



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior Agrária

SINCRONIZAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVELHAS DA RAÇA CHURRA GALEGA BRAGANÇANA.

Efeitos da administração de melatonina exógena, de um tratamento progestagénico curto + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação do sémen.

Anderclei Conradi

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

Orientado por:

Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

Bragança

2018

**SINCRONIZAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA E
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVELHAS DA RAÇA
CHURRA GALEGA BRAGANÇANA.**

Efeitos da administração de melatonina exógena, de um tratamento progestagénico curto + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação do sémen.

Anderclei Conradi

Bragança

2018

Editado por:

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA – ESCOLA SUPERIOR
AGRÁRIA DE BRAGANÇA

Campos de Santa Apolónia Apartado – 1172

5301-855 BRAGANÇA Portugal

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

sacd@ipb.pt ou grei@ipb.pt

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

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

Este documento foi produzido a partir de versão electrónica cedida pelo respectivo Autor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele esta jornada não seria possível.

Ao meu Orientador Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim que sempre acreditou em meu potencial, apoiou, incentivou e proporcionou grandes oportunidades.

Aos membros da Equipe de Inseminação do IPB, Lucas Francisco, Óscar, Raquel, Zé e Ramiro, Raimundo e Dona Céu, pela grande ajuda no desenvolvimento do experimento, e grandes orientações.

Aos funcionários do setor de ovinocultura do IPB, que me ajudou no manejo e organização das coletas das amostras do presente trabalho.

Ao IPB por me disponibilizar todo os materiais necessários para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos Lucas, Palloma, Matheus, Yasmim, Maecela, Dona Céu, António, Rui, Lurdes, Vanessa, Marina, Edilaine, pela colaboração, apoio, conversas e amizade. Pois sem eles tudo se tornaria mais difícil.

Em especial agradeço a Renata Fagundes, por se mostrar presente em todos os momentos que precisei, me passando incentivo, inspiração, paciência e amor, tornado tudo mais facil.

A minha família, que sempre me encorajou, aconselhou, apoiou em todas as horas, sempre com uma palavra de incentivo e esclarecimento.

Ao Sr. Rui e sua esposa Lurdes, por te me acolhido e proporcionar grande amizade, carinho, e me ajudar com diversas formas e apoio.

Agradeço aos professores que se dedicaram a nos mostrar o caminho da sabedoria. Principalmente ao Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim e ao Doutor Raimundo Maurício por me fornecerem grande ajuda neste trabalho, orientando e esclarecendo dúvidas e mostrando o melhor caminho e solução para cada obstáculo encontrado.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE QUADROS	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	1
I. – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. RAÇA CHURRA GALEGA BRAGANÇANA	3
1.1. História.....	3
1.2. Descrição da Raça.....	4
1.2.1. Padrão da Raça.....	4
2.2.2. Características Reprodutivas.....	6
2. FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA OVELHA.....	6
2.1. Ciclo Éstrico	6
2.2. Endocrinologia Reprodutiva da Fêmea	8
3. SAZONALIDADE REPRODUTIVA.....	10
4. CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA.....	12
4.1. Melatonina.....	14
4.2. Progestagénios	15
4.3. Gonadotropina Coriónica equina.....	18
5. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	20
5.1. Cérvix.....	23
5.1.1. Os Cervical Externo.....	24
5.2. Métodos de Recolha e de Preservação de Sémén	25
5.2.1. Vagina Artificial	26
5.2.2. Electroejaculação	27
5.3. Métodos de Preservação do Sémén.....	28
5.3.1 Sémén Fresco	28
5.3.2. Sémén Refrigerado.....	29
5.4. Técnicas de Inseminação Artificial	30
5.4.1. Inseminação Vaginal	30
5.4.2. Inseminação Cervical	31

