



**Ensaio da Actividade Reprodutiva e Inseminação Artificial de  
Cabras da Raça Serrana – Ecótipo Transmontano – em maio**

**Avaliação dos efeitos da dose de eCG, do diluidor e do  
processo de preservação do sémen**

**Ana Sofia Mendes Leão**

*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**

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança**

**2017**

*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 mencionada 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 eletrónica 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**

No fim de mais uma longa e difícil caminhada, eis que chega a altura de demonstrar toda a minha gratidão, por todas as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui, e que sempre me incentivaram a continuar.

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim, sem dúvida alguma que todo o seu apoio foi essencial no meu percurso académico. Um obrigada do fundo do coração, por toda a sua ajuda, paciência e compreensão. Obrigada por me ter feito acreditar de que eu era capaz.

A todos os docentes do Mestrado de Tecnologia da Ciência Animal, em particular aos Professores Doutores Raimundo Maurício, Alfredo Teixeira, Hélder Quintas e Teresa Correia, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e compreensão.

Ao Hospital Veterinário do Porto, e em particular ao Professor Dr. Luís Lobo e à Dr.<sup>a</sup> Joana Garrido, a todos os médicos veterinários, às enfermeiras e auxiliares que integram a equipa, pela preciosa ajuda e por tudo fazerem para que eu pudesse continuar a frequentar as aulas de mestrado.

Agradeço também aos companheiros que estiveram do meu lado nesta jornada. De modo particular, à Dânia, ao Carlos, à Denise, à Filipa, ao Pedro Regadas, à Ana Rafaela e à Marina Dendena.

Quero também agradecer ao Óscar Mateus, pelos ensinamentos transmitidos, e por toda a sua ajuda e incentivo na realização deste Mestrado. Foi sem dúvida uma ajuda fundamental.

Obrigada aqueles que sempre me ampararam nas horas menos boas, que sempre tiveram aquela palavra amiga e apoio na hora certa, que me fizeram ver que independentemente dos obstáculos eu iria conseguir. Um muito obrigada ao Luís Silva, à “Tia Céu” (Céu Matos), à querida Ana Isabel, à Joana Correia, à Nathália Barbosa, à Clara, à Rita Borges, Marisa Trigo, Luís Carlos, à Tânia, ao Ricardo Neto, ao Ricardo Sousa e à Elsa Lopes.

Em especial queria agradecer aos meus pais e às minhas irmãs, por todo o apoio que me dão e por fazerem de mim uma pessoa feliz, cheia de sonhos, e muito grata a eles e à vida.

A toda a minha família, que sem dúvida é um pilar muito importante.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta tese.

## RESUMO

A técnica de inseminação artificial (IA) revolucionou a produção de várias espécies animais, não apenas em termos de gestão e organização, mas principalmente na melhoria do valor genético dos efectivos animais. Com o sémen de alguns machos melhoradores é possível inseminar milhares de fêmeas por ano, em qualquer parte do Mundo.

Esta técnica está bem implantada em países como a Federação Russa, França, Austrália, Nova Zelândia, China, Brasil e Argentina, e mais recentemente, tem-se expandido particularmente nos países do Leste Europeu. Nestes países, ela está integrada em programas de melhoramento genético animal. Em Portugal a IA encontra-se muito pouco difundida, fundamentalmente, devido à idade dos criadores, aos sistemas de exploração, à dimensão dos efectivos, à falta de meios técnicos e aos custos.

A revisão bibliográfica da presente dissertação incidiu sobre diferentes aspectos da aplicação da técnica de IA em pequenos ruminantes de modo a realçar algumas das semelhanças e das diferenças entre a IA em ovinos e em caprinos.

O trabalho prático procurou alcançar vários objectivos: avaliar a eficiência de protocolo progestagénico “curto” (PGF<sub>2α</sub> + FGA) e os efeitos da aplicação de duas doses de eCG (300 UI e 500 UI) na sincronização do cio de cabras da raça Serrana, ecótipo Transmontano, no mês de abril. Simultaneamente avaliou-se os efeitos de diferentes factores (dose de eCG, método de preservação do sémen, diluidores seminais, cor da mucosa e grau de lubrificação vaginal, local de deposição do sémen e refluxo cervical pós IA), sobre a taxa de fertilidade das cabras Serranas, ecótipo Transmontano.

Em meados de abril todas as cabras estudadas estavam cíclicas. Cerca de 94,2% das cabras responderam aos tratamentos aplicados, sem efeito significativo da dose de eCG administrada. Aos 40 dias de gestação a taxa de fertilidade foi de 74,6%, não foi afetada pela dose de eCG, pelo método de preservação do sémen e pelos diluidores seminais. Todavia a cor da vagina e o grau de lubrificação vaginal, o local de deposição do sémen e o refluxo cervical afectaram significativamente a taxa de fertilidade.

**Palavras-passe:** Caprinos, Serrana, eCG, inseminação artificial.

## **ABSTRACT**

The artificial insemination (AI) technique changed Animal Production, not only for organization and management issues, but mainly because it improved rapidly the genetic value of many animal flocks. Several genetic superior males' ejaculates may inseminate thousands of females per year and around the world.

This technique is well implanted in several countries: Russian Federation, France, Australia, New Zealand, China, Brasil and Argentina and more recently particularly in Eastern Europe. In all this countries its part of animal genetic improvement programs. AI has almost no meaning in Portugal, mainly for breeder' age, animal production systems, flocks size, lack of certified labs, well prepared technicians and costs.

The monography presents several issues associated to the application of this technique to small ruminants and to elucidate similarities and differences between sheep and goat AI techniques.

This study had several goals: assess the efficiency of a short-term progestogens treatment and the effects of different eCG doses (300 UI vs. 500 UI) to synchronize estrus in Serrana, ecotype Transmontano, goats in Abril. Simultaneously it was evaluated the effect of several different parameters in the fertility rate (eCG doses, semen preservation methodology, semen extenders, vagina mucous color, vaginal lube level, semen deposition place and cervical reflow).

By mid-April all Serrana goats were cyclic. About 94.2% of these goats responded to synchronization protocols, with no significant effect of eCG dose. Forty days after AI the fertility rate was of 74.6% with no significant effect of eCG dose, semen preservation methodology and semen extender. However vagina mucous color, lube level, semen deposition place and cervical reflow affected significantly the fertility rate.

**Key-words:** Goats, Serrana, eCG, artificial insemination.

## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VII
Abstract .....	VIII
Índice geral .....	IX
Lista de quadros .....	XI
Lista de abreviaturas .....	XII
I – Introdução .....	1
1 – Sanidade na inseminação artificial .....	4
1.1 – Contaminações víricas .....	5
1.2 – Contaminações bacterianas .....	7
1.3 – Antibióticos presentes nos diluidores seminais .....	7
2 – Controlo reprodutivo .....	7
2.1 – Métodos de controlo da actividade reprodutiva.....	9
3 – Inseminação artificial .....	12
3.1 – Factores que afectam a resposta à inseminação artificial .....	12
3.1.1 – Fotoperíodo .....	13
3.1.2 – Alimentação .....	13
3.1.3 – Idade .....	14
3.1.4 – Frequência de recolha de amostras de sémen.....	14
3.1.5 – Métodos de colheita de sémen .....	15
3.1.5.1 – Vagina artificial.....	16
3.1.5.2 – Electroejaculação .....	17
3.1.6 – Composição do sémen.....	17
3.1.7 – Diluidores seminais .....	20
3.1.8 – Sémen fresco, refrigerado ou congelado .....	22
3.1.9 – Local de deposição do sémen no tracto genital feminino .....	27
3.1.9.1 – Vaginal .....	28
3.1.9.2 – Cervical .....	28
3.1.9.3 – Intra-uterina.....	29
II – Trabalho Experimental .....	31
1 – Material e métodos.....	31

1.1 – Animais .....	31
1.2 – Avaliação da actividade ovária .....	31
1.2.1 – Inicial.....	31
1.2.2 – Pós-tratamentos aplicados .....	32
1.3 – Tratamentos aplicados .....	32
1.4 – Recolha de sémen .....	33
1.5 – Análises seminais.....	33
1.6 – Doses seminais.....	33
1.7 – Inseminação artificial a tempo fixo .....	35
1.8 – Diagnóstico de gestação.....	35
1.9 – Análise estatística .....	35
2 – Resultados e discussão .....	36
2.1 – Estado fisiológico pré-tratamentos progestagénicos.....	36
2.2 – Resposta ovária aos tratamentos progestagénicos curtos.....	37
2.3 – Resposta à inseminação artificial.....	38
2.3.1 – Dose de eCG.....	38
2.3.2 – Método de preservação.....	38
2.3.3 – Diluidores seminais .....	39
2.3.4 – Cor da mucosa vaginal .....	39
2.3.5 – Lubrificação vaginal.....	39
2.3.6 – Local de deposição do sémen.....	40
2.3.7 – Refluxo cervical .....	40
3 – Conclusões .....	42
III – Referências Bibliográficas .....	43

## LISTA DE QUADROS

QUADRO I - Divisão das cabras segundo os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva.....	32
QUADRO II -Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com Andromed® ou com INRA 96® aplicadas .....	34
QUADRO III - Idade, peso corporal e condição corporal (CC) das cabras, segundo a dose de gonadotropina, o processo de preservação e o tipo de diluidor.....	36
QUADRO IV - Cor da mucosa vaginal quando da inseminação artificial e a sua relação com a taxa de fertilidade.....	39
QUADRO V - Local da deposição do sémen e sua relação com a taxa de fertilidade...	40
QUADRO VI - Refluxo seminal e sua relação com a taxa de fertilidade .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

% – Por cento

ANCRAS – Associação Nacional de Caprinicultores da Raça Serrana

ART – Tecnologia de Reprodução Assistida

c.v. – Coeficiente de Variação

CAEV – Artrite Encefalite Caprina Viral

CIDR – *Controlled Internal Drug Release*

CL – Corpo Lúteo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

eCG – Gonadotropina Coriônica Equina

FGA – Acetato de Fluorogestona

FSH – Hormona Folículo-Estimulante

g – Grama

GM-CSF – Factor Estimulador da Colônia de Granulócitos-Macrófagos

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotropinas

hCG – Gonadotropina Coriônica humana

IA – Inseminação Artificial

IM – Intra-muscular

kg – Quilograma

LAI – Inseminação Intra-uterina por Laparoscopia

LED – Diodo Emissor de Luz

LH – Hormona Luteinizante

LIF – Factor Inibidor dos Leucócitos

mg – Miligramas

MHz – Megahertz

ml – Mililitro

ng/ml – Nanogramas/Mililitros

°C – Graus Centígrados

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

r.p.m.– Rotações por Minuto

RIA – Radioimunoensaio

RNA – Ácido Ribonucleico

SAS – *Statistical Analysis System*

SRLV – Lenti-vírus dos Pequenos Ruminantes

TAI – Inseminação Transcervical

UI – Unidade International

µg – Microgramas

χ<sup>2</sup> – Qui-quadrado

## I – INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma técnica reprodutiva que consiste na colocação, de modo artificial, de sémen no tracto genital feminino (não se recorre à monta natural) (Gordon, 1997, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d). É a Tecnologia de Reprodução Assistida (ART) mais antiga (Cortez, 2012) e utilizada em animais de produção (Morrell, 2011).

São múltiplos os aspectos a ter em conta na aplicação da técnica de IA (Steyn, 2003). Nos machos há que melhorar as características genéticas, individuais (estado de saúde, condição corporal (CC), alimentação, condições ambientais e relações sociais) e a capacidade de produção de sémen em quantidade e qualidade, as técnicas de recolha (vagina artificial *vs.* electroejaculação), as análises seminais, a diluição e a preservação do sémen (Steyn, 2003 e Aisen e Venturino, 2004). Nas fêmeas há que melhorar a sua aptidão reprodutiva (genéticas, individuais, ambientais e sociais), as técnicas de controlo da actividade reprodutiva e a IA cervical (sémen fresco ou refrigerado) ou intra-uterina (congelado), por laparoscopia, com sémen preferencialmente congelado/descongelado (Steyn, 2003 e Anel *et al.*, 2005).

A IA foi inicialmente desenvolvida para controlar a propagação de doenças, evitar o transporte de animais com possíveis patologias e o seu contacto físico directo com as fêmeas (Eaglesome e Garcia, 1997 e Morrell, 2011). O uso de diluidores seminais com antibióticos e antifúngicos ajuda a prevenir a transmissão de doenças bacterianas e fúngicas (Morrell, 2011).

As vantagens e desvantagens da IA são as seguintes:

### Vantagens da IA

- Estende os limites geográficos e temporais da cobrição natural (Baril *et al.*, 1993, Chemineau *et al.*, 1996, Aisen, 2004b, Granados *et al.*, 2006, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d).
- Permite aumentar o rigor dos registos reprodutivos (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993 e Aisen, 2004a).
- A IA é uma potente ferramenta reprodutiva quando associada a outras biotecnologias como a criopreservação seminal e a sexagem de sémen (Aisen, 2004a e Morrell, 2011).

- Facilita o trânsito nacional e internacional de material genético (Aisen, 2004a,b).
- O ganho genético e produtivo pode ser aumentado mais rapidamente (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Gordon, 1997, Chemineau *et al.*, 1996, Eaglesome e Garcia, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a,b, Anel *et al.*, 2005, Granados *et al.*, 2006, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d).
- Facilidade nos testes de descendência (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a; e Fonseca *et al.*, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d).
- O processo reprodutivo pode ocorrer com animais portadores temporários de deficiências físicas, fisiológicas e comportamentais (Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006 e Morrell, 2011).
- A IA pode ser usada para conservar raças raras ou em perigo de extinção (Aisen, 2004a,b e Morrell, 2011).
- Possibilita um melhor controlo das actividades reprodutiva e produtiva dos efectivos, o que traz claras vantagens económicas (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d). Escolha mais precisa da época de partos (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d). Criação de lotes de animais para venda mais uniformes ou na mesma fase do ciclo produtivo (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d). Programação mais precisa da utilização da mão-de-obra (Valentim *et al.*, 2016d).
- Permite a identificação atempada de situações de subfertilidade masculina (Gordon, 1997).
- Facilita o manejo dos efectivos aumentando a segurança física dos criadores (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004a e Haresign, 1993). Por outro lado, porque facilita a criação de lotes, permite a implementação de técnicas de manejo tão simples como o *flushing*, o *steaming up* e a assistência aos partos, as quais têm igualmente importantes repercussões económicas (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a e Granados *et al.*, 2006).

