificial breeding of adult goats and kids. induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Research*, 1: 19-35. Citado por Bezerra, 2009. Criopreservação do Sêmen Caprino: Efeito de Diferentes Palhetas, taxas de Descongelção e Crioprotetores. Mossoro – RN – Brasil. Citado por Bezerra, F.S.B., 2009. Criopreservação do Sêmen Caprino: Efeito de Diferentes Palhetas, taxas de Descongelção e Crioprotetores. Mossoro – RN – Brasil
- Devendra, C. & Solaiman, S.G., 2010. Perspectives on goat and global production. *In* Solaiman S.G., 2010. Goat Science and Production. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 425 pp.

- Donovan, A.; Hanrahan, J.P.; Lally, T.; Boland, M.P.; Byrne, G.P.; Duffy, P.; Lonergan, P.; O'Neill, D. J., 2001. AI for sheep using frozen-thawed semen. End of Project Report. ARMIS 4047. ISBN 1 84170 1521.
- Dorado, J., Rodriguez, I.; Hidalgo, M., 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68: 168-177. Citado por Bezerra, F.S.B., 2009. Criopreservação do Sêmen Caprino: Efeito de Diferentes Palhetas, taxas de Descongelamento e Crioprotetores. Mossoro – RN – Brasil.
- Dorado, J., Muñoz-Serrano, A.; Hidalgo, M., 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science*, 121: 115-123.
- Dunn, O.J.. 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, 56, 52-64.
- Espescht, C. J. B., 1998. Alternativas para controle da estacionalidade reprodutiva de cabras leiteiras. V – ENDEC – 23 e 24 Outubro.
- Fatet, A.; Pellicer-Rubio, M-T.; Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124, 211-219.
- Ferrari, S., Leinz, f.; Barnabe, V.H., 1988. Inseminação artificial em cabras com sêmen congelado: resultados preliminares. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo, v. 35, n. 5: 223-224.
- Freitas, V. J. F.; Baril, G.; Saumande, J., 1997. Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorgestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implantes. *Animal Reproduction Science*, 46, 237-244.
- Granados, L. B. C.; Dias, A. J. B.; Sales, M. P., 2006. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos. 1ª ed. Campos dos Goytacazes. Projeto PROEX/UENF.

- Greyling, J., 2010. Applied Reproductive Physiology. *In* Solaiman S.G., 2010. Goat Science and Production. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 425 pp.
- Gurung, N. K. & Solaiman, S. G., 2010. Goat Breeds. *In* Solaiman S.G., 2010. Goat Science and Production. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 425 pp.
- Hafez, E. S. E. & Hafez, B., 2004. Reprodução Animal. 7^a ed. Editora Manole Ltda. Brasil. 513 pp.
- Leboeuf, B.; Manfredi, E.; Boue, P.; Piacère, A.; Brice, G.; Baril, G.; Broqua, C.; Humblot, P.; Terqui, M., 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Production Science*, 55: 193–203.
- Leboeuf B., Restall B.; Salamon S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62: 113–141.
- Leboeuf, B., Forgerit, Y., Bernelas, D., Pougarda, J.L., Sentya, E.; Driancourt, M.A. 2003. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, 60: 1371–1378. Citado por Bezerra, F.S.B., 2009. Criopreservação do Sêmen Caprino: Efeito de Diferentes Palhetas, taxas de Descongelamento e Crioprotetores. Mossoro – RN – Brasil
- Mascarenhas, R. & Simões, J., 2005. Inseminação artificial em caprinos de raças autóctones. *ANCABRA*, 7, 11-14.
- Mascarenhas, R., 2006. Melhoramento da eficiência reprodutiva em caprinos de raças nacionais. *In*: I Jornadas Nacionais de Caprinicultura, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 51-65.
- Miranda, F., F. & Martínez, A., A., 2010. Manejo reproductivo en Ganado ovino. Servet editorial – Grupo Asís Biomedica, S.L.
- Morrell, J.M., 2011. Artificial insemination: current and future trends. *In*: Artificial Insemination in Farm Animals, Milad Manafi (Ed.), InTech, Rijeka, Croácia, 300 pp.