II. TRABALHO EXPERIMENTAL.....	33
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
1.1. Animais	33
1.2. Avaliação da Actividade Ovária.....	34
1.2.1 Avaliação da Ciclicidade Pré-Tratamento Progestagénico	34
1.2.2. Avaliação da Resposta Ovária ao Tratamento Progestagénico curto + eCG	35
1.3. Tratamentos Aplicados	35
1.4. Recolha de Sêmen.....	36
1.5. Análises Seminais	37
1.6. Doses Seminais (Frescas e Refrigeradas).....	38
1.7. Inseminação Artificial a Tempo Fixo	39
1.7.1. Posição das Fêmeas Durante a Inseminação	39
1.8. Diagnóstico de Gestação	40
1.9. Análise Estatística	40
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.1. Peso e Condição Corporal	41
2.2. Estado Fisiológico Pré-Tratamento Progestagénico	42
2.3. Resposta Ovária ao Tratamento Progestagénico Curto + eCG	42
2.4. Resposta à Inseminação Artificial	44
2.4.1. Idade, Peso e Condição Corporal.....	44
2.4.2. Melatonina Exógena	44
2.4.3. Carneiro.....	45
2.4.4. Método de Preservação do Sêmen	46
2.4.5. Diluidor Seminal.....	47
2.4.6. Os Externo.....	49
2.4.7. Cor da Mucosa e Lubrificação Vaginal	50
2.4.8. Viscosidade das Secreções Cervicais	51
2.4.9. Local de Deposição de Sêmen	52
2.4.10. Refluxo Vaginal.....	53
2.4.11. Inseminador	54
3. CONCLUSÕES	55
III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Exemplares da raça Churra Galega Bragançana Branca	5
Figura 2: Variação dos níveis circulantes de LH e de esteróides sexuais durante o ciclo éstrico	7
Figura 3: Modelo do crescimento folicular	9
Figura 4: Efeitos do tratamento progestagénico sobre o CL e o crescimento de folículos	17
Figura 5: Classificação quanto à direcção e à máxima profundidade de penetração em IA em ovelhas	24
Figura 6: Classificação da aparência da entrada na cervical externo da ovelha	25
Figura 7: Vagina artificial para pequenos ruminantes e cone flexível.....	27
Figura 8: Local de deposição do sémen e respectivas denominações das técnicas de inseminação.	30
Figura 9: Ovelhas da raça Churra Galega Bragançana Branca utilizada no ensaio.....	33
Figura 10: Colheita de amostra de sangue por punção da veia jugular.	34
Figura 11: Pistola para colocação de implante subcutâneo de melatonina.	36
Figura 12: Remoção das esponjas e aplicação de uma injeção i.m. de 500 UI de eCG.....	36
Figura 13: Preparação da ovelha para a recolha de sémen com o auxílio da vaginas artificiais.	37
Figura 14: Imobilização e posição de contenção das ovelhas durante a IA. ...	40
Figura 15: Taxa de fertilidade média das ovelhas dos grupos controlo e melatonina.....	45
Figura 16: Diferenças da taxa de fertilidade entre carneiros.	46
Figura 17: Taxas de fertilidade obtidas pós-imseminação com sémen diluído fresco ou sémen diluído refrigerado.	47
Figura 18: Taxas de fertilidade tendo em conta o diluidor de sémen utilizado.	48

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I: Taxas reprodutivas e produtiva das ovelhas Churras Bragançanas..	6
Quadro II: Características da dose seminal a ser utilizado (ml) em função do local de deposição do sémen e do método de preservação do sémen.....	28
Quadro III: Divisão das ovelhas de acordo com os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva aplicados	35
Quadro IV: Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com INRA 96 [®] ou com OviXcell [®]	38
Quadro V: Idade, peso corporal e condição corporal (CC).....	41
Quadro VI: Tipos de Os externo (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade.....	50
Quadro VII: Nível de lubrificação vaginal (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade	50
Quadro VIII: Nível de lubrificação vaginal (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade	51
Quadro IX: Local da deposição do sémen (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade.....	52
Quadro X: Refluxo cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CASA – Computer Assisted Semen Analysis
CC – Condição corporal
CL – Corpo lúteo
E₂ – Estrogénios
eCG – Gonadotrofina Coriónica equina
ESA – Escola Superios Agrária
FGA – Acetato de fluorogestona
FSH – Hormona Folículo-Estimulante
g – Gramas
GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas
hCG – Gonadotrofina Coriónica humana
IA – Inseminação artificial
IATF – Inseminação Artificial a Tempo Fixo
IPB – Instituto Palitécnico de Bragança
LED – *Light Emitting Diode*
LH – Hormona Luteinizante
MAP – Acetato de Medroxiprogesterona
Mg – Miligramas
ng/ml – Nanogramas/mililitros
P₄ – Progesterona
PENPP₄ – Primeira Elevação dos Níveis Plasmáticos de Progesterona
PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}
r.p.m. – Rotações por minuto
RIA – Radioimunoensaio
SPZ – Espermatozóides
TRIS – Hidroximetil Aminometano
UI – Unidades Internacionais
VA – Vagina Artificial
µg – Microgramas

RESUMO

No Instituto Politécnico de Bragança a raça local Churra Galega Bragançana Branca tem sido sujeita, nos últimos 3 anos, a um programa sistemático de aplicação da técnica de inseminação artificial (IA) com sémen fresco ou refrigerado. O presente trabalho foi desenvolvido para testar a eficácia dos seguintes factores – administração prévia de melatonina exógena, tratamento progestagénico curto (FGA) + eCG, dois diluidores seminais (INRA 96[®] vs. OviXcell[®]) e dois processos de preservação do sémen (Fresco vs. Refrigerado) – e os seus efeitos sobre a taxa de fertilidade aos 41 dias pós-IA. Foram ainda avaliados alguns parâmetros registados quando da IA – cor e lubrificação da mucosa vaginal, tipo de Os externo, viscosidade do muco cervical, local de deposição do sémen, refluxo cervical e inseminador “A” X “B”.

Na primeira quinzena de Abril, todas as ovelhas Churras Bragançanas Brancas estavam cíclicas. Todas elas responderam ao tratamento FGA + eCG, independentemente de terem sido tratadas ou não com melatonina exógena. Quarenta e um dias após a inseminação artificial 84,1% das ovelhas estavam gestantes.