- Maior economia (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a e Granados *et al.*, 2006). Com o sémen de um só macho pode inseminar-se um maior número de fêmeas. Neste sentido, o número de machos que é necessário existir na exploração reduz-se ou torna-se desnecessário (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Eaglesome e Garcia, 1997, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a e Granados *et al.*, 2006).
- Permite aumentar o controlo das doenças venéreas (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Chemineau *et al.*, 1996, Eaglesome e Garcia, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Granados *et al.*, 2006, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d).

#### Desvantagens da IA

- Pessoal qualificado para a sua realização (Haresign, 1993 e Granados *et al.*, 2006).
- Concentração da actividade reprodutiva das ovelhas e dos partos (Azevedo *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d).
- Dificuldades na deposição do sémen no corpo do útero (Baril *et al.*, 1993, Morrell, 2011; Ferra e Sereno, 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016d).
- Dificuldades na criopreservação do sémen (Morrell, 2011; e Kucuk *et al.*, 2014; citados por Valentim *et al.*, 2016d).
- Na estação reprodutiva, as taxas de fertilidade aparente são normalmente inferiores às conseguidas por monta natural (Aisen, 2004a; e Ferra e Sereno, 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016d).
- Nos bovinos leiteiros e nos equinos, a diminuição da fertilidade tem sido aparentemente associada a um aumento do uso da IA (Morrell, 2011).
- O uso de um reduzido número de reprodutores machos pode resultar em perda da variabilidade genética (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004a e Morrell, 2011).
- Risco de disseminações de efeitos e de doenças (Baril *et al.*, 1993, Eaglesome e Garcia, 1997 e Aisen, 2004a).
- Alguns são portadores de vírus no sémen sem sinais clínicos de doença (portadores) (Morrell, 2011).

- Algumas bactérias patogénicas são resistentes aos antibióticos presentes nos diluidores seminais ou podem evitar os seus efeitos formando bio-películas (Morrell, 2011).
- Custos elevados iniciais (Aisen, 2004a e Granados *et al.*, 2006).

Nos pequenos ruminantes, as principais dificuldades da IA estão associadas à anatomia do canal cervical (número e forma das pregas cervicais) (Baril *et al.*, 1993 Aisen, 2004a,b, Morello e Chemineau, 2004, Anel *et al.*, 2005 e Valentim *et al.*, 2016d) e à constituição das membranas dos espermatozóides pouco resistentes, particularmente, à criopreservação (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2005 e Valentim *et al.*, 2016d).

## **1 – SANIDADE NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

Em todo o Mundo, a avaliação regular do estado de saúde dos reprodutores dadores de sémen foi colocado sob a supervisão das autoridades veterinárias, com o objectivo de evitar a dispersão de patogénicos e de reduzir a contaminação do sémen por bactérias ubíquas (Eaglesome e Garcia, 1997). Os padrões nacionais para a produção e distribuição de sémen baseiam-se, normalmente, em programas reguladores que asseguram que as doenças importantes são identificadas e que testes apropriados são aplicados a todos os reprodutores que entram e que residem em Centros de Inseminação Artificial (Eaglesome e Garcia, 1997). Estes programas têm em conta o estatuto sanitário nacional e o estado de saúde dos rebanhos e do grupo de reprodutores dadores (Eaglesome e Garcia, 1997). Na interpretação do estatuto de saúde, as primeiras considerações incluem a sensibilidade e a especificidade dos testes, particularmente quando eles são aplicados a animais individuais e há risco de infecções latentes (Eaglesome e Garcia, 1997). Os programas de testagem necessitam de ser continuamente melhorados e actualizados com novas informações epidemiológicas, patológicas além do controlo tradicional das doenças (Eaglesome e Garcia, 1997). A emergência de novas doenças infecciosas eleva estes desafios e riscos (Eaglesome e Garcia, 1997)

Existem dois aspectos diferentes na relação entre a saúde dos animais e a produção de sémen que devem ser tidos em conta (Baril *et al.*, 1993). O primeiro diz

respeito à influência das doenças do reprodutor sobre a posterior produção de sémen (Baril *et al.*, 1993). Uma infecção pode ditar um aumento da temperatura corporal, de que resulta o aparecimento de espermatozóides anormais, nas semanas que se seguem à infecção, mesmo que a temperatura tenha diminuído no prazo de algumas horas (Baril *et al.*, 1993). As infecções podem igualmente passar despercebidas aos tratadores de animais, pelo que se recomenda a realização regular de exames seminais (por exemplo, duas vezes/mês) para avaliar a qualidade do sémen (Baril *et al.*, 1993).

O segundo aspecto relaciona-se com a possibilidade de alguns reprodutores transmitirem doenças infecciosas, através do sémen, às fêmeas inseminadas nos rebanhos comerciais (Baril *et al.*, 1993). As doenças mais comuns são: a Língua Azul, os lentivírus (Visna/Maedi, e CAEV – Artrite Encefalite Caprina Viral), a paratuberculose, a listeriose, a brucelose, a salmonelose, a pasteurelose, a toxoplasmose, a leptospirose, a clamidiose, a micoplasmose, entre outras (Baril *et al.*, 1993). As tricomonas estão muito presentes no sémen de bode (Baril *et al.*, 1993). No pico da infecção, estas são veiculadas em grandes quantidades no sémen (Baril *et al.*, 1993). Devem ser feitos controlos serológicos de rotina (Baril *et al.*, 1993).

A criopreservação das doses seminais coloca o macho em “quarentena” até se ter a certeza que ele era saudável quando da colheita do sémen (Morrell, 2011). Pelo contrário, a curta duração de vida das doses de sémen fresco obriga a que o sémen seja usado antes de se conhecer o estado de saúde do macho (Morrell, 2011).

## 1.1 – CONTAMINAÇÕES VÍRICAS

Os machos reprodutores dadores de sémen devem ser regularmente sujeitos à identificação da presença de anticorpos séricos indicadores de infecções transmitidas, por exemplo, do vírus da artrite equina, e que pode manter-se vivo no sémen por várias semanas antes de ser evidente em seroconversão (Morrell, 2011). Noutros casos, geralmente de infecções congénitas, os reprodutores podem funcionar como hospedeiros permanentes sem desenvolverem anticorpos (Morrell, 2011). O sémen destes machos pode representar uma fonte de doenças sexualmente transmissíveis (Morrell, 2011).

Os lentivírus são um género de vírus dentro da família dos retrovírus (Ventura *et al.*, 2017). Denominam-se de retrovírus porque têm um genoma constituído por RNA (Ácido Ribonucleico) e não por DNA (Ácido Desoxirribonucleico) (Ventura *et al.*,

2017). Contudo, este RNA tem de passar a DNA antes de se iniciar o processo de replicação (Ventura *et al.*, 2017). Esta conversão é feita pela enzima transcriptase reversa (Ventura *et al.*, 2017).

Dentro dos retrovírus, os lentivírus caracterizam-se por apresentar um período de latência prolongado, por vezes de anos, pelo que a doença que causa se desenvolve lentamente (Ventura *et al.*, 2017). Os diferentes tipos de lentivírus podem afectar os pequenos ruminantes, bovinos, equinos, felinos, símios e seres humanos (Ventura *et al.*, 2017).

Os lentivírus dos pequenos ruminantes (SRLV) afectam, globalmente, o bem-estar e a produção de ovelhas e de cabras (Crespo *et al.*, 2016). Os SRLV formam um grupo heterogéneo de vírus que têm feito aumentar seriamente a taxa de refugo a nível mundial (Crespo *et al.*, 2016). Até ao momento foram descritos 5 genótipos (A-E) (Crespo *et al.*, 2016). Os mais dispersos a nível mundial são os genótipos A, protótipo dos vírus Visna/Maedi, e o genótipo B, que inclui os vírus do tipo CAEV (Crespo *et al.*, 2016). Os demais genótipos estão restritos a áreas geográficas específicas (Crespo *et al.*, 2016).

Os programas de controlo destes vírus baseiam-se em exames serológicos altamente sensíveis (Crespo *et al.*, 2016). Todavia, a presença de animais que apresentam níveis reduzidos de anticorpos conduz à presença permanente de animais infectados (mas considerados seronegativos) no rebanho e que perpetuam a infecção (Crespo *et al.*, 2016). Por outro lado, os animais que por longos períodos de tempo não apresentam uma progressão da doença apresentam uma resposta imunitária detectável não indicativa de um animal hospedeiro, mas sugere a contenção imunitária da infecção (Crespo *et al.*, 2016). Ventura *et al.* (2017) referem que os pequenos ruminantes têm uma resposta individual aos lentivírus que os infectam. Porém, os actuais programas de erradicação desta doença baseiam-se na detecção de animais seropositivos e seu posterior isolamento ou eliminação para que não contagiem os efectivos. Todavia há autores que defendem que nem todos os animais seropositivos são perigosos ou contagiosos, já que possuem uma baixa carga viral e constituem um risco mínimo (Ventura *et al.*, 2017). Este facto é particularmente importante em animais de elevado valor genético, em raças em vias de extinção ou quando a seropositividade ronda os 100% (Ventura *et al.*, 2017).

## 1.2 – CONTAMINAÇÕES BACTERIANAS

As contaminações bacterianas surgem quando da recolha de sémen, a partir do prepúcio, do abdómen do macho e do meio ambiente (Morrell, 2011). O processamento do sémen dos animais de produção não é, normalmente, feito em câmaras de fluxo laminar, pelo que este pode constituir outra fonte de contaminação (Morrell, 2011). Os antibióticos presentes nos diluidores seminais limitam a multiplicação destes contaminantes e previnem a infecção da fêmea inseminada (Morrell, 2011). Ainda que o tracto genital feminino disponha de mecanismos fisiológicos bem desenvolvidos para lidar com as contaminações transmitidas durante a cópula, estes podem ser superados por uma multiplicação bacteriana extraordinária no diluidor seminal ou pela colocação do sémen num local não fisiológico (Morrell, 2011).

## 1.3 – ANTIBIÓTICOS PRESENTES NOS DILUIDORES SEMINAIS

A adição de antibióticos aos diluidores seminais é controlada por directivas governamentais, nacionais e internacionais, que definem os tipos de antibióticos e as suas concentrações (Morrell, 2011). Geralmente, há tendência para se usarem antibióticos muito potentes e de largo espectro, combinados de várias formas para reduzir a sua toxicidade sobre os espermatozóides (Morrell, 2011). Contudo, estes antibióticos podem exacerbar o desenvolvimento de resistências, tanto na pessoa que manipula os diluidores seminais, como no ambiente quando eles ou as doses seminais não usadas são deitados fora (Morrell, 2011). A escala do problema torna-se evidente quando se sabe que aproximadamente 4 milhões de litros de sémen de suíno diluído com antibióticos são usados por ano só na Europa (Morrell, 2011).

## 2 – CONTROLO REPRODUTIVO

Do ponto de vista reprodutivo, os pequenos ruminantes são animais poliéstricos sazonais, exibindo actividade reprodutiva preferencialmente em dias de fotoperíodo decrescente ou “curto”, para que os partos ocorram na Primavera, altura em que as condições ambientais são mais favoráveis tanto para a fêmea como para as crias (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004,

Valentim *et al.*, 2004, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Safari *et al.*, 2014, Valentim *et al.*, 2014, e Valentim *et al.*, 2016a). Na nossa latitude, a sazonalidade reprodutiva tende a ser pouco marcada (Correia, 1996, Valentim *et al.*, 2004, Sacoto, 2012, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2016a). A estação reprodutiva começa por volta do solstício de Verão e a estação de anestro após o solstício de Inverno (Garcia *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2016a).

A domesticação dos pequenos ruminantes não alterou o seu padrão reprodutivo, uma vez que durante milhares de anos o Homem continuou a criá-los muito dependentes das condições ambientais, particularmente das disponibilidades naturais de alimentos (El-Maaty e El-Gawad, 2014, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2016a). Actualmente, esta característica constitui um dos maiores obstáculos a maximização da rentabilidade das explorações intensivas e semi-intensivas destes animais (Sacoto, 2012, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2016a). Tal como refere Steyn (2003), a maioria das ovelhas e das cabras não parem mais de 5 cordeiros/cabritos durante toda a sua vida produtiva, o que é manifestamente reduzido para a capacidade reprodutiva da maioria das raças destas espécies.

O controlo da actividade reprodutiva é uma das técnicas de manejo mais importantes em qualquer exploração animal (Azevedo *et al.*, 2006, Abecia *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2016a). Possibilita um melhor planeamento das seguintes actividades:

- Alimentação dos reprodutores, conforme as disponibilidades alimentares e o estágio fisiológico das fêmeas (Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006 e Mohtar *et al.*, 2014);
- Maneio reprodutivo mais eficiente com redução dos períodos improdutivos e incremento do progresso genético (Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Viñoles *et al.*, 2011, Abecia *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2014);
- Testes de descendência mais precisos (Baril *et al.*, 1993 e Steyn, 2003).
- Maximizar a utilização sustentável da IA (Baril *et al.*, 1993, Freitas e Rubianes, 2004, Letelier *et al.*, 2011) e adaptá-la a outras técnicas reprodutivas como a superovulação e a transferência de embriões (Freitas e Rubianes, 2004 e Letelier *et al.*, 2011);

- Épocas de cobrição e de parição mais curtas, segundo as variações anuais dos preços de mercado, da ocupação das instalações e das disponibilidades de mão-de-obra (Romano, 1996, Steyn, 2003, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Azevedo *et al.*, 2006 e Abecia *et al.*, 2012);
- Melhor assistência aos partos e conseqüente diminuição da taxa de mortalidade perinatal (Aisen, 2004a, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004 e Omontese *et al.*, 2012);
- Maneio sanitário, de acordo com as principais patologias locais, o estágio fisiológico das fêmeas e o momento da venda dos produtos finais (Garcia *et al.*, 2004, Azevedo *et al.*, 2006 e Mohtar *et al.*, 2014).