- Pegg, D.E., 2002. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, 20: 5-13. Citado por Bezerra, F.S.B., 2010b. Conservação do sémen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Veterinária Brasílica*, v. 4 (Supl), S20-S25.
- Pellicer-Rubio, M-T., Lebouef, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J. L., Bonné, J. L., Senty, E.; Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induce by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Journal of Animal Reproduction Science*, 98:241-258.
- Polgue, C.; Smith, A.U. & Parkes, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-666. Citado por Bezerra, F.S.B., 2010b. Conservação do sémen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Veterinária Brasílica*, v. 4 (Supl), S20-S25.
- Raposo, A.F.R., 2011. Utilização da modulação do fotoperíodo e da suplementação lipídica sobre o efeito macho na indução e sincronização do estro em caprinos. Dissertação de mestrado - Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Restall, B.J., 1992. Seasonal variation in reproductive activity in Australian goats. *Journal of Animal Reproduction Science*, 27, 305-318. Citado por Pellicer-Rubio, M-T., Lebouef, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J. L., Bonné, J. L., Senty, E.; Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induce by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Journal of Animal Reproduction Science*, 98:241-258.
- Ritar, A.J.& Salamon, S., 1983. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Australian Journal Biological Sciences*, 36: 49-59. Citado por Bezerra, F.S.B., 2009. Criopreservação do Sêmen Caprino: Efeito de Diferentes Palhetas, taxas de Descongelação e Crioprotetores. Mossoro – RN – Brasil

- Shrestha, J.N.B. & Galal, S., 2010. Conservation of Goat Genetic Resources. *In* Solaiman S.G., 2010. Goat Science and Production. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 425 pp.
- Simões J.& Mascarenhas R., 2004. Aspectos comparativos da sazonalidade e do ciclo éstrico da cabra. Série didáctica – Ciências Aplicadas; 256. 1ª edição. Sector Editorial dos SDE da UTAD. Vila Real. 81 pp. Citado por Raposo, A.F.R., 2011. Utilização da modulação do fotoperíodo e da suplementação lipídica sobre o efeito macho na indução e sincronização do estro em caprinos. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Simões J.; Mascarenhas R.; Baril, G., 2008. Inseminação artificial em caprinos. E-Book para técnicos de expressão Portuguesa
- Simplício, A.A. & Machado, R., 1989. Tecnologia de sémen e inseminação artificial na espécie caprina. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8.,Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: CBRA, p. 171-177. Citado por Bezerra, F.S.B., 2010b. Conservação do sémen caprino sob refrigeração ou congelação. Acta Veterinária Brasília, v. 4 (Supl), S20-S25.
- Simplício, A.A. & Simplício K.M.M.G., 2006. Manejo reprodutivo de caprinos leiteiros em regiões tropicais. In Lima, G.F.C.; Holanda Júnior, E.V.; Maciel, F.C.; Barros, N.N.; Amorim, M.V. and Confessor Júnior, A.A. Criação familiar de caprinos e ovinos no Rio Grande do Norte: Orientações para viabilização do negócio rural. EMATER-RN/EMBRAPA CAPRINOS. 426. Citado por Bezerra, F.S.B., 2010a. Inseminação artificial em caprinos. Acta Veterinária Brasília,v. 4 (Supl), S26-S29.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, IA, EUA, 185 pp.
- Steel, R.G.D. & Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Company. 2ª Edição, Nova Iorque, EUA, xxi-633 pp..
- Traldi, A. S.; Loureiro, M. F. P.; Capezzuto, A. E; Mazora, A. L., 2007. Métodos de controle da atividade reprodutiva em caprinos. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 31, nº2, 254-260.

- Valentim, R.C.; Correia, T.M.; Azevedo, J.M., 2006. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, 2 (6), 18-22.
- Valentim, R.; Azevedo, J.; Mendonça, A.; Fontes, P.; Velasco, H.; Maurício, R.; Cardoso, M.; Correia, T., 2010. Tratamientos cortos con diferentes dosis de FGA a finales de la estación de anestro de cabras de raza Serrana. *In: XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Valladolid, Espanha, 207-210.
- Vitaliano, A., B., 2011. Avaliação do comportamento reprodutivo caprino e ovino com o uso do efeito macho interespecie. Dissertação mestrado - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.
- Walkden-Brown, S.W.; Martin, G.B.; Restall, B.J., 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *Journal Reproduction Fertility Supplement*, 52, 243-257. Citado por Pellicer-Rubio, M-T., Lebouef, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougard, J. L., Bonné, J. L., Senty, E. and Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induce by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Journal of Animal Reproduction Science*, 98:241-258.