A taxa de fertilidade foi afectada pelo carneiro dador de sémen, pelo tipo de Os externo, pela viscosidade das secreções cervicais e pelo local de deposição do sémen.

A taxa de fertilidade não foi influenciada pela administração prévia de melatonina, pelo método de preservação do sémen, pelo tipo de diluidor, pela cor e pelo grau de lubrificação da mucosa vaginal, pelo refluxo cervical ou pelo inseminador.

Palavras-Chave: Ovinos, Churra Galega Bragançana Branca, sincronização de cios, inseminação artificial.

ABSTRACT

Churra Galega Bragançana Branca ewes have been used in a program of artificial insemination (AI) with fresh or cooled semen developed at the Braganza Polytechnic Institute for the last 3 years. Present study aimed to test the efficiency of different factors – exogenous melatonin pre-treatment, short-term progestogen treatment (FGA) + eCG, two seminal extenders (INRA 96[®] vs. OviXcell[®]) and two semen preservation procedures (Fresh vs. Refrigerated) – on ovary activity and fertility rate at forty one days post-AI. During AI several issues were assessed: vagina mucosa colour and lubrication rate, external Os type, cervical mucus viscosity, semen allocation place, cervical reflux incidence and two inseminators' skills "A" X "B".

All ewes were cycling at the first half of April. The efficiency rate of short-term progestogen treatment + eCG was 100%. Melatonin previous administration had no effect in the ratio of ovulated ewes. About 84.1% of ewes were pregnant at 41 days after AI.

Fertility rate was influenced by male semen donor, external Os type, cervical mucus viscosity and semen allocation place.

In opposition fertility rate was not affect by exogenous melatonin pre-treatment, semen preservation procedure, semen extender, vagina mucosa color and lubrication, cervical reflux prevalence or inseminator.

Keywords: Sheep, Churra Galega Bragançana Branca, ovarian activity synchronization, artificial insemination.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura teve sempre um importante papel na vida das populações, não só Europeias mas de todo o mundo (Monteiro *et al.*, 2005). A raça Churra Galega Bragançana é fundamental para a vida da população da Terra Fria Transmontana fornecendo-lhe diversos benefícios como: alimentação (Carne leite, Queijo), vestuário (lã) e fertilização dos solos agrícolas (Monteiro *et al.*, 2005). Todavia, esta raça já esteve muito próximo da extinção. Nos anos 50 do século passado a raça tinha um efectivo de cerca de 100.000 cabeças (Pereira e Rodrigues, 1952). Nos anos 60 do mesmo século, verificou-se uma grande quebra no seu efectivo (\approx 40.000 cabeças) (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). Esta redução resultou da mecanização agricultura que determinou que áreas de pastoreio passassem a ser utilizadas na produção cerealífera e florestal (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). Por outro lado, a forte migração da população local para os grandes centros urbanos e para outros Países europeus, que resultou na diminuição da disponibilidade de mão-de-obra, determinou a redução do efectivo de ovinos Churros Bragançanos. Nos anos 90 do século passado, o efectivo destes animais era de 5.000 cabeças (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). A diminuição da disponibilidade de mão-de-obra determinou ainda a alteração parcial dos sistemas de exploração de extensivo para intensivo (Monteiro *et al.*, 2005).

Os ovinos são animais poliéstricos sazonais (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Simonetti, 2008, Fonseca *et al.*, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). São denominados de reprodutores de “dias curtos” ou de “dias decrescentes”, Vez que reproduzem-se preferencialmente nos meses em que o fotoperíodo é “curto” (Outono/Inverno) ou “decrésciente” (Verão/Outono) (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Valentim, 2004, Fonseca, 2005, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Safari *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2015a). Para melhorar a produtividade das explorações ovinas é necessário controlar a actividade reprodutiva das ovelhas, de modo a melhorar as taxas reprodutivas (na estação de anestro), reduzir os períodos improdutivos e adaptar os períodos de produção às variações sazonais do mercado de ovino (Castilho *et al.*, 2013, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a e Dendena, 2017).

A melatonina permite ultrapassar os constrangimentos do anestro sazonal. Esta hormona é o mediador químico do fotoperíodo e condiciona positivamente a secreção de GnRH e das gonadotropinas hipofisárias (Chemineau *et al.*, 1992 e Venâncio, 2012). Porém, a aplicação de implantes subcutâneos de melatonina não permite uma sincronização estreita da actividade reprodutiva.

O controlo preciso da actividade reprodutiva implica o uso de tratamentos progestagénicos, de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ou combinados e a administração de gonadotropinas. Presentemente existem vários protocolos de controlo da actividade reprodutiva (Valentim *et al.*, 2006b, González-Bulnes *et al.*, 2010, David, 2012, Castilho *et al.*, 2013, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a e Dendena, 2017).

A inseminação artificial é uma técnica que permite melhorar rapidamente o valor genético de um efectivo, resolver problemas sanitários, melhorar o maneio geral, reduzir os custos de produção, entre outras vantagens. Esta pode ser feita com sémen, puro ou diluído, fresco, refrigerado ou congelado. Quando os machos estão localizados nas proximidades das explorações com ovelhas a inseminar, os melhores métodos de preservação do sémen são o fresco e o refrigerado.