Na estação de anestro, o controlo da actividade reprodutiva permite ainda aumentar as taxas reprodutivas (fertilidade aparente, prolificidade e fecundidade) e produtivas (produtividade numérica e produtividade do sistema) e a obtenção de produtos de maior qualidade e homogeneidade (Gordon, 1997, Ungerfeld e Rubianes, 2002, Aisen, 2004a e Valentim *et al.*, 2016c).

## 2.1 – MÉTODOS DE CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA

A taxa de fertilidade aparente é máxima quando a inseminação se realiza durante a segunda metade do estro, ou seja, algumas horas antes da ovulação (Freitas e Rubianes, 2004). São vários os métodos actualmente disponíveis de controlo da actividade reprodutiva (Baril *et al.*, 1993 e Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016a,b). O melhor é o que produz resultados mais elevados tendo em conta a sua genética, as suas características individuais, a estação do ano, as condições de alojamento, os factores ambientais, as relações sociais e o maneio aplicado (Baril *et al.*, 1993, Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016a).

Existem métodos de controlo da actividade reprodutiva “naturais” e/ou “hormonais” (Morello e Chemineau, 2004 e Valentim *et al.*, 2016a,b). Os métodos naturais envolvem o *flushing*, o “efeito macho” e os tratamentos luminosos (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Valentim, 2004 e Valentim *et al.*, 2016a). Estes métodos, normalmente, conseguem interromper o anestro, mas não garantem uma sincronização estreita dos cios e das ovulações (Valentim *et al.*, 2016a). Os métodos

hormonais implicam a administração de melatonina exógena (estação de anestro), de progesterona ou seus análogos sintéticos (progestagénios), de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) ou seus análogos sintéticos (estação reprodutiva) e caso se queira promover ainda a ovulação de gonadotropinas – FSH (Hormona Folículo-Estimulante), eCG (Gonatotropina Coriônica equina) ou hCG (Gonadotropina Coriônica humana) (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Freitas e Rubianes, 2004, Morello e Chemineau, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b).

Durante a estação de anestro apenas a progesterona/progestagénios permite uma sincronização estreita da actividade reprodutiva, particularmente quando acompanhadas da administração de gonadotropinas exógenas (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Ungerfeld e Rubianes, 2002, Azevedo *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b).

Durante a estação reprodutiva a sincronização da actividade reprodutiva pode ser conseguida através do uso de progesterona/progestagénios, de  $PGF_{2\alpha}$  ou seus análogos sintéticos ou da combinação destas hormonas (Ungerfeld e Rubianes, 2002, Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b). Nesta altura, a aplicação dos tratamentos de controlo da actividade reprodutiva tendem a produzir taxas de fertilidade inferiores às que podem ser alcançadas naturalmente (Letelier *et al.*, 2011). O uso de prostagénios parece alterar o crescimento folicular final (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005; citados por Letelier *et al.*, 2011), o padrão de secreção de LH (Gordon, 1975, Scaramuzzi *et al.*, 1988, e Menchaca e Rubianes, 2004; citados por Letelier *et al.*, 2011), a qualidade das ovulações (Killian *et al.*, 1985, Viñoles *et al.*, 2001 e Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005; citados por Letelier *et al.*, 2011) o transporte e a sobrevivência dos espermatozóides no tracto genital feminino (Hawk e Conley, 1971; citados por Letelier *et al.*, 2011). A utilização de  $PGF_{2\alpha}$  parece interromper a dinâmica folicular e o normal desenvolvimento da fase lútea e/ou produz inconsistências no intervalo de tempo entre o tratamento e as ovulações pós-luteólise (Barret *et al.*, 2002; citados por Letelier *et al.*, 2011). Também elas parecem prejudicar o armazenamento, transporte de espermatozóides (Azevedo *et al.*, 2016) e a capacitação dos espermatozóides no tracto genital feminino (Freitas e Rubianes, 2004).

A progesterona/progestagénios impede a retoma da ciclicidade, pelo que o tratamento deve ter uma duração semelhante à da fase lútea (tratamento progestagénico “longo”) – 12-15 dias (ovinos) (Baril *et al.*, 1993, Azevedo *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b) e 14-18 dias (caprinos) (Baril *et al.*,

1993, Freitas e Rubianes, 2004 e Granados *et al.*, 2006). Nas ovelhas, o cio começa em 25-48 horas (Freitas e Rubianes, 2004 e Gordon, 1997) ou 36-48 horas (Baril *et al.*, 1993). Nestes animais a sua duração é de 36 horas e a ovulação ocorre cerca de 70 horas pós-tratamento (Bolland *et al.*, 1978; citados por Gordon, 1997). Nas cabras, o cio começa 20-40 horas (Bonilla, 2001) ou 24-30 horas (Leboeuf *et al.*, 2000) e a ovulação produz-se em 50-90% das cabras (Bonilla, 2001). Nos caprinos, o cio tem uma duração de 18-48 horas, sendo mais habituais os cios de 24-36 horas (Bonilla, 2001).

As PGF<sub>2α</sub> destroem o corpo lúteo (CL) funcional, através de duas injeções administradas com 7-9 dias de intervalo, de forma que todas as ovelhas iniciam simultaneamente um novo ciclo éstrico (Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b). Nas cabras, o tratamento com PGF<sub>2α</sub> deve ter um intervalo de duração de 10-14 dias (Baril *et al.*, 1993 e Freitas e Rubianes, 2004). Nas ovelhas, o cio inicia-se em 25-48 horas (Freitas e Rubianes, 2004) ou 36-48 horas (Baril *et al.*, 1993) e, nas cabras, em 72 horas (Bonilla, 2001) ou 72-96 horas (Baril *et al.*, 1993).

Os tratamentos “progestagénicos “curtos” têm uma duração de 5-7 dias e implicam igualmente a administração de PGF<sub>2α</sub> (Ungerfeld e Rubianes, 2002, Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016b). Esta deve ser feita quando da colocação das esponjas vaginais com progestagénios, a fim de evitar os efeitos deletérios da PGF<sub>2α</sub> sobre a formação de depósitos, o transporte e a capacitação dos espermatozóides no tracto genital feminino e os mecanismos ovários que levam à ovulação (Freitas e Rubianes, 2004 e Valentim *et al.*, 2016b). No fim dos tratamentos de controlo da actividade ovária pode ser administrada uma gonadotropina (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2016b). Na sincronização do cio das cabras, a administração de gonadotropinas exógenas antecipa a ovulação e eleva o grau de sincronização das mesmas (Westhuysen, 1979 e Ritar *et al.*, 1984; citados por Granados *et al.*, 2006).

As gonadotropinas mais utilizadas são a eCG e a hCG, pelo preço, por poderem ser injectadas intramuscularmente uma só vez, por terem efeitos semelhantes à FSH e à LH e promoverem melhores respostas ovárias (Azevedo *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b). Suportam os mecanismos ovários que levam ao crescimento e à maturação dos folículos, à ovulação e à correcta luteinização do corpo

lúteo (CL) (Baril *et al.*, 1993, Freitas e Rubianes, 2004 e Valentim *et al.*, 2016b). Nas ovelhas, a eCG deve ser administrada quando da remoção das esponjas vaginais (Baril *et al.*, 1993 e Correia *et al.*, 2019) e nas malatas e nas cabras leiteiras cerca de 48 horas antes (Baril *et al.*, 1993). A dose varia de acordo com vários factores: genética, idade, estação do ano, estado fisiológico da fêmea (Baril *et al.*, 1993 e Gordon, 1997). As raças prolíficas e pouco sazonais são geralmente mais sensíveis à administração de eCG (Baril *et al.*, 1993).

Depois da remoção das esponjas vaginais com progestagénios, o cio começa em 36 horas (Gordon, 1997) e a ovulação em cerca de 58-60 horas (Steyn, 2003). Quando tratadas com CIDR (*Controlled Internal Drug Release*) durante 12 dias, as ovelhas e as cabras em anestro entram em cio e ovulam 4 horas mais cedo, ou seja, cerca de 54 horas após a remoção destes dispositivos vaginais (Gordon, 1997 e Steyn, 2003). Estes valores variam segundo a raça e a estação do ano (Gordon, 1997 e Steyn, 2003). Na estação reprodutiva, a ovulação pode ocorrer 48-50 horas após a remoção do CIDR (Steyn, 2003). Para uma inseminação única, o tempo “universalmente” aceite para se proceder à IA é de 42-46 horas pós-remoção do dispositivo (Gordon, 1997).

### **3 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

A beneficiação das fêmeas pode ser feita por monta natural, monta dirigida ou por IA com sémen fresco (puro ou diluído), refrigerado ou congelado (Gordon, 1997, Bonilla, 2001, Granados *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d; e Dendena, 2017). A inseminação pode ser feita através da deposição do sémen na vagina, no cérvix, e nos cornos uterinos transcervicalmente, por laparoscopia ou por laparotomia (Granados *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016d). A aplicação da IA não melhora as taxas reprodutivas conseguidas naturalmente por carneiros de qualidade (Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d).

#### **3.1 – FACTORES QUE AFECTAM A RESPOSTA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

São múltiplos os factores que afectam a resposta reprodutiva dos pequenos ruminantes à IA: genética, indivíduo, alimentação, meio ambiente, método de controlo da actividade reprodutiva, métodos de recolha e de conservação do sémen, forma de

introduzir o sémen no tracto genital feminino e local de deposição do sémen (Gordon, 1997 e Morrell, 2011).

### **3.1.1 – FOTOPERÍODO**

A importância do fotoperíodo sobre os pequenos ruminantes aumenta do equador até às regiões polares, ou seja, aumenta com a latitude (Leboeuf *et al.*, 2000, Baril *et al.*, 1993, Steyn, 2003 e Valentim, 2004). Os pequenos ruminantes tendem a reproduzir-se sob um fotoperíodo “decrecente” (menores latitudes das regiões temperadas) (Valentim, 2004, Abecia e Forcada, 2010 e Abecia *et al.*, 2012) ou sob um fotoperíodo de “dias curtos” (maiores latitudes) (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Steyn, 2003, Valentim, 2004, Abecia e Forcada, 2010 e Abecia *et al.*, 2012). Este fenómeno está relacionado com a exclusiva produção de melatonina durante o período nocturno (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Steyn, 2003, Valentim, 2004, Abecia e Forcada, 2010 e Abecia *et al.*, 2012).

Na estação reprodutiva, o comportamento sexual, o tamanho dos testículos e a produção quantitativa e qualitativa de espermatozóides pode aumentar significativamente (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000 e Valentim, 2004). Na Primavera verifica-se precisamente o contrário (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000 e Barkawi *et al.*, 2006). Contudo, este decréscimo é atenuado nos animais treinados para copular regularmente (Corteel, 1981; citado por Leboeuf *et al.*, 2000).

Neste sentido, os investigadores devem identificar o estado fisiológico das fêmeas antes de começar o processo de controlo da actividade reprodutiva e a aplicação da técnica de IA, particularmente nas de maior sazonalidade reprodutiva (Steyn, 2003).

### **3.1.2 – ALIMENTAÇÃO**

Na estação de anestro, deve ser prestada uma maior atenção à alimentação de todos os reprodutores (*flushing*) (Leboeuf *et al.*, 2000, Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004, Valentim *et al.*, 2016c e Leão *et al.*, 2017) e aos atrasos na retoma da ciclicidade nas fêmeas (Steyn, 2003). Pelo contrário, os reprodutores de algumas raças retomam a actividade cíclica mais cedo; as raças leiteiras tendem a ser mais sazonais (Steyn, 2003).

As fêmeas devem ter uma condição corporal (CC) quando da IA de 3,0-3,5 pontos (escala de 1-5 pontos) (Steyn, 2003, Dendena, 2017 e Leão *et al.*, 2017). O *flushing* é

uma técnica de manejo alimentar que consiste na melhoria do valor energético e proteico da dieta cerca de 2 semanas antes da IA – aumento da taxa de fertilidade – e nas 4 semanas pós IA – elevação da taxa de prolificidade (Baril *et al.*, 1993, Valentim *et al.*, 2016a,c e Leão *et al.*, 2017).

Do último terço da gestação ao pico da lactação, a dieta deve ser novamente reforçada (particularmente em energia e proteína) – *steaming up* – de modo a aumentar a taxa de fertilidade e a taxa de sobrevivência das crias (Steyn, 2003, Valentim *et al.*, 2015a, Leão *et al.*, 2017). É necessário encontrar o balanço ideal entre a quantidade e a qualidade da proteína, da energia, de minerais essenciais e vitaminas (Steyn, 2003 e Leão *et al.*, 2017).

### **3.1.3 – IDADE**

É geralmente aceite que as ovelhas nulíparas são menos férteis e que a taxa de fertilidade varia em função da raça (Gordon, 1997). Estas apresentam ciclos éstricos mais curtos e ovulam mais cedo do que as ovelhas adultas (Steyn, 2003). As ovelhas nulíparas devem ser as primeiras a ser inseminadas (Steyn, 2003). Num esquema de inseminação artificial com uma elevada percentagem de ovelhas nulíparas, estas devem começar a ser IA 4 horas antes das ovelhas adultas (Steyn, 2003). Nas primeiras, a sub-fertilidade resulta, fundamentalmente, de um aumento da taxa de mortalidade embrionária (Gordon, 1997).

### **3.1.4 – FREQUÊNCIA DE RECOLHA DE AMOSTRAS DE SÉMEN**

Os pequenos ruminantes são animais que possuem, normalmente, importantes reservas epididimais de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993 e Gordon, 1997). De qualquer forma, a frequência com que se faz a colheita de sémen depende da idade, do indivíduo (incluindo o seu temperamento), das condições ambientais, das relações sociais, método de colheita, entre outros (Gordon, 1997 e Morello e Chemineau, 2004). De um modo geral, é indicado nos carneiros fazerem 3-5 recolhas diárias, seguidas de um período de repouso de 2-3 dias (Morello e Chemineau, 2004). Nos bodes, podem fazer-se 2-3 recolhas diárias em dias alternados (Morello e Chemineau, 2004).