O presente trabalho foi desenvolvido para testar a eficácia dos seguintes factores – administração prévia de melatonina exógena, tratamento progestagénico curto (FGA) + eCG, dois diluidores seminais (INRA 96[®] vs. OviXcell[®]) e dois processos de preservação do sémen (Fresco vs. Refrigerado) – e os seus efeitos sobre a taxa de fertilidade aos 41 dias pós-IA.

I. – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. RAÇA CHURRA GALEGA BRAGANÇANA

1.1. História

A raça ovina Churra Galega Bragançana desempenhou sempre um papel importante na vida da população da Terra Fria Transmontana, fornecendo-lhe diversos benefícios como alimentação (carne), vestuário (lã) e fertilização dos solos agrícolas (Monteiro *et al.*, 2005). Estes factores de ordem histórica e económica contribuíram para que as ovelhas Churra Galega Bragançana se mantivessem sem grandes alterações genéticas (sem trocas de genes com outras raças ovinas), anátomo-fisiológicas (animais com características genéticas bem diferenciadas) e produtivas nesta região (Monteiro *et al.*, 2005). Estes animais têm relações filogénicas com *Ovis aries studery* (Teixeira, 2011).

Nos anos 50 do século passado, o efectivo de ovinos Churros Bragançanos era constituído por cerca de 100.000 cabeças (Pereira e Rodrigues, 1952). Estes animais caracterizavam-se pela sua grande estatura e acentuada desproporção entre a altura do tórax e deste ao solo (Pereira e Rodrigues, 1952). Na década de 60, com a mecanização da agricultura, verificou-se um aumento das áreas destinadas à produção cerealífera e florestal e, conseqüentemente, uma diminuição da área de pastoreio. Este fenómeno ditou a redução do efectivo para cerca de 40.000 cabeças (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). No mesmo período, com o objectivo de aumentar a produtividade das ovelhas Churras Bragançanas, alguns produtores foram aconselhados a cruzá-las com carneiros da raça Frísia (aumento da taxa de prolificidade e da produção de leite) ou da raça Romney Marsh (aumento da produção de carne). Outros foram incentivados a melhorar a produção quantitativa e qualitativa de lã, cruzando-as com da raça Bordaleira Campaniça (Teixeira, 2011). Estes programas foram entretanto abandonados.

Entre 1967 e 1990, o efectivo de ovinos Churros Bragançanos caiu de 40.000 animais para 5.000 animais. Nessa altura, a raça foi classificada como “ameaçada de extinção” (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). Esta queda esteve associada à forte migração da população local para os grandes centros urbanos e para a Europa, em busca melhores condições económicas, sociais e

culturais (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). A mão-de-obra disponível para o pastoreio reduziu-se dramaticamente (Monteiro *et al.*, 2005 e Teixeira, 2011). Com o objectivo de evitar a extinção da raça, foram criados em Travanca, Macedo de Cavaleiros, centros de recuperação da raça. Complementarmente foram construídas novas barragens que possibilitaram a criação de novas áreas de regadio e aumentar, gradualmente, a produção de forragens (Monteiro *et al.*, 2005). O regime de exploração passou de extensivo para intensivo (Monteiro *et al.*, 2005). Desta forma resolveu-se o problema da falta de mão-de-obra (Monteiro *et al.*, 2005). Adicionalmente procurou-se melhorar as condições de trabalho dos tratadores de animais.

A Associação de Criadores da Raça Ovina Galega Bragançana (ACOB) foi criada em 1991 (Teixeira, 2011 e ACOB, 2017). Os técnicos desta Associação são desde então responsáveis pelo registo dos animais e pela implementação de um plano nacional de preservação e de melhoramento da raça, que permitiu aumentar o seu efectivo. Actualmente estão registadas mais de 12.000 ovelhas, distribuídas em 100 criadores (Teixeira, 2011 e ACOB, 2017).

Presentemente, os ovinos da raça Churra Galega Bragançana encontram-se distribuídos por toda a região da Terra Fria Transmontana, nomeadamente pelos concelhos de Bragança e Vinhais, parte do concelho de Macedo de Cavaleiros e algumas freguesias dos concelhos de Vimioso, Valpaços, Mirandela e Chaves (Teixeira, 2011 e ACOB, 2017). A raça está presentemente classificada como “ameaçada” (ACOB, 2017).

1.2. Descrição da Raça

1.2.1. Padrão da Raça

Os ovinos da raça Churra Galega Bragançana são de estatura média ou grande. As ovelhas pesando entre 35 e 50 kg e os carneiros entre 50 e 60 kg. A altura dos membros e do tórax confere-lhe um aspecto pernalteiro característico.

Das características gerais referidas por Monteiro *et al.* (2005) e Teixeira (2011) há que destacar as seguintes:

Cabeça: Tamanho médio, deslanada e com um perfil subconvexo. As ovelhas não possuem cornos, os quais são frequentemente nos carneiros. As orelhas são medianas e de alta inserção. As arcadas orbitais são salientes e possuem olhos grandes.

Pescoço: Comprido e delgado, com má ligação ao tronco. Sem barbela e deslanado no terço anterior.

Tronco: Peito estreito, garrote e espáduas pouco destacadas. Linha dorso lombar horizontal. Garupa um tanto descaída e pouco volumosa. Cauda comprida.

Úbere: Globoso, com tetos bem implantados.

Membros: Altos, finos, pigmentados e deslanados nas extremidades livres. Unhas rijas e frequentemente pigmentadas.

Lã: Velo pouco extenso, não recobrimdo a cabeça, o terço anterior do pescoço, o ventre e os cabos. Composto por madeixas pontiagudas.

Cor: Os animais de cor branca apresentam malhas pretas ou acastanhadas em volta dos olhos, focinho e orelhas, podendo estas estar também presentes nos membros. Pele de cor branca ou amarelada, apresentando-se fina e oleosa.

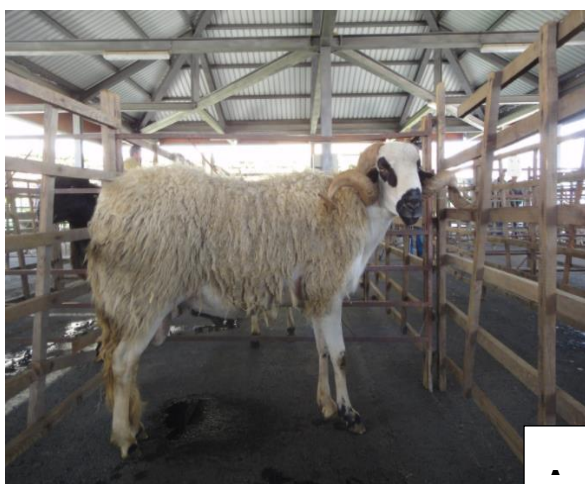


Figura 1: Exemplos da raça Churra Galega Bragançana Branca (ACOB, 2018). *Legenda: (A) Carneiro, (B) Ovelhas*

2.2.2. Características Reprodutivas

As ovelhas da raça Churra Galega Bragançana são poliéstricas sazonais, ainda que a sazonalidade seja pouco marcada (Correia, 1996). A estação reprodutiva estende-se de Março a Junho (Correia, 1996). Ainda assim, mantendo uma boa alimentação e ambientação consegue obter-se boas taxas reprodutivas nos meses de Julho a Outubro (Correia, 1996).

Quadro I: Taxas reprodutivas e produtiva das ovelhas Churras Bragançanas (Garcia, 2002)

Taxa	Percentagem
Fertilidade	85-95%
Prolificidade	100-130%
Fecundidade	95-130%
Produtividade Numérica	85-110%

De um modo geral, estas ovelhas exibem boas taxas reprodutivas e produtivas (Quadro I). O peso médio dos borregos ao nascimento é de 3,5 kg (Garcia, 2002).

2. FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA OVELHA

2.1. Ciclo Éstrico

O ciclo éstrico é o intervalo de tempo que medeia entre dois cios consecutivos (Hafez, 1987 e Bettencourt, 1999). Nas fêmeas, o estabelecimento da puberdade está associado ao início da actividade ovárica cíclica, que é determinada pelo aumento da secreção de hormonas hipofisárias (Mateus *et al.*, 2016). A ciclicidade ovárica é interrompida apenas pela gestação ou por alterações ambientais (anestro sazonal) ou patológicas (Baril *et al.*, 1993, Bettencourt, 1999, Morello e Chemineau, 2004 e Dendena, 2017).

Na espécie ovina a duração do ciclo éstrico é de 16-17 dias (Hafez, 1987 e Bettencourt, 1999) ou de 17-21 dias (Granados *et al.*, 2006). A duração média do cio é de aproximadamente 30 horas (Pérez-Clariget e Porrás, 2008), ocorrendo a ovulação cerca de 12-16 horas antes do término do cio, ou seja, 24-30 horas após o começo do cio (Hafez, 1987 e Bettencourt, 1999). Hafez

(1987) e Bettencourt (1999) afirmam que a duração do cio varia entre 12-50 horas.

O ciclo éstrico pode ser dividido em duas grandes fases: folicular – 2-3 dias (Karsch, 1984 e Bettencourt, 1999) ou 3-4 dias (McDonald, 1991, Fernández Abella, 1999 e Forcada, 2010) – e lútea – 13-14 dias (Legan e Karsch, 1979, Karsch, 1984 e Bettencourt, 1999). A duração do cio varia com a raça, a idade, a localização geográfica, a estação do ano, a ocorrência ou não de contacto com os machos, entre outros factores (Bettencourt, 1999). Nos ovinos, o único indicador seguro de cio é o reflexo de imobilidade, ou seja, a ovelha permanece imóvel quando na presença do carneiro e é montada por este. Na detecção de cios podem ser usados carneiros inteiros equipados com um avental ou vasectomizados munidos preferencialmente de arnês marcador (Bettencourt, 1999). A fase folicular caracteriza-se pelo desenvolvimento do folículo, estrutura ovárica que contém o oócito e que produz grandes quantidades de estradiol (E_2) (Figura 1) (Morello e Chemineau, 2004). Esta fase pode ser subdividida em: proestro e estro (Granados *et al.*, 2006). Ela termina com a ovulação (Morello e Chemineau, 2004, Granados *et al.*, 2006 e Bartlewski *et al.*, 2011).