O aumento no número de colheitas pode resultar em um aumento do volume e da concentração espermática, se o ritmo de recolha precedente não tiver sido muito intenso (Baril *et al.*, 1993). O benefício de tal modificação depende das reservas epididimais do macho no momento da alteração do ritmo de colheita (Baril *et al.*, 1993). Inicialmente, quando estas reservas são máximas, uma taxa de colheita elevada (mais de 4 colheitas/dia) permite recolher um número muito significativo de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). A qualidade pode ser inferior devido à acumulação de espermatozóides senis. Esgotadas estas reservas, o ritmo de colheita deve diminuir para duas ou mesmo uma/dia (Baril *et al.*, 1993). Neste momento, a qualidade do sémen também não é a melhor, pois existe uma elevada percentagem de espermatozóides imaturos (Baril *et al.*, 1993). De facto, o aumento da frequência de colheitas não tem interesse se o ritmo de colheita pré-aplicado não tiver sido próximo da produção máxima dos testículos (Baril *et al.*, 1993).

A frequência de colheita de sémen nos malatos deve ser inferior à dos carneiros (Baril *et al.*, 1993). O uso de implantes de melatonina ou de tratamentos luminosos pode melhorar, quantitativa e qualitativamente a produção de sémen (Baril *et al.*, 1993, Valentim *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2006).

A alteração do regime alimentar para uma dieta rica em energia e em proteína é capaz de aumentar a actividade espermática (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997 e Valentim *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2016c). Esta alteração da dieta deve ser feita, pelo menos, 6 semanas (Baril *et al.*, 1993) a 8 semanas (Robinson *et al.* 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016c) antes da intensificação da colheita de sémen. O excesso de gordura ou de extrema magreza têm efeitos negativos sobre a produção seminal (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997 e Valentim *et al.*, 2016c).

### **3.1.5 – MÉTODOS DE COLHEITA DE SÉMEN**

Nos pequenos ruminantes, o volume dos ejaculados é reduzido (ml), mas a concentração é elevada (Baril *et al.*, 1993 e Morrell, 2011). Na maioria dos animais domesticados o sémen é recolhido através de uma vagina artificial deixando o macho montar uma fêmea (normalmente) em cio induzido ou um manequim (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Aisen e Venturino, 2004, Granados *et al.*, 2006 e Morrell, 2011). Porém, implica a existência de machos treinados e em excelentes condições físicas (Gordon,

1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen e Venturino, 2004 e Granados *et al.*, 2006). Infelizmente, nem todos os machos são treináveis [os carneiros e os bodes (em particular) são animais gregários que não gostam de estar sozinhos na presença do homem (Baril *et al.*, 1993)] ou estão sempre em boas condições físicas (Baril *et al.*, 1993). Os treinos devem ser retomados antes de começar uma nova época reprodutiva – 2-3 colheitas/dia, nas 3 semanas precedentes (Gordon, 1997).

### 3.1.5.1 – VAGINA ARTIFICIAL

A vagina artificial consiste numa 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 (Aisen e Venturino, 2004 e Morrell, 2011). Desta forma, é criado um espaço que pode ser preenchido com água quente (Aisen e Venturino, 2004 e Morrell, 2011) ou ser aquecida numa estufa (40-42°C) (Aisen e Venturino, 2004) ou (42-45°C) (Baril *et al.*, 1993 e Dendena, 2017). Se um macho salta na vagina artificial e não ejacula ou a temperatura ou a pressão não são as correctas (Aisen e Venturino, 2004). O tubo exterior da vagina artificial é dotado de uma válvula dupla. Quando se retiram as duas é possível encher o espaço entre a bainha interior e o tubo exterior com água. A remoção apenas da segunda válvula permite, através de insuflação, aumentar a pressão no interior da vagina artificial (Morrell, 2011), ajustando-a á preferência de cada macho em concreto. Numa das extremidades da vagina artificial coloca-se um cone de borracha e na outra das suas extremidades é inserido um tubo colector graduado (Morrell, 2011). O tubo colector deve estar envolto em material termo isolante. Outra protecção termo isolante deve recobrir desde o tubo colector recoberto até à própria vagina artificial. Antes de ser usada, a vagina deve estar lavada e desinfectada (por exemplo, com quaternário de amónio). Por outro lado, a entrada livre da vagina deve ser ligeiramente lubrificada (Gordon, 1997). Uma lubrificação muito intensa, particularmente com uma substância mais aquosa ou oleosa, leva-a a escorrer para dentro do tubo colector e a misturar-se com o sémen recolhido.

Nos ovinos, podem-se recolher imediatamente dois ejaculados de um mesmo macho, para o mesmo tubo colector (Baril *et al.*, 1993 e Gordon, 1997). Estes podem ser obtidos no intervalo de 2 minutos (Baril *et al.*, 1993). Se o segundo ejaculado não é obtido no intervalo de 2-3 minutos, há que tratar do primeiro ejaculado apenas e

eventualmente recolher o segundo ejaculado com uma segunda vagina artificial, para outro tubo de ensaio (Baril *et al.*, 1993). Nos caprinos, por causa dos efeitos nocivos do plasma seminal sobre os espermatozóides, *in vitro*, não é recomendável colher dois ejaculados para a mesma vagina artificial (Baril *et al.*, 1993).

Antes de se iniciar a sessão de recolha de sémen é conveniente higienizar o prepúcio do animal (tricotomia e lavagem) a fim de evitar conspurcar e contaminar o ejaculado (Abecia e Forcada, 2010). A prevenção de doenças sexualmente transmissíveis determina o uso de uma vagina artificial por macho e o escrupuloso respeito de rigorosas medidas sanitárias (Abecia e Forcada, 2010).

### 3.1.5.2 – ELECTROEJACULAÇÃO

Sempre que não for possível recolher sémen por vagina artificial pode recorrer-se à electroejaculação (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Morello e Chemineau, 2004, Granados *et al.*, 2006 e Morrell, 2011). É uma técnica que depende de um equipamento eléctrico que produz descargas de 4-15 volts e de uma sonda com 2-3 eléctrodos e que permite estimular os centros nervosos que controlam a erecção e a ejaculação do sémen, localizados logo abaixo do recto (introdução rectal da sonda). A electroejaculação tem várias desvantagens: no mínimo, é desconfortável para os animais (Morello e Chemineau, 2004 e Granados *et al.*, 2006), pode determinar a libertação simultânea de espermatozóides e de urina (amostra seminal estragada) (Morello e Chemineau, 2004; e Ferra e Sereno, 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016d) e alterar a proporção natural de secreções libertadas pelas glândulas anexas ou acessórias com efeitos deletérios sobre a sobrevivência dos espermatozóides (Morello e Chemineau, 2004 e Morrell, 2011). O ejaculado pode ser mais volumoso e menos concentrado (Leboeuf *et al.*, 2000). Não há alteração da motilidade espermática (Akusu *et al.*, 1984; citados por Leboeuf *et al.*, 2000).

### 3.1.6 – COMPOSIÇÃO DO SÉMEN

O sémen é composto por espermatozóides contidos num fluido aquoso denominado de plasma seminal e que representa a secreção combinada de diferentes glândulas anexas: vesículas seminais, bulbo-uretrais e próstata (Gordon, 1997 e Morrell,

2011). A contribuição relativa de cada uma destas glândulas varia em função da espécie (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997 e Morrell, 2011). Nos bodes, a secreção destas glândulas são particularmente abundantes (ao contrário do que sucede nos ovinos), numa enzima – a Fosfolipase A (também denominada de enzima da coagulação da gema de ovo) – que catalisa a hidrólise das lecitinas presentes na gema de ovo em ácidos gordos e em lisolecitina (Baril *et al.*, 1993 e Leboeuf *et al.*, 2000). Em grandes quantidades, o último composto, é tóxico para a sobrevivência *in vitro* dos espermatozóides (Baril *et al.*, 1993 e Morrell, 2011). A hidrólise das lecitinas depende de certas condições: presença de cálcio, pH, temperatura, concentração do plasma seminal, estação do ano e raça (Baril *et al.*, 1993). Existem, igualmente, importantes diferenças entre bodes quanto à actividade desta enzima (Baril *et al.*, 1993).

Nos bodes, foi recentemente verificado que um composto proteico segregado pelas glândulas bulbo-uretrais (Fosfolipase A) interage com o leite desnatado, que pode ser usado como diluidor e inibe fortemente a motilidade espermática (Baril *et al.*, 1993 e Leboeuf *et al.*, 2000). Este efeito pode ser anulado pela acção de outro composto proteico com origem nas vesículas seminais (Baril *et al.*, 1993).

O plasma seminal contém uma fonte de energia (a principal é frutose, embora a glicose também possa ser usada) (Gordon, 1997, Morello e Chemineau, 2004 e Morrell, 2011), proteínas e vários iões – cálcio, magnésio, zinco e bicarbonato (Morrell, 2011). Um dos principais ácidos orgânicos presentes no plasma seminal é o ácido cítrico (Morello e Chemineau, 2004). A produção deste ácido está positivamente correlacionado com o estado androgénico (depende da secreção de androsterona) (Morello e Chemineau, 2004). O ácido ascórbico é um redutor importante do plasma seminal (Morello e Chemineau, 2004). Normalmente, os seus níveis diminuem marcadamente a necrose e a azoospermia (Morello e Chemineau, 2004). Nos carneiros, outro agente redutor é o ácido úrico (Morello e Chemineau, 2004). Outros ácidos importantes no sémen são o láctico e o pirúvico (Morello e Chemineau, 2004). Estes metabólitos acumulam-se notavelmente à medida que o ejaculado “envelhece” com o tempo, sobretudo devido ao processo de glicólise da frutose como substrato (Morello e Chemineau, 2004).

O plasma seminal, para além de activar o espermatozóide, que permaneceu quiescente no epidídimo, funciona igualmente como meio de transporte dos espermatozóides até ao tracto genital feminino e mais tarde estimula a sua deslocação até ao local da fecundação (Gordon, 1997 e Morrell, 2011).

Tem sido sugerido que, pelo menos nos equinos, o plasma seminal funciona como um modelador da inflamação induzida pelos espermatozóides e que se pensa ser responsável por desempenhar um papel importante na sua eliminação dentro do tracto genital feminino (Troedsson *et al.*, 2001; citados por Morrell, 2011). Várias proteínas do plasma seminal, tais como as espermadesinas e as denominadas proteínas CRISP (proteínas ricas na secreção de cisteína), parecem estar associadas à fertilidade espermática (Morrell, 2011). É possível que estas proteínas se liguem imediatamente aos espermatozóides e desencadeiem uma sucessão de eventos intracelulares através de uma via de mensageiro(s) secundário(s) (Morrell, 2011).

Em várias espécies animais pequenas vesículas que se ligam à membrana foram identificadas no plasma seminal, aparentemente produzidas por diferentes glândulas anexas (Morrell, 2011). Estas vesículas chamadas de prostassomas, vesiculossomas ou epididissomas, dependendo da sua origem fundem-se com a membrana externa do espermatozóide aumentam a sua motilidade e possivelmente participam no processo de capacitação espermática e na aquisição de poder fertilizante (Morrell, 2011). Porém, os seus mecanismos de acção permanecem desconhecidos (Morrell, 2011). Resultam, no entanto, na redução da duração do período de vida útil dos espermatozóides no genital feminino (Baril *et al.*, 1996).

Os factores seminais promovem a sobrevivência dos espermatozóides no tracto genital feminino, modelando a resposta imunitária da fêmea ao conceito e tornando o ambiente uterino mais favorável ao desenvolvimento embrionário e o endométrio à implantação (Robertson *et al.*, 2005; citados por Morrell, 2011). O mecanismo de acção do endométrio produz-se via recrutamento e activação de macrófagos, de granulócitos e até ao rearranjo dendrítico que eleva a receptividade do endométrio à implantação do embrião (Morrell, 2011). A libertação de citoquinas tem propriedades embriotrópicas e pode igualmente influenciar tecidos fora do tracto reprodutivo (Morrell, 2011).

A exposição do sémen induz a activação de citoquinas presentes no fluido uterino luminal e no glicocálice epitelial, alinhando o espaço luminal (Morrell, 2011). Estas citoquinas interagem com o desenvolvimento embrionário à medida que este atravessa o oviduto e o útero antes da implantação (Morrell, 2011). Várias citoquinas parecem estar envolvidas, por exemplo, na indução do Factor Estimulador da Colónia de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF), uma das principais citoquinas envolvidas na resposta inflamatória pós-cópula, atinge o embrião pré-implantado e promove a formação do blastocisto, aumenta o número de blastómeros viáveis, inibindo a apoptose

e facilitando o consumo de glicose (Robertson *et al.*, 2001; citados por Morrell, 2011). A Interleuquina-6 (IL-6) e o Factor Inibidor dos Leucócitos (LIF) são igualmente induzidos após exposição ao sémen (Robertson *et al.*, 1992 e Gutsche *et al.*, 2003; citados por Morrell, 2011).

Ainda que o plasma seminal desempenhe um papel importante na activação e no funcionamento do tracto genital feminino, ele é prejudicial a longo-prazo à sobrevivência dos espermatozóides *in vitro* (Morrell, 2011). Sob condições fisiológicas, quando da ejaculação, os espermatozóides são activados pelo plasma seminal e nadam para longe do local onde foram depositados dentro do genital feminino (Morrell, 2011). É apenas durante o armazenamento *in vitro* que os espermatozóides ficam expostos aos efeitos a longo-prazo do plasma seminal (Morrell, 2011). Neste sentido, depois da sua colheita, ao ejaculado deve ser acrescentado rapidamente um diluidor seminal, a fim de diluir os elementos tóxicos presentes no plasma, nutrir os espermatozóides durante a sua permanência *in vitro* e tamponar os seus subprodutos metabólicos (Gordon, 1997 e Morrell, 2011). A adição do diluidor permite ainda que o sémen seja dividido em várias doses seminais, contendo cada uma delas um número específico de espermatozóides adequados a uma fertilidade óptima (Gordon, 1997 e Morrell, 2011).