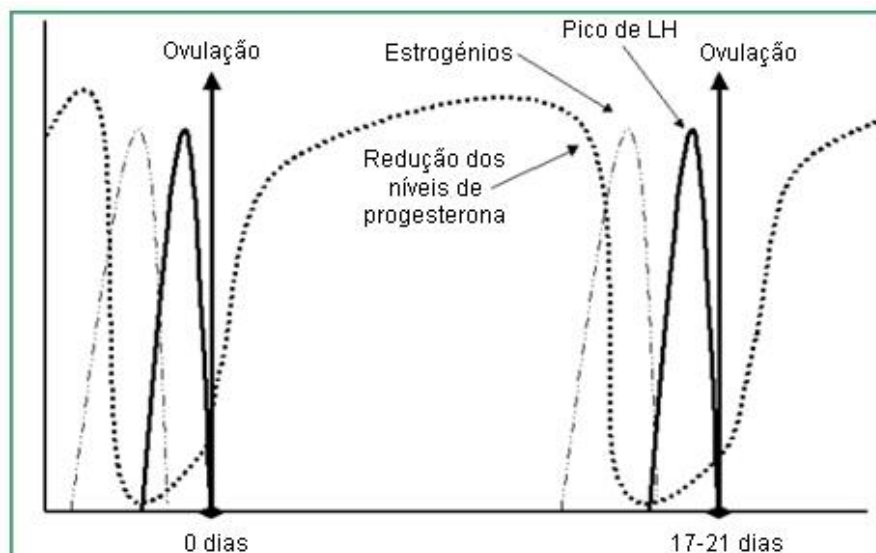


Figura 2: Variação dos níveis circulantes de LH e de esteróides sexuais durante o ciclo éstrico (Granados *et al.*, 2006).

A fase lútea pode ser subdividida em: metaestro e diestro (Sebastian Lopez, 1989, Baril *et al.*, 1993, Hafez e Hafez, 2004 e Morello e Chemineau,

2004). O metaestro inicia-se após a ovulação e tem uma duração de 2-3 dias (Sebastian Lopez, 1989 e Hafez e Hafez, 2004) e é marcado pela formação do corpo hemorrágico (Morello e Chemineau, 2004). O diestro é a subfase mais longa do ciclo éstrico (11-13 dias) e caracteriza-se pela produção lútea de progesterona (P_4) (Morello e Chemineau, 2004). Esta hormona é responsável pela manutenção da gestação (Sebastian Lopez, 1989 e Hafez e Hafez, 2004). Se a fêmea não ficar gestante, o corpo lúteo (CL) regredirá entre o 11^o-12^o dias (Morello e Chemineau, 2004) ou por volta do 13^o dia pós-cio (Granados *et al.*, 2006), de que resulta uma diminuição abrupta dos níveis circulantes de P_4 e a possibilidade de se iniciar um novo ciclo éstrico (Granados *et al.*, 2006). Nos ruminantes, a hormona responsável pela destruição do CL (luteólise) é a Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) produzida no endométrio uterino (Granados *et al.*, 2006).

2.2. Endocrinologia Reprodutiva da Fêmea

O controlo do ciclo éstrico envolve uma sequência de alterações hormonais reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gónadas que actua com os ovários e o útero (Baril *et al.*, 1993, Bettencourt, 1999, Morello e Chemineau, 2004, Simonetti, 2008, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). O hipotálamo é responsável pela secreção de GnRH (Hormona Libertadora de Gonadotropinas), a hipófise anterior pela secreção de gonadotropinas – FSH (Hormona Folículo-Estimulante) e LH (Hormona Luteinizante) – e as gónadas pela secreção de esteróides sexuais (E_2 e P_4) (Venâncio, 2012). A secreção de GnRH é condicionada por estímulos externos (fotoperíodo, alimentação, condições climatéricas, factores sociais, entre outros) e internos (indivíduo, sexo, idade, condição corporal, estado de saúde, entre outros) (Haresign, 1993 e Dendena, 2017).

O aumento da frequência de secreção de GnRH, via terminações nervosas da Eminência Mediana, promove o incremento da secreção de FSH e, particularmente, de LH (Rubianes, 2000 e Sicherle, 2005). As gonadotrofinas são sintetizadas e armazenadas nas células basófilas da hipófise anterior (Hutchinson, 1979 e Bettencourt, 1999), sendo posteriormente libertadas, por exocitose, em resposta à estimulação exercida pela GnRH (Bettencourt, 1999). A FSH é responsável pelo recrutamento, crescimento e maturação do(s)

folículo(s) pré-ovulatório(s) (Figura 2) (Rubianes, 2000 e Sicherle, 2005). A LH é responsável pela maturação do folículo pré-ovulatório, pela ovulação e pela luteinização das estruturas foliculares remanescentes de que resulta a formação do CL (Rubianes, 2000 e Sicherle, 2005).

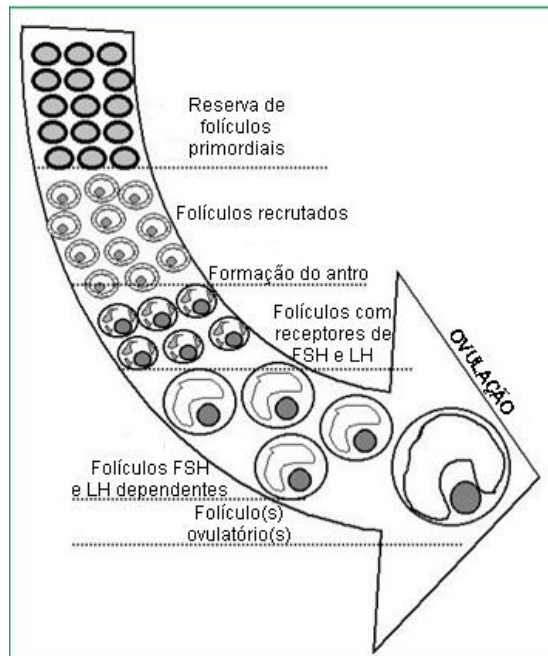


Figura 3: Modelo do crescimento folicular (Granados *et al.*, 2006).

Ao longo do ciclo éstrico, as ovelhas possuem nos ovários entre 200 e 400 folículos em crescimento (Antoniolli, 2002; citado por Oliveira e Oliveira, 2008). Dos 25 a 50 folículos terciários, normalmente, apenas 1 se converterá em folículo dominante, sofrerá maturação e ovulará (Antoniolli, 2002; citado por Oliveira e Oliveira, 2008). Durante o crescimento folicular, a secreção de FSH, não acompanhada da secreção de LH estimula a mitose das células da granulosa o aumento do tamanho do(s) folículo(s) e a secreção folicular de E_2 (Raju *et al.*, 2013). A acção combinada da FSH e dos E_2 é responsável pelo crescimento uniforme do(s) folículo(s) (Raju *et al.*, 2013). À medida que a concentração de FSH se eleva, aumenta também o número de receptores membranares de LH (Levi-Setti *et al.*, 2004 e Dendena, 2017).

No decurso da fase folicular, a secreção de FSH é inibida através dos mecanismos de retroacção negativa exercidos pelos E_2 e pela inibina (glicoproteína segregada a nível folicular) (Forcada, 2010). No final desta fase, o aumento dos níveis de E_2 , associado a níveis basais de P_4 , promovem uma

retroacção positiva sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, de que resulta um pico de FSH e o pico pré-ovulatório de LH (Salamonsen *et al.*, 1973, Downey, 1980 e Bettencourt, 1999). Cerca de 18-24 horas depois, ocorre uma segunda elevação dos níveis circulantes de LH (Salamonsen *et al.*, 1973, Downey, 1980 e Bettencourt, 1999). Os elevados níveis circulantes de LH promovem alterações estruturais no folículo, que resultam na expulsão do oócito II (Perry, 1991) e na luteanização das células da granulosa (Dendena, 2017).

Após a ovulação, a parede do folículo torna-se gradualmente mais espessa, devido à hipertrofia e hiperplasia das células da granulosa (Hafez e Hafez, 2004). As células que proliferam rapidamente preenchem a cavidade do antro e começam a segregar P_4 (Hafez e Hafez, 2004 e Dendena, 2017). A P_4 determina a redução da frequência de libertação de GnRH e consequentemente de LH (Hafez e Hafez, 2004 e Dendena, 2017). Os níveis basais de E_2 inibem a capacidade de resposta da hipófise anterior à acção da GnRH e consequentemente diminuem a síntese de gonadotrofinas (Hafez e Hafez, 2004 e Dendena, 2017). Este mecanismo de retroacção negativo é potencializado pela P_4 (Hafez e Hafez, 2004 e Dendena, 2017).

Se a ovelha não ficar gestante os E_2 produzidos pelos folículos em crescimento estimulam a secreção lútea de oxitocina e potencializa a secreção uterina de $PGF_{2\alpha}$ (Bettencourt, 1999, McCracken *et al.*, 1999, Forcada, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Nos ruminantes, a produção e a secreção de $PGF_{2\alpha}$ são desencadeadas pela oxitocina de origem uterina (Bettencourt, 1999). Na verdade, estabelece-se uma retroacção positiva entre a síntese de oxitocina e a síntese de $PGF_{2\alpha}$, de modo a assegurar a luteólise (Silvia e Raw, 1993 e Dendena, 2017). Terminada a luteólise, produz-se um aumento da secreção de GnRH, o que estimula o crescimento folicular e a secreção de E_2 (Clark *et al.*, 1987 e Padilha, 2007). Recomeça então um novo ciclo ovário (Clark *et al.*, 1987 e Padilha, 2007).