### **3.1.7 – DILUIDORES SEMINAIS**

Existem vários tipos de diluidores de sémen: naturais (leite de vaca desnatado, gema de ovo, água de coco ou gel de aloé vera) (Rodriguez *et al.*, 1988 e Palacios, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d) ou sintéticos (Valentim *et al.*, 2016d). De um modo geral, estes diluidores devem aumentar o volume do sémen diluído, estabilizam o pH (efeito tampão), manter a osmolaridade adequada, proporcionar uma fonte de energia para os espermatozóides e protegê-lo de possíveis infecções bacterianas ou fúngicas, para além de os proteger do choque térmico provocado pelas baixas temperaturas (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Aisen, 2004b e Valentim *et al.*, 2016d). Este último pode ser evitado através de uma diminuição regular da temperatura (Baril *et al.*, 1993).

O choque térmico traduz-se no aumento do número de espermatozóides mortos, formas anormais, alteração da distribuição dos lípidos membranares e aumento do cálcio intracelular, com possível fusão de membranas (Aisen, 2004a). Há que afirmar

que o choque térmico altera súbita e irreversivelmente a membrana plasmática (Aisen, 2004a). No caso dos espermatozóides dos ovinos existe uma distribuição desigual das proteínas do citoesqueleto associadas à membrana, sendo mais sensíveis à refrigeração (Aisen, 2004a). Proteínas como a actina comprometem a estabilidade das membranas ou a sua redistribuição antes do processo de fecundação (Aisen, 2004a).

As espécies cujos espermatozóides possuem membranas com uma relação entre colesterol/fosfolípidos de 0,88 (coelho) e 0,99 (homem) são mais resistentes do que aqueles com relações de 0,45 (touro) e 0,3 (carneiro e bode) (Aisen, 2004b). Uma proporção de colesterol adequada fluidifica a membrana e não permite a separação lateral da cadeia lipídica, pelo que as proteínas intrínsecas não são deslocadas (Aisen, 2004b). A relação entre ácidos gordos insaturados/saturados e a proporção de colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides são algumas das características específicas que dificulta a refrigeração e a congelação (Gordon, 1997 e Aisen, 2004b). No caso dos ovinos a membrana dos espermatozóides apresenta uma relação elevada entre ácidos gordos insaturados/saturados e um reduzido conteúdo em colesterol (Aisen, 2004b). Por outro lado, a membrana plasmática dos espermatozóides está envolta numa camada rica em ácidos gordos não saturados e susceptíveis a danos por peroxidação (Aisen, 2004b). As membranas celulares e acrossómicas são as que mais sofrem com o processo de refrigeração (Aisen, 2004b). Neste sentido, a refrigeração deve ser moderada e homogénea oscilando entre  $-0,1^{\circ}\text{C}$  e  $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  (Aisen, 2004b). Nos diluidores com açúcares não permeáveis, como é o caso da lactose, a refrigeração pode ser rápida (especialmente entre os  $30^{\circ}\text{C}$  e os  $15^{\circ}\text{C}$ ) sem modificar a sobrevivência e a resistência à congelação dos espermatozóides de ovinos (Aisen, 2004b). A adição de gema de ovo e outras lipoproteínas protegem os espermatozóides do choque térmico (Aisen, 2004b). Outro aspecto importante é o efeito do cálcio sobre a regulação da motilidade e o metabolismo espermático (Aisen, 2004b). Durante a refrigeração a entrada de cálcio na célula espermática aumenta e isto agrava-se quando a taxa de arrefecimento é elevada. Os fosfolípidos da gema de ovo previnem esta entrada abrupta (Aisen, 2004b).

Até aos  $5^{\circ}\text{C}$ , há autores que usam como crioprotector apenas a gema de ovo (Ferra e Sereno, 2006 e Palacios, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Alguns diluidores seminais comerciais não usam glicerol – INRA96<sup>®</sup> [água ultrapura, caseínas (fracção purificada das proteínas micelares do leite), tampões, sais, açúcares, antibióticos e antifúngicos – penicilina sódica, sulfato de gentamicina e anfotericina B) (IMV

Technologies, L'Aigle, França), enquanto outros sim – diluidor Tris-frutose (3,63 g Tris, 0,50 g de frutose, 1,99 g ácido cítrico, 20 ml de gema de ovo, 7% de glicerol e 100 ml de água bidestilada (Salamon e Maxwell 2000; citados por Turri *et al.*, 2013), Andromed<sup>®</sup> (água bidestilada, frutose, glicerol, ácido cítrico, tampões, fosfolípidos, antibióticos: espectinomina e lincomicina, tilosina e gentamicina) (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) e Ovixcell<sup>®</sup> (água ultrapura, sais, açúcares, electrólitos, glicerol, antibióticos, sem proteína animal) (IMV Technologies, L'Aigle, França). A adição do diluidor seminal ao ejaculado deve ser feita à temperatura a que este estiver no momento da diluição (Valentim *et al.*, 2016b).

A refrigeração pode ser feita num banho-maria refrigerado ou em frigoríficos a 5°C, esperando pelo menos uma hora para que o sémen diluído atinja os 5°C (Aisen, 2004b). Para o efeito, dentro do frigorífico coloca-se o tubo com o sémen diluído a 30-37°C submerso num copo de água a 5°C (Aisen, 2004b). Deste modo, o material seminal refrigerado mantém uma fertilidade aceitável durante 18-24 horas pós-remoção do frigorífico (Aisen, 2004b). Se o sémen for previamente colocado em palhinhas, estas devem ser introduzidas num tubo de plástico e o conjunto é levado numa arca refrigeradora portátil a 15°C, mantendo a sua capacidade fecundante durante 6-10 horas (Aisen, 2004b).

Qualquer que seja o diluidor a taxa de diluição, a temperatura ou as condições de armazenamento, os espermatozóides vão perdendo motilidade e integridade morfológica e vão reduzindo a sua capacidade de sobrevivência no tracto genital feminino com a consequente perda de fertilidade e aumento das perdas embrionárias (Gordon, 1997 e Aisen, 2004b).

### **3.1.8 – SÉMEN FRESCO, REFRIGERADO OU CONGELADO**

O sémen pode ser usado imediatamente após a sua colheita (sémen fresco) – perús, seres humanos, entre outros –, refrigerado – equinos, suínos, cães, entre outros – ou criopreservado (congelados/descongelados) – bovinos, entre outros (Morrell, 2011).

O sémen pode ser processado de três maneiras:

– Fresco, puro ou diluído (30-37°C) (Aisen, 2004b). Apresenta um intervalo útil de 1,5 horas (Aisen, 2004b).

- Refrigerado (15-5°C). Apresenta um intervalo útil de 12-24 horas (Aisen, 2004b e Granados *et al.*, 2006).
- Congelado (-196°C). Apresenta um intervalo útil indefinido (Aisen, 2004b e Granados *et al.*, 2006).

O sémen de caprinos não pode ser conservado a 37°C, uma vez que a Fosfolipase A hidrolisa os triglicéridos do leite em ácidos gordos livres (Baril *et al.*, 1993 e Morrell, 2011). Estes possuem efeitos adversos sobre a motilidade e a integridade dos espermatozóides do bode (Baril *et al.*, 1993; e Pellicer-Rubio e Combarous, 1998; citados por Morrell, 2011). Quando preservado líquido, o sémen de bode deve ser mantido a 4°C, embora só permaneçam férteis durante 12-24 horas (Gordon, 1997 e Morrell, 2011).

#### 3.1.8.1 – SÉMEN FRESCO

O sémen fresco pode ser usado puro ou diluído (Baril *et al.*, 1993 e Aisen, 2004b).

O sémen fresco necessita de 4-6 horas para sofrer o processo de capacitação no tracto genital feminino antes dos espermatozóides serem férteis (Steyn, 2003). O sémen criopreservado, devido aos processos de congelação/descongelação e às alterações acrossómicas, necessita de muito menos tempo para que ocorra a capacitação (Steyn, 2003). Na IA com sémen congelado/descongelado mesmo pouco tempo após a ovulação podem produzir-se boas taxas de fertilidade (Steyn, 2003).

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). Nos caprinos, devem ser empregues 80-100 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Baril *et al.*, 1993).

#### 3.1.8.2 – SÉMEN REFRIGERADO

A preservação de sémen, particularmente a criopreservação, baixa a fertilidade e causa danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozóides, que resultam na redução da motilidade, viabilidade, transporte e poder fecundante dos espermatozóides (Leboeuf *et al.*, 2000).

A conservação de sémen diluído a temperaturas reduzidas ajuda a prolongar o período de vida dos espermatozóides (Gordon, 1997, Aisen, 2004b, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d), reduzindo o seu metabolismo (Gordon, 1997, Aisen, 2004b, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d) e inibindo o crescimento bacteriano (Morrell, 2011). Usando os nutrientes presentes nos diluidores seminais as bactérias competem com os espermatozóides por estes recursos limitados e libertam subprodutos metabólicos, criando um ambiente pouco favorável à manutenção dos espermatozóides viáveis (Morrell, 2011). Por outro lado, as bactérias mortas libertam endotoxinas que são tóxicas para os espermatozóides (Morrell, 2011).

A refrigeração do sémen é um método que permite que as doses seminais possam ser transportadas para inseminação em explorações algo afastadas espacialmente (Gordon, 1997 e Morrell, 2011). Tradicionalmente nos pequenos ruminantes a IA é feita com sémen fresco ou refrigerado, com taxas de fertilidade aceitáveis (Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d).

O sémen de caprino pode ser refrigerado, diluindo em leite de vaca desnatado, mas a presença de gema de ovo no diluidor está proscria (Baril *et al.*, 1993 e Leboeuf *et al.*, 2000). Se o diluidor contiver gema de ovo há necessidade de lavar o sémen (Baril *et al.*, 1993). Antes da lavagem do sémen, há que suspender o sémen numa solução de Krebs-Ringer-fosfato, contendo glicose, e depois centrifugar a mistura para eliminar o plasma seminal (Baril *et al.*, 1993). São preferíveis duas lavagens a uma lavagem única (Baril *et al.*, 1993).

Nos ovinos, cada dose seminal refrigerada (0,25 ml) deve conter entre  $100-400 \times 10^6$  espermatozóides Eisen (2004b),  $200 \times 10^6$  (Dendena, 2017) ou  $400 \times 10^6$  de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). Nos caprinos, cada dose seminal deve ter  $150 \times 10^6$  espermatozóides (Baril *et al.*, 1993).

### 3.1.8.3 – SÉMEN CONGELADO

O sémen congelado é a forma mais útil de preservação dos espermatozóides a inseminar (Morrell, 2011). Os espermatozóides podem ser conservados por períodos ilimitados de tempo, sem perderem qualidade, excepto a inerente à descongelação (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Enquanto congelado o sémen não se deteriora pelo que pode ser posto em quarentena até o macho ser declarado isento de doenças sexualmente transmissíveis (Morrell, 2011). Contudo,

os espermatozóides de várias espécies têm muita dificuldade em suportar a criopreservação (Aisen, 1993, Baril *et al.*, 1993 e Morrell, 2011). Os espermatozóides dos ruminantes reagem relativamente bem, os das aves resultam em taxas de fertilidade de apenas 2% (Wishart, 1985; citado por Morrell, 2011). Nos ovinos, a criopreservação conduz a taxas de fertilidade inferiores em cerca de 20% à do sémen refrigerado (Baril *et al.*, 1993). Grobbelaar e Joubert (1986) (citados por Gordon, 1997), observaram uma taxa de fertilidade, pós-inseminação cervical com sémen congelado de 54-63% pós sincronização com MAP + eCG. Contudo no ano seguinte estes autores registaram uma taxa de apenas 25-28% (Grobbelaar e Joubert, 1986; citados por Gordon, 1997). Segundo Anel *et al.* (2005) o ano, a estação do ano e o sistema de exploração são dos factores que mais condicionam a taxa de fertilidade pós-IA.

Nas explorações animais os custos da criopreservação e a previsão da taxa de sucesso após a IA devem ser avaliadas antes de se decidir pela utilização de sémen fresco, refrigerado ou congelado (Morrell, 2011). Os resultados conseguidos via IA com sémen congelado são muito díspares devido a múltiplos factores que afectam a integridade das membranas dos espermatozóides (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000 e Aisen, 2004b). Os mais importantes estão relacionados com os tipos de diluidores e os métodos de congelação/descongelação (Aisen, 2004b). Os últimos afectam principalmente o sistema de membranas celulares causando alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais numa percentagem significativa de células espermáticas (Leboeuf *et al.*, 2000 e Aisen, 2004b). Os processos de congelação/descongelação do sémen reduzem a motilidade e rompem as membranas dos espermatozóides (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000 e Aisen, 2004b). De um modo geral assume-se que estas modificações são prejudiciais e estão associados ao baixo poder fecundante dos espermatozóides logo após a descongelação (Leboeuf *et al.*, 2000 e Aisen, 2004b). Resultados recentes mostraram que muitos dos espermatozóides que permanecem imóveis depois da criopreservação possuem membranas desestabilizadas a tal ponto que não sobrevivem o tempo necessário no tracto genital feminino pós-IA (Aisen, 2004b e Morrell, 2011).

É sabido que os espermatozóides congelados/descongelados requerem menos tempo de capacitação no tracto genital feminino quando comparado com o sémen fresco (Aisen, 2004b). Esta hipótese é sustentada por alterações que ocorrem nas membranas dos espermatozóides durante a congelação/descongelação semelhantes aos que sofrem durante a capacitação (Aisen, 2004b). Os espermatozóides criopreservados conseguem

facilmente fertilizar o ócito II se deixados perto deles, por exemplo durante a inseminação intra-uterina (por laparoscopia) (Baril *et al.*, 1993 e Aisen, 2004b) e a fertilização *in vitro* (Aisen, 2004b). Por isso, a deposição do sémen congelado no canal cervical produz resultados variáveis e pobres, enquanto o deixado nos cornos uterinos conduzem a boas taxas de fertilidade (Gordon, 1997). Algumas destas modificações membranares podem ser prevenidas ou revertidas adicionando antioxidantes nos diluidores (Aisen, 2004b).

Os danos celulares após congelação/descongelação dão ideia de lesões a nível da membrana plasmática, acrossoma, núcleo, peça intermédia e axonema, entre outros (Aisen, 2004b). Os primeiros são os mais sensíveis à congelação/descongelação (Aisen, 2004b). Os estudos da membrana citoplasmática detectaram danos selectivos segundo as áreas da membrana destacando-se pela sua magnitude, a da peça intermédia e a do segmento principal do acrossoma (Aisen, 2004b). Estes danos ocorrem principalmente, durante os processos de congelação/descongelação e não durante a manutenção em azoto líquido (Aisen, 2004b).

Os espermatozóides criopreservados são misturados com uma solução protectora contendo lipoproteínas, açúcares e um crioprotector, como o glicerol (estrutura do espermatozóide) (Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Estes constituintes ajudam a manter a integridade da membrana durante os processos de arrefecimento/aquecimento (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Porém, a motilidade espermática também tem de ser mantida, para que os espermatozóides descongelados possam alcançar os ócitos II e fecundá-los (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Há uma procura constante por novos diluidores espermáticos e protocolos de criopreservação do sémen (Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Um avanço recente consiste na substituição do glicerol por dimetilsulfóxido (DMSO) e de formamida amidas e dimetilformamida (Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Estas moléculas parecem funcionar melhor do que o glicerol na criopreservação do sémen de equinos (Morrell, 2011). Uma possível explicação para este facto parece estar associada à dimensão das suas moléculas que passam mais facilmente e sem danificar as membranas espermáticas (Morrell, 2011).

Antes da congelação alguns autores separam por centrifugação os espermatozóides dos bodes (e também os dos equinos, dos suínos e dos seres humanos) do plasma seminal (Baril *et al.*, 1993 e Morrell, 2011). Os espermatozóides são então diluídos em diluidores seminais, armazenados em palhinhas e congelados em vapores

de azoto líquido, antes de serem mergulhados em azoto líquido (-196°C) (Morrell, 2011).

A taxa de sucesso da criopreservação varia muito em função da raça, apesar da intensa investigação relativa aos constituintes dos criodiluidores e das taxas de congelação e de descongelação (Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Em França, a taxa de fertilidade das cabras inseminadas artificialmente profundamente com sémen congelado na estação de anestro após indução hormonal da actividade ovárica ronda os 65% (Leboeuf *et al.*, 2008; citados por Morrell, 2011). Muitos outros autores obtêm taxas de fertilidade muito mais baixas 20-30% (Morrell, 2011) ou 16,7% (Cortez, 2012). Tal como já foi anteriormente referido os espermatozóides que sobrevivem aos processos de congelação/dcongelação (percentagens aceitáveis) apresentam um período de vida mais curto (Aisen, 2004b e Morrell, 2011). Valentim *et al.* (2002) obteve em cabras Serranas uma taxa de fertilidade após IA cervical, com sémen congelado de 70,0%.

Nos ovinos, o número total de espermatozóides a depositar nos cornos uterinos varia entre 20-100 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). Nos ovinos, os melhores resultados são obtidos quando a inseminação intra-uterina é feita entre as 45-70 horas pós-remoção das esponjas vaginais dependendo da raça, do número de partos e da estação do ano (Baril *et al.*, 2011). As taxas de fertilidade podem ultrapassar os 70% quando a inseminação das ovelhas é realizada entre as 55-65 horas e a das cabras é efectuada entre as 45-55 horas (Baril *et al.*, 2011).

Nos ovinos, a dose seminal congelada para IA cervical (0,25 ml) deve conter 450 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). Nos caprinos, esta dose (0,5 ml) deve conter 200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Baril *et al.*, 1993).

### **3.1.9 – LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÉMEN NO TRACTO GENITAL FEMININO**

Durante a monta natural os machos depositam o sémen em diferentes locais do tracto genital feminino (dependendo da espécie) (Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d). Nos ruminantes e nos seres humanos o sémen tem de ser depositado no fundo do saco vaginal, enquanto nos suínos, nos caninos, nos camelídeos e nos equídeos o sémen é deixado no interior do útero (canal cervical ou corpo do útero) (Morrell, 2011).

### 3.1.9.1 – VAGINAL

Nas ovelhas, as doses seminais para deposição vaginal (“tiro às escuras”) devem conter entre 200-400 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Dendena, 2017) ou 300 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (Aisen, 2004a). O índice de fertilidade pós-inseminação vaginal varia entre 40-65% (Ax *et al.*, 2004) ou de 88,9% (Dendena, 2017). Nos caprinos, esta técnica está contra indicada pois resulta em baixas taxas de fertilidade (Simões *et al.*, 2008; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Nos pequenos ruminantes é possível depositar o sémen para lá da 1-2<sup>a</sup> prega cervical (Valentim *et al.*, 2016d).

### 3.1.9.2 – CERVICAL

Na maioria das espécies, a inseminação pode ser feita ultrapassando o canal cervical com um cateter e depositando o sémen no colo (Valentim *et al.*, 2016d) ou no corpo do útero (Gordon, 1997, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d). As exceções são os ovinos e os caprinos, em que a diminuto diâmetro (principalmente nas cabras) e/ou a conformação desalinhada das pregas cervicais (particularmente nas ovelhas) dificulta a passagem do pistolete de inseminação (Baril *et al.*, 1993, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d). Segundo Baril *et al.* (1993), cada dose seminal de sémen fresco deve conter no mínimo 60 x 10<sup>6</sup> espermatozóides que se traduzem em taxas de fertilidade aceitáveis. Nos ovinos, as doses de sémen refrigerado devem conter 100-200 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (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 e Valentim *et al.*, 2009) ou de 66,7-88,2% (Dendena, 2017). A fertilidade aumenta com o número de pregas ultrapassadas desde que não se force a entrada (Aisen, 2004a e Valentim *et al.*, 2016d). Este efeito não foi observado por Dendena (2017). A inflamação ou a lesão da mucosa cervical diminui ainda mais o diâmetro interior do canal cervical e causa um afluxo anormal de células de defesa ao seu lúmen (Aisen, 2006a, Candappa e Bartlewski, 2011; Ritar e Salamon, 1983 e Fonseca *et al.*, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d).

Nos ovinos a inseminação cervical deve ser feita 48-60 horas pós-remoção das esponjas vaginais (Gordon, 1997, Ax *et al.*, 2004 e Donovan *et al.*, 2004; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Se a inseminação for simples, Baril *et al.* (1993), Gordon,

1997, Ax *et al.* (2004) e Dendena (2017) recomendam que esta seja feita 55 horas pós-tratamento. Se for dupla há que realizá-las 50-60 horas (Baril *et al.*, 1993) ou 48 e 60 horas pós tratamento (Ax *et al.*, 2004). Nos protocolos franceses, as inseminações cervicais são feitas 43 horas (Alpina) ou 45 horas (Saanen) após a remoção das esponjas vaginais (Corteel e Leboeuf, 1990; citados por Leboeuf *et al.*, 2000). Nas cabras Serranas, os técnicos da ANCRAS (Associação Nacional de Caprincultores da raça Serrana) realizaram a IA 43 horas pós-tratamentos (Pereira, informação pessoal, 2016). Baril *et al.* (1993) recomendam que esta seja feita  $45 \pm 1$  horas após a remoção das esponjas. Caso sejam realizadas duas IA, estas devem ser feitas 30 e 48 horas pós-tratamento progestagénico (Baril *et al.*, 1993). Nos protocolos de cabras produtoras de fibras, as IA cervicais ocorrem 48-59 horas após a remoção das esponjas vaginais e da administração de eCG (Ritar e Salamon, 1984; citados por Leboeuf *et al.*, 2000) ou 40-48 horas após a remoção das esponjas quando a eCG é injectada 48 horas antes da remoção das esponjas vaginais (Rittar *et al.*, 1989; citados por Leboeuf *et al.*, 2000). Se o controlo da actividade reprodutiva for feito por CIDR a IA deve ser realizada 10-15 horas antes do que quando são usados progestagénios (Ritar *et al.*, 1990; citados por Leboeuf *et al.*, 2000).

### 3.1.9.3 – INTRA-UTERINA

Se a sincronização for feita apenas com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , o momento ideal de inseminar é mais difícil de estabelecer (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997; e Fierro *et al.*, 2013; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Convém não esquecer que esta hormona tem efeitos deletérios sobre a formação de depósitos, o transporte e a capacitação de espermatozóides no tracto genital feminino (Baril *et al.*, 1993, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b). Por outro lado, ela afecta os mecanismos ovários (Baril *et al.*, 1993 e Valentim *et al.*, 2016b). Após sincronização com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , a IA deve ser realizada 16-18 horas após o início do cio (Al Yacoub *et al.*, 2011; citados por Valentim *et al.*, 2016d).

As vantagens de depositar o sémen no útero é a de ter ultrapassado a primeira grande barreira à progressão dos espermatozóides, dar início o processo de capacitação espermática e diminuir as perdas de sémen por refluxo (Morrell, 2011). Por outro lado, com um só ejaculado pode-se inseminar um maior número de fêmeas reprodutoras (Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d).

A Inseminação Transcervical (TAI) baseia-se na localização, retracção e estabilização do cérvix, permitindo a realização de uma inseminação intra-uterina (Aisen, 2004a e Valentim *et al.*, 2016d). Para o conseguir utiliza-se um vaginoscópio, uma fonte de luz fria, instrumentos para fixar a cérvix (Aisen, 2004a, Ax *et al.*, 2004; e Ferra e Sereno, 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016d) e/ou de fármacos (Abecia e Forcada, 2010 e Candappa e Bartlewski, 2011). A taxa de sucesso desta técnica é de 6%, nas ovelhas e de 60%, nas cabras (Fonseca *et al.*, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Nas ovelhas, para além do canal cervical ser muito estreito possui 3-7 (Kershaw *et al.*, 2005) ou 4-7 pregas (Valentim *et al.*, 2016d). Por outro lado, nos ovinos é frequente que a segunda e a terceira pregas se encontrem desalinhas com a primeira, levando a que seja necessário pinçar a parede adjacente à projecção externa do cérvix para traccionar esta estrutura uterina (Ferra e Sereno, 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Nos caprinos, o processo de TAI é mais fácil porque o canal cervical é mais largo e “só” há que ultrapassar “apenas” 3-5 pregas, depois de traccionar esta estrutura uterina (Aisen, 2004a e Valentim *et al.*, 2016d)

Em ambas as espécies, a TAI deve ser aplicada 72 horas pós administração da segunda injeção de PGF<sub>2α</sub> (Bowdridge *et al.*, 2012; citados por Valentim *et al.*, 2016d).

A inseminação intra-uterina por laparoscopia (LAI) consiste na deposição de uma pequena dose seminal directamente nos cornos uterinos, via laparoscopia (Aisen, 2004a e Valentim *et al.*, 2016d). Nos ovinos, inseminam-se 10-12 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides móveis (Gordon, 1997) ou 10-50 x 10<sup>6</sup> espermatozóides móveis (Aisen, 2004a) e nos caprinos 120 x 10<sup>6</sup> espermatozóides móveis (Gordon, 1997). Mesmo com sémen criopreservado, as taxas de fertilidade são elevadas: 60% (Baril *et al.*, 1993) e 65-80% (Ax *et al.*, 2004). Esta técnica é mais utilizada em ovinos do que em caprinos devido à anatomia do canal cervical (Valentim *et al.*, 2016d). Nos ovinos, alguns autores conseguiram uma maior fertilidade quando inseminaram os dois cornos uterinos (metade da dose em cada um deles) (Perkins *et al.*, 1996; citados por Valentim *et al.*, 2016d).

## **II – TRABALHO EXPERIMENTAL**

### **1 – MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança, na Quinta do Pinheiro Manso (Latitude 41° 48' 33''N, Longitude 6° 44' 3''W e Altitude 670 metros), pertencente à Escola Superior Agrária-Instituto Politécnico de Bragança, entre 11 de abril e 13 de junho 2016.

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

Este ensaio teve início com a pesagem das cabras em uma balança com jaula (sensibilidade mínima de 100 g) e a determinação da sua condição corporal (CC) segundo a tabela de classificação de Villaquiran *et al.* (2004).

#### **1.1 – ANIMAIS**

Neste trabalho foram utilizadas 67 cabras adultas da raça Serrana, ecótipo Transmontano, pertencentes ao rebanho pedagógico-experimental da ESA-IPB, com idades compreendidas entre os 2-9 anos. A última parição tinha ocorrido cerca de 6 meses antes (outubro).

#### **1.2 – AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA**

A actividade ovárica das cabras foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de progesterona. A recolha das amostras de sangue foi feita com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através da 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). O teste de radioimunoensaio (RIA) foi feito com recurso a um leitor de cintilações DPC<sup>®</sup> Gamma C12, segundo a técnica indicada pelo fabricante dos *kits* (*DiaSource ImmunoAssays*<sup>®</sup>, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 7,3 e 15,6%.

##### **1.2.1 – INICIAL**

Nas primeiras duas semanas de ensaio (11 e 18 de abril), com o objectivo de determinar o estado fisiológico inicial das cabras, pela manhã com 3-4 dias de intervalo, procedeu-se à recolha de amostras de sangue por punção da veia jugular, para posterior

determinação dos níveis plasmáticos de progesterona.

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

### 1.2.2 – PÓS-TRATAMENTOS APLICADOS

Com o intuito de identificar a formação do primeiro CL pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG, nos cinco dias seguintes à administração de eCG procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para posterior determinação dos níveis plasmáticos de progesterona.

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

### 1.3 – TRATAMENTOS APLICADOS

No dia 27 de abril, todas as cabras foram tratadas com esponjas vaginais impregnadas com 20 mg de FGA (Acetato de Fluorogestona; Chrono-Gest<sup>®</sup>, Intervet, Portugal) (Quadro I). (Ao contrário do que se pensava, as esponjas vaginais não afectam negativamente a microflora (Suárez *et al.*, 2006, Manes *et al.*, 2010 e Oliveira *et al.*, 2013) e a composição das secreções vaginais quando da IA e não afectam a taxa de fertilidade (Manes *et al.*, 2010)). Simultaneamente, todas elas foram injectadas intramuscularmente com 100 µg de cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>, MSD Animal Health, Portugal) – análogo sintético de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>).

QUADRO I - Divisão das cabras segundo os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva

<b>FGA + 100 µg de cloprostenol</b> (n = 67)	
<b>Remoção das esponjas vaginais</b> + <b>300 UI de eCG</b> (n = 34)	<b>Remoção das esponjas vaginais</b> + <b>500 UI de eCG</b> (n = 33)

O tratamento progestagénico teve a duração de 7 dias. Quando da remoção das

esponjas vaginais (4 de maio), as cabras foram divididas em dois grupos: 34 foram injectadas IM com 300 UI de eCG/cabra (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet, Portugal) e as demais 33 com 500 UI de eCG/cabra (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet, Portugal).

#### 1.4 – RECOLHA DE SÉMEN

O sémen foi recolhido por electroejaculação (Electrojac<sup>™</sup> Ideal, Minesota, EUA). Foram recolhidos 4 ejaculados (2 de manhã e 2 de tarde), todos do mesmo bode (4 anos); este já não ejaculava há 3 dias. Depois da colheita, os tubos colectores foram transportados para o laboratório onde foram mantidos a 37°C em um banho-maria (Grant International, Cambridge, Inglaterra). No mesmo equipamento foram conservados os diluidores seminais.

#### 1.5 – ANÁLISES SEMINAIS

O volume foi medido através da graduação dos tubos colectores e a motilidade e a concentração espermática foram estimadas com o auxílio do sistema CASA da Minitube (Androvision<sup>®</sup>, Minitüb, Tiefenbach, Alemanha), constituído por um microscópio de contraste de fase Carl Zeiss Axio Lab A1 (Gottngun, Alemanha), com placa aquecida (37°C) e uma camara de vídeo (Basler camera A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha). Foram tiradas cerca de 30 fotos/0,5 minutos. Foram usadas lâminas não reutilizáveis com 4 câmaras Leja 20 (Leja Products, B.V., Nieuw-Vennep, Holanda). O *software* foi programado para gravar 7 campos (motilidade) e 30 campos (concentração espermática) sob contraste de fase negativo e uma ampliação de X 200. No laboratório existiam duas placas de aquecimento (37°C) que permitiam manter todos os demais utensílios (pontas de pipetas, tubos, lâminas com 4 câmaras Leja 20).

Os ejaculados utilizados tinham um volume  $\geq 2,0$  ml, uma motilidade  $\geq 75\%$  e uma concentração espermática  $\geq 3,0 \times 10^9$  espermatozóides/ml.

#### 1.6 – DOSES SEMINAIS

Depois de preparadas as análises seminais, cada ejaculado foi inicialmente diluído (1:1) (Baril *et al.*, 1993) com um de dois diluidores comerciais Andromed<sup>®</sup> (Minitüb,

Tiefenbach, Alemanha) e INRA 96<sup>®</sup> (IMV Technologies, L'Aigle, França). Posteriormente, o volume foi acertado com os valores indicados pelo programa Androvision<sup>®</sup> (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). De seguida a temperatura dos ejaculados recolhidos de manhã foi reduzida, durante cerca de 90 minutos de 37°C para 15°C (Neslab<sup>®</sup> RTE 221, Newington, EUA). No final, após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, de 80 x 10<sup>6</sup> espermatozóides. As palhinhas brancas continham sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> (n = 33) e as vermelhas sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup> (n = 34) (Quadro II).

Os espermatozóides recolhidos de tarde também foram inicialmente diluídos (1:1) – Andromed<sup>®</sup> (Minitube, Alemanha) e INRA 96<sup>®</sup> (IMV Technologies, França). Posteriormente, o volume foi acertado com os valores fornecidos pelo programa Androvision<sup>®</sup> (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, 80 x 10<sup>6</sup> espermatozóides. As palhinhas brancas continham sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> e as vermelhas, sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup>.

QUADRO II -Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com Andromed<sup>®</sup> ou com INRA 96<sup>®</sup> aplicadas

300 UI (n = 34)				500 UI (n = 33)			
Fresco (n = 16)		Refrigerado (n = 18)		Fresco (n = 16)		Refrigerado (n = 17)	
Andromed (n = 9)	INRA96 (n = 8)	Andromed (n = 9)	INRA96 (n = 9)	Andromed (n = 8)	INRA96 (n = 8)	Andromed (n = 8)	INRA96 (n = 9)

As palhinhas de sémen refrigerado foram transportadas numa arca refrigeradora da Minitüb (Tiefenbach, Alemanha), a 15°C. As palhinhas de sémen fresco foram transportadas num banho-maria de transporte da IMV Technologies (L'Aigle, França) a 37°C.

Entre o término do processo de refrigeração e de preparação das doses de sémen refrigerado (n = 35) e de sémen fresco (n = 32) e o começo da IA passaram menos de 30 minutos.

## 1.7 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL A TEMPO FIXO

As cabras foram inseminadas, independentemente de terem manifestado cio, cerca de 43 + 1 horas pós-administração de eCG. Começou-se por inseminar as cabras com sémen fresco.

Após a aplicação dos tratamentos de controlo da actividade reprodutiva, cerca de metade das cabras foram inseminadas com sémen fresco e a outra metade com sémen refrigerado (Quadro II). Em ambos os grupos, cerca de metade das ovelhas foram inseminadas com sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> e a outra metade com sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup>.

Registou-se a cor da mucosa (rosa vs. rosa escuro vs. hemorrágico), e a lubrificação (reduzida vs. boa) da vagina, o local de deposição do sémen (vaginal vs. 1<sup>a</sup> prega vs. 2<sup>a</sup> prega) e se houve refluxo (sim vs. Ligeiro vs. não). A deposição do sémen foi feita sempre o mais profundamente possível com o auxílio de fórceps vaginais, luzes LED e pistoletes Quicklock (Minitüb<sup>®</sup>, Alemanha).

## 1.8 – DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Quarenta dias (15/06/16) após a remoção das esponjas vaginais, 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 (5-10 MHz).

## 1.9 – 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 cabras era de  $4,2 \pm 2,1$  anos (c.v. = 49,6%). As diferenças de idade registadas entre as cabras tratadas com 300 UI e com 500 UI de eCG revelaram-se estatisticamente não significativas ( $P > 0,05$ ) (Quadro III). O mesmo sucedeu relativamente às cabras que foram inseminadas com sémen fresco e com sémen refrigerado ( $P > 0,05$ ). A idade também não variou em função do diluidor usado ( $P > 0,05$ ).

As cabras pesavam em média,  $42,7 \pm 5,9$  kg (c.v. = 13,9%) e apresentavam uma CC média de  $2,9 \pm 0,3$  (c.v. = 9,4%). As diferenças de peso corporal e de CC entre cabras tratadas com 300 UI ou 500 UI de eCG, inseminadas com sémen fresco ou refrigerado, diluído com Andromed<sup>®</sup> ou com INRA 96<sup>®</sup> foram estatisticamente não significativas ( $P > 0,05$ ).

QUADRO III - Idade, peso corporal e condição corporal (CC) das cabras, segundo a dose de gonadotropina, o processo de preservação e o tipo de diluidor

	<b>Idade</b> (anos)	<b>Peso</b> (kg)	<b>CC</b> (pontos)
<b>eCG (300 UI)</b>	$4,4^a \pm 2,0$	$43,6^a \pm 5,1$	$2,9^a \pm 0,3$
<b>eCG (500 UI)</b>	$4,1^a \pm 2,2$	$42,0^a \pm 6,7$	$2,9^a \pm 0,3$
<b>Fresco</b>	$4,3^a \pm 2,2$	$42,2^a \pm 5,2$	$2,9^a \pm 0,3$
<b>Refrigerado</b>	$4,1^a \pm 2,0$	$43,3^a \pm 2,2$	$3,0^a \pm 0,3$
<b>Andromed<sup>®</sup></b>	$4,2^a \pm 2,0$	$42,3^a \pm 5,0$	$2,9^a \pm 0,2$
<b>INRA 96<sup>®</sup></b>	$4,3^a \pm 1,6$	$43,3^a \pm 6,8$	$2,9^a \pm 0,3$

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

### 2.1 – ESTADO FISIOLÓGICO PRÉ-TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS

Segundo Steyn (2003), os investigadores devem identificar o estado fisiológico das fêmeas antes de começar o processo de controlo da actividade reprodutiva e de aplicar a técnica de IA. Nas duas semanas anteriores à aplicação do tratamento progestagénico “curto” e eCG (11-18 de abril), todas as cabras apresentaram em, pelo menos uma das tomas de sangue, níveis plasmáticos de progesterona superiores a 0,5 ng/ml, estavam todas “cíclicas”. No mês de abril, as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, costumam estar em anestro sazonal (Correia *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2009). É possível que esta diferença resulte de disparidades anuais nas condições climáticas que condicionam o desenvolvimento das pastagens natural e os gastos em

termorregulação. Por outro lado no presente trabalho as cabras estavam instaladas num pavilhão com muito melhores condições (menos perdas de energia em termorregulação, logo maiores disponibilidades de energia para a reprodução) do que em anos anteriores.

Nem a idade, nem o peso corporal, nem a CC afectaram significativamente o estado fisiológico pré-tratamentos progestagénicos “curtos” + eCG ( $P>0,05$ ). A maioria dos animais tinha uma óptima idade reprodutiva (4,2 anos), um bom peso (42,4 kg) e uma óptima condição corporal (2,9 pontos) para a cobrição.

## 2.2 – RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS CURTOS

Cerca de 94,2% das cabras tratadas apresentaram resposta ovárica, valor ligeiramente superior (50-90%) aos indicados por Bonilla (2001). A dose de eCG administrada não condicionou a taxa de resposta ovárica completa (300 UI: 94,1% vs. 500 UI: 96,7%) ( $\chi^2 = 1,0$ ;  $P>0,05$ ). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Correia *et al.* (2006). Todavia, os técnicos da ANCRAS usam doses de 500 UI (Pereira, informação pessoal, 2016). Esta diferença está seguramente associada ao facto do trabalho de Correia *et al.* (2006) (tal como o presente trabalho) ter sido feito com cabras do rebanho experimental da ESA-IPB e os valores indicados pelos técnicos da ANCRAS serem os mais adequados para os rebanhos comerciais. O *stress* é uma causa de subfertilidade (Dobson e Smith, 2000). Durante a fase folicular, o *stress* causado pela manipulação das fêmeas interfere com a libertação episódica das hormonas reprodutivas (Dobson e Smith, 2000). O transporte, ou a insulina, reduz a frequência e a amplitude da libertação de GnRH, o que sugere que o *stress* actua no hipotálamo ou em centros nervosos elevados do cérebro (Dobson e Smith, 2000). O *stress* acaba por atrasar o pico pré-ovulatório de LH. Pensa-se que este efeito é mediado pelos opióides (Dobson e Smith, 2000).

Nas cabras Serranas nulíparas e primíparas, o pico pré-ovulatório de LH ocorre maioritariamente, entre as 36-84 horas após a remoção das esponjas vaginais (Simões *et al.*, 2010). A primeira elevação dos níveis plasmáticos de progesterona surgiu, em média,  $76,0 \pm 17,4$  horas (c.v. = 22,9%) pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG. A diferença não foi afectada pela dose de eCG injectada (300 UI:  $76,2 \pm 17,2$  dias vs. 500 UI:  $75,8 \pm 17,4$  dias) ( $P>0,05$ ).

O tempo da inseminação artificial pós-tratamento de sincronização de cios é muito importante (Kukovics *et al.*, 2011). A melhor altura difere segundo os autores: 43 horas (Pereira, informação pessoal, 2016) e 45 horas (Baril *et al.*, 1993; e Corteel e Leboeuf, 1990; citados por Leboeuf *et al.*, 2000). Não nos parece que a escolha das 43 horas pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG para inseminar tenha sido a mais acertada (perda de 20% de fertilidade). A dúvida deve ser esclarecida num futuro estudo.

### 2.3 – RESPOSTA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Quarenta dias após a inseminação artificial, 74,6% (n = 25) das cabras estavam gestantes. Quase 20% das cabras que ovularam não ficaram gestantes. As taxas de fertilidade indicadas na bibliografia rondam os 50-65% (Baril *et al.*, 1993, Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009). É possível que a perda de 20% na fertilização tenha a ver com o momento em que foi realizada a IA ou que resulte do número de espermatozóides inseminados  $80 \times 10^6$  espermatozóides. Pode ter resultado da qualidade bioquímica e biofísica do sémen recolhido por electroejaculação (Morello e Chemineau, 2004 e Morrell, 2011). Pode ainda resultar do facto de não se ter precedido à lavagem dos espermatozóides (Leboeuf *et al.*, 2000 e Baril *et al.*, 1993), o que reduz a sua motilidade (Leboeuf *et al.*, 2000). Por outro lado, o *stress* induzido na inseminação artificial reduz a fertilidade, interferindo no mecanismo da fecundação e aumentando a taxa de mortalidade embrionária (Gordon 1997).

#### 2.3.1 – DOSE DE ECG

Nas ovelhas, a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial depende da quantidade de eCG administrada (Hill *et al.*, 1998; citados por Kukovics *et al.*, 2011). Neste trabalho, a dose de eCG injectada não condicionou a taxa de fertilidade das cabras (300 UI: 73,5% vs. 500 UI: 75,8%) ( $\chi^2 = 0,1$ ;  $P > 0,05$ ).

#### 2.3.2 – MÉTODO DE PRESERVAÇÃO

De um modo geral, as taxas de fertilidade são mais baixas com sémen refrigerado (Gordon, 1997 e Aral *et al.*, 2011). No presente trabalho, a taxa de fertilidade não variou em função do método de preservação do sémen (Refrigerado: 77,1% vs. Fresco: 71,9%) ( $\chi^2 = 0,7$ ;  $P > 0,05$ ).

### 2.3.3 – DILUIDORES SEMINAIS

O diluidor seminal também não afectou significativamente a taxa de fertilidade (Andromed<sup>®</sup>: 70,6% vs. INRA 96<sup>®</sup>: 78,8%) ( $\chi^2 = 1,7$ ;  $P > 0,05$ ). Ainda que o Andromed<sup>®</sup> (com glicerol) tendo sido desenvolvido para preservação de sémen de bovinos e o INRA 96<sup>®</sup> (sem glicerol) para preservação de sémen de equinos, ambos revelaram o seu valor na preservação de sémen de caprino.

### 2.3.4 – COR DA MUCOSA VAGINAL

A cor da mucosa vaginal afectou a taxa de fertilidade (Quadro IV). Neste trabalho, a cor Rosa e Rosa hemorrágico proporcionaram uma taxa de fertilidade máxima (100,0%). O facto das duas cabras que tinham sinais de sangue na vagina terem ficado gestantes foi surpreendente. É possível que o trauma que resultou na perda de sangue tenha sido local e como o sémen foi depositado depois da segunda prega não foi impeditivo da fecundação. No mesmo sentido, o facto das cabras que apresentavam uma vagina com uma cor Rosa Escuro (supostamente, resultante de uma maior presença de sangue na vagina) e que se pensava ser sinal de “pleno cio”, terem apresentado uma taxa de fertilidade de apenas 73,0% foi também uma surpresa. Neste sentido é possível que a cor da vagina varie mais por motivos genéticos e/ou de saúde do que do estado fisiológico de cio.

QUADRO IV - Cor da mucosa vaginal quando da inseminação artificial e a sua relação com a taxa de fertilidade

Cor da Mucosa Vaginal	Taxa de Fertilidade
Rosa	100,0% <sup>a</sup> (2/2)
Rosa escuro	73,0% <sup>b</sup> (46/63)
Rosa hemorrágico	100,0% <sup>a</sup> (2/2)

a=a, para  $P > 0,05$  e a $\neq$ b, para  $P \leq 0,001$ .

### 2.3.5 – LUBRIFICAÇÃO VAGINAL

Na IA cervical o sémen é depositado na porção anterior do canal cervical e o transporte do sémen é afectado pela quantidade e qualidade do muco cervical (Santolaria *et al.*, 2011). Quando as ovelhas têm um fluxo abundante ou muito reduzido a fertilidade diminui, pelo que é conveniente eliminar o excesso de muco (Palacios, 2010 e Dendena, 2017). Foi frequente ter de deixar escorrer para o exterior da vulva a

maioria das secreções presentes no tracto genital das cabras, pois estas impediam a observação da entrada do canal cervical. Ainda assim a esmagadora maioria das cabras inseminadas apresentavam uma lubrificação abundante que afectou negativamente a taxa de fertilidade (abundante: 72,7% vs. reduzida: 100,0%) ( $\chi^2 = 31,2$ ;  $P < 0,001$ ). Aparentemente, o excesso de lubrificação terá promovido uma maior diluição da dose seminal nas secreções do tracto genital feminino (removendo rapidamente os efeitos protectores do plasma seminal) (Morrell, 2011 e Santolaria *et al.*, 2011) e eventualmente um aumento do refluxo vulvar (Dendena, 2017).

### 2.3.6 – LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÉMEN

Na inseminação cervical a taxa de fertilidade é maior quanto mais profundamente for deixado o sémen (Aisen, 2004a, Anel *et al.*, 2005, Candappa e Bartlewski, 2011 e Valentim *et al.*, 2016d). Na maioria das fêmeas o sémen foi colocado logo após à primeira prega, obtendo-se a melhor taxa de fertilidade (Quadro V). Segundo alguns autores, o possível trauma que a tentativa de ultrapassar a segunda prega comporta um decréscimo da fertilidade por afectar o transporte e a viabilidade dos espermatozóides no tracto genital feminino, originando um maior fluxo de células imunitárias ao lúmen do canal cervical (Aisen, 2006a, Candappa e Bartlewski, 2011; Ritar e Salamon, 1983 e Fonseca *et al.*, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016d). Aparentemente foi o que sucedeu neste trabalho. Quando o sémen foi deixado no fundo do saco vaginal, a taxa de fertilidade foi superior à observada após a tentativa de passar a segunda prega. O mesmo foi verificado em ovelhas por Dendena (2017).

QUADRO V - Local da deposição do sémen e sua relação com a taxa de fertilidade

Local deposição do sémen	Taxa de Fertilidade
Vaginal	75,0% <sup>a</sup> (6/8)
1 <sup>a</sup> prega	88,2% <sup>b</sup> (35/45)
2 <sup>a</sup> prega	66,7% <sup>c</sup> (9/14)

a≠b e a≠c, para  $P \leq 0,05$ ; a≠b e b≠c para  $P \leq 0,001$ .

### 2.3.7 – REFLUXO CERVICAL

Na maioria das inseminações (n = 53) não houve refluxo cervical, que se traduziu numa excelente taxa de fertilidade (81,1%). A maioria das cabras inseminadas depois de

ultrapassar a 1ª ou a 2ª prega não fez refluxo (Quadro VI) e a taxa de fertilidade foi muito elevada. Pelo contrário, as fêmeas que apresentaram refluxo seminal apresentaram uma taxa de fertilidade mais baixa (Candappa e Bartlewski, 2011). Verificou-se que as cabras com um ligeiro refluxo foram as que apresentaram pior taxa de fertilidade. Desconhece-se o motivo.

QUADRO VI - Refluxo seminal e sua relação com a taxa de fertilidade

<b>Refluxo Seminal</b>	<b>Taxa de Fertilidade</b>
Sem	81,1% <sup>a</sup> (43/53)
ligeiro	44,4% <sup>b</sup> (4/9)
Com	60,0% <sup>c</sup> (3/5)

a≠b, para P≤0,0001; a≠c, para P≤0,01; b≠c, para P≤0,05.

### 3 – CONCLUSÕES

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

- Em meados de abril, todas as cabras Serranas – ecótipo Transmontano, estavam cíclicas.
- Cerca de 94,2% das cabras tratadas apresentaram resposta ovárica completa.
- A dose de eCG não afectou a taxa de “ovulação” (300 UI: 94,1% vs. 500 UI: 96,7%).
- Cerca de 74,6% das cabras ficaram gestantes.
- A dose de eCG injectada não afetou a taxa de fertilidade (300 UI: 73,5% vs. 500 UI: 75,8%).
- A taxa de fertilidade não variou em função do método de preservação do sémen (fresco: 71,9% vs. refrigerado: 77,1%).
- O diluidor seminal também não afectou significativamente a taxa de fertilidade (Andromed<sup>®</sup>: 70,6% vs. INRA 96<sup>®</sup>: 78,8%).
- A lubrificação abundante influenciou negativamente a taxa de fertilidade (abundante: 72,7% vs. reduzida: 100,0%).
- Na maioria das cabras, o sémen foi colocado logo após à primeira prega, correspondem a melhores taxas de fertilidade (88,2%).
- A taxa de fertilidade pós-inseminação vaginal foi superior (à registada) à do sémen depositado após a segunda prega vaginal (Vaginal: 75,0% vs. 2<sup>a</sup> prega: 66,7%).
- A ausência de refluxo cervical resulta numa boa taxa de fertilidade (81,1%).

### III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, A.M. e Forcada, F.M., 2010. Manejo reproductivo en ganado ovino. Editora SERVET, Saragoça, Espanha, 195pp..
- Abecia, J.A., Forcada F. e Gonzalez-Bulnes, A., 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim Reprod Sci*, 130 (3-4), 173-179.
- 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 e cabras. *In: Reproducción Ovina y Caprina*, E.G. Aisen (Ed), Cap. 8, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- 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., Temamoğullar, 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*, Hafez, E.S.E. e Hafez, B. (Eds), 7ª edição, Manole Editor, São Paulo, Brasil, 531 pp.
- Azevedo, J.M., R.C. Valentim e T.M. Correia, 2006. Controlo hormonal da actividade ovárica em ovinos. *Albeitar, Portuguesa*, 2 (6), 4-8.
- 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..

- Barkawi, A.H., Elsayed, E.H., Ashour, G. e Shehata, E., 2006. Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant Research*, 66, 209-213-
- Bonilla W.E., 2001. Manejo reproductivo de la cabra. In: Producción de cabras lecheras, P.C. Banderas (Ed), Boletín INIA 66, Chillán, Chile, 200 pp.
- 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. *The Open Reproductive Science Journal*, 3, 162-175.
- 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 Prod Anim*, 9 (1), 45-60.
- Correia, T., Azevedo, J., Mendonça, A., Fontes, P., Galvão, L., Cardoso, M., Velasco, H., Maurício, R. e 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 (Supl 3), 83.
- Correia, T., Azevedo, J., Valentim, R., Almeida, J., Galvão, L., Simões, J., Maurício, R., Fontes, P., Mendonça, A. e Medeiros, S., 2006. Administração de diferentes doses de eCG na sincronização de cios de cabras da raça Serrana no início da estação reprodutiva. In: Comunicações da I Reunião Nacional de Caprinicultura, 66-69.
- 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*)
- Crespo, H., Bertolottib, L., Proffitib, M., Casciob, P., Cerrutib, F., Acutisc, P.L., Andréa, D. de, Reina R., e Rosati, S., 2016. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Veterinary Microbiology*, 192, 152-162.

- 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.
- Dunn, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, 56, 52-64.
- Eaglesome, M.D. e Garcia, M.M., 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 16 (1), 215-225.
- El-Maaty, A.M.A. e M.H.A. El-Gawad, 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.
- 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..
- Gordon, I., 1997. Controlled reproduction in sheep and goats, CABI Publishing University Press, 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.
- 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*, Aarutus, Dinamarca.
- 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 nonbreeding season. *Small Ruminant Research*, 113, 365-370.

- Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., 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, 1225-1235.
- 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..
- 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.
- Leboeuf, B., Restall, B. e Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113-141.
- Letelier, C.A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R.A., Sánchez, M.A., García-Palencia, P., Sánchez, B., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Flores, J.M. e Gonzalez-Bulnes, A., 2011. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science*, 126, 61-69.
- Manes, J., Fiorentino, M.A., Kaiser, G., Hozbor, F., Alberio, R., Sanchez, E. e Paolicchi, F., 2010. Changes in the aerobic vaginal flora after treatment with different intravaginal devices in ewes. *Small Ruminant Research*, 94, 201-204.
- Mateus, O.J.P., 2014. Controlo reprodutivo em ovelhas Awassi x Sarda. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Mohtar, M.S.M., Haron, A.W., Yusoff, R., Bakar, M.Z.A., Malik, A., 2014. Effect of high dosis of equine Chorionic Gonadotrophin (eCG) treatments on follicular developments, ovulation and pregnancy rate in Boer goats. *Afr J of Biotechnol*, 13 (12), 1374-1378.

- 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, 300 p..
- Oliveira, J.K., Martins, G., Esteves, L.V., Penna, B., Hamond, C., Fonseca, J.F., Rodrigues, A.L., Brandão, F.Z. e Lilenbaum, W., 2013. Changes in the vaginal flora of goats following a short-term protocol of oestrus induction and synchronisation with intravaginal sponges as well as their antimicrobial sensitivity. *Small Ruminant Research*, 113, 162-166.
- Omontese, B.O., Rekwot, P.I, Makun, H.J., Ate, 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.
- Perkins, N.R., Hill, J.R. e Pedrana, R.G., 1996. Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized Merino ewes. *Theriogenology*. 46 (3), 541-545.
- Romano, J.E., 1996. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal pessaries for estrus synchronization in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 22 (3), 219-223.
- Russel, A.J.F., Doney, J.M. e Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of fat in live sheep. *J Agr Sci*, 72, 451-454.
- Sacoto, S.M.R., 2012. Seasonality of reproduction in Churra da Terra Quente ewes: out-of-season breeding. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 152 p. (*PhD Thesis*)
- 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.

- Santolaria, P., Palacin, I. e Yaniz, J., 2011. Management factors affecting fertility in sheep. Cap 11, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., 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 (4), 339-354.
- Simões, J., Cavaco, S.G., Pereira, F., Capela, J., Fontes, P., Cunha, T., Valentim, R., Teixeira, F., Abreu, D., Teixeira V., Mascarenhas, R., Almeida, J.C., Azevedo, J., Pires, P., Cunha, C., Baril., G., 2010. Eventos peri-ovulatórios e dinâmica folicular em cabras nulíparas e primíparas após “efeito macho” associado a protocolo progestagénico de curta duração. *In: Actas da II Reunião Nacional de Caprinocultura, Capra 2010, Mirandela, Portugal, 69-75.*
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- 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.*
- Suárez, G., Zunino, P., Carol, H. e Ungerfeld, R., 2006. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, 63, 39-43.
- Suguna, K., Mehrotra, S., Agarwal, S.K., Hoque, M., Singha, S.K., Shankera, U. e Saratha, T., 2008. Early pregnancy diagnosis and embryonic and fetal development using real time B mode ultrasound in goats. Technical note. *Small Ruminant Research*, 80, 80-86.

- Turri, F., Kandil, O.M., Abdoon, A.S., Sabra, H., El Atrash, A. e Pizzi, F., 2013. Conservation of camel genetic resources: epididymal sperm recovery. *In: Camel Conference @ SOAS, Londres, Reino Unido. (Poster)*
- 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 (1), 63-66.
- Valentim, R., Cortez, F., Azevedo, J., Pereira, F., Mendonça, A., Quintas, H., Maurício, R., Simões, J., Barbosa, L. e Correia, T., 2012. Advance of the breeding season and artificial insemination with frozen semen in Portuguese Serrana Goats. *In: XXVII Congresso Mundial de Buiatria, Lisboa, Portugal, p. 196.*
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., y Correia, T., 2009. Anticipación 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., Maurício, R., Correia, T., 2014. Caracterização reprodutiva das cabras Serranas, ecótipo Transmontano. *In: Acta da III Reunião Nacional de Caprinicultores CAPRA 2014, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 64-69.*
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., 2016a. 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., 2016b. 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., 2016c. 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., 2016d. 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. Aplicação de dois tratamentos – luz e melatonina. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 225 pp.. (*PhD Thesis*)
- Ventura, J.G., 2017. Los lentivirus no afectan a todas las ovejas y cabras de un rebaño por igual. *Albeitar Portal Veterinário*, 15, 2 p.. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/15498/Actualidad/lentivirus-afectan-todas-ovejas-cabras-rebano-igual.html>
- Villaquiran, M., Gipson, T.A. Merkel, R.C., Goetsch, A.L. e Sahlu, T., 2004. Body condition scores in goats. American Institute for Goat Research, Langston University, Langston, EUA, 8 pp..
- Viñoles, C., Paganoni, B., Milton, J.T.B., Driancourt, M.A. e Martin, G.B., 2011. Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronisation with prostaglandin, sponges, or sponges with bactericide. *Anim Product Sci*, 51, 565-569.