3. SAZONALIDADE REPRODUTIVA

A sazonalidade reprodutiva é uma característica adaptativa que determina que os partos coincidam com a estação do ano em que as condições climatéricas e alimentares são mais favoráveis ao crescimento fetal final e à lactação (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Thiéry *et al.*, 2002, Rosa e

Bryant, 2003, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Valentim *et al.*, 2004, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Safari *et al.*, 2012, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2015a) e conseqüentemente a viabilidade e crescimento pós-natal da cria (Barill *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 2002, Thiéry *et al.*, 2002, Rosa e Bryant, 2003, e Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Valentim *et al.*, 2004, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Safari *et al.*, 2012, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2015a).

Os ovinos são animais poliéstricos sazonais (Baril *et al.*, 1993, Morello e Chemineau, 2004, Pérez-Clariget e Porrás, 2008, Simonetti, 2008, Fonseca *et al.*, 2010 e Bartlewski *et al.*, 2011). Essa sazonalidade reprodutiva caracteriza-se por alterações comportamentais e endócrinas, que dão origem a uma alternância anual entre dois períodos distintos: a estação reprodutiva e a estação de anestro sazonal (Rosa e Bryant, 2003 e Dendena, 2017). São denominados de reprodutores de “dias curtos” ou de “dias decrescentes”, reproduzem-se preferencialmente nos meses em que o fotoperíodo é “curto” (Outono/Inverno) ou “decrecente” (Verão/Outono) (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Freitas e Rubianes, 2004, Garcia *et al.*, 2004, Valentim, 2004, Fonseca, 2005, Scaramuzzi *et al.*, 2006, Safari *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Valentim *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2015a).

Nas regiões temperadas e polares o fotoperíodo é o principal factor regulador da sazonalidade (Hafez, 1987, Chemineau *et al.*, 1992, Baril *et al.*, 1993, Bettencourt, 1999, Pérez-Clariget e Porrás, 2008, Fonseca *et al.*, 2010 e Santolaria *et al.*, 2011). Todas as raças ovinas originárias de latitudes superiores a 30° (Lincoln, 1992) ou 40° (Chemineau *et al.*, 1992) apresentam variações sazonais na sua actividade reprodutiva ditadas pela duração do período diário de luz (Ortavant *et al.*, 1985, Correia, 1996 e Bettencourt, 1999). Contudo, outros factores estão igualmente envolvidos na modelação da actividade reprodutiva sazonal: genética, idade, sexo, estado nutricional, alimentação, estado de saúde, condições climatéricas e relações sociais (Sadler, 1969, Chemineau *et al.*, 1993, Pérez *et al.*, 1998 e Valentim, 2004). Nas regiões temperadas de menor latitude, a sazonalidade tende a ser menos influenciada pelo fotoperíodo e mais pela alimentação (preditiva) e pela termorregulação (Valentim *et al.*, 2016a). Já nas regiões tropicais ou subtropicais, a sazonalidade reprodutiva é pouco marcada e resulta

essencialmente das disponibilidades presentes de alimentos (oportunistas), particularmente dependentes da pluviosidade (Hafez e Hafez, 2004, Valentim *et al.*, 2004 e Dendena, 2017).

As fases de transição entre as estações reprodutiva e de anestro e vice-versa são marcadas por uma actividade ovárica “imperfeita”: ovulações “silenciosas” e subestro (Correia, 1996, Valentim *et al.*, 2006b e Venâncio, 2012). Na estação de anestro, estes fenómenos também ocorrem (Correia, 1996, Bettencourt, 1999, Valentim *et al.*, 2006b e Venâncio, 2012). Ao que tudo indica, as ovulações “silenciosas” resultam da inexistência prévia de elevados níveis circulantes de P_4 , necessários à formação de receptores de E_2 no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (Hall *et al.*, 1986, Valentim *et al.*, 2006b e Venâncio, 2012) e à manifestação de sinais detectáveis de cio (Chemineau *et al.*, 1987, Potes, 1989, Valentim *et al.*, 2006b, Senger, 2011 e Venâncio, 2012). Por seu turno, o subestro parece estar associado a um crescimento folicular demasiado rápido (resultante da ausência prévia de P_4) e à falha do mecanismo de ovulação (Venâncio, 2012).

4. CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA

A expansão da ovinicultura traz consigo novos desafios e a busca de tecnologias que permitam aos criadores obterem melhores resultados reprodutivos e produtivos e conseqüentemente da rentabilidade das explorações (Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a e Dendena, 2017). Neste sentido, o controlo da actividade reprodutiva deve ser usado para promover uma melhor gestão, permitindo um maneio mais eficaz de animais e de factores de produção, redução dos períodos improdutivo – antecipação da puberdade e redução dos períodos de vazio –, do aumento das taxas reprodutivas (fertilidade, prolificidade e fecundidade) e da utilização da inseminação artificial (IA) (maior progresso genético) (Castilho *et al.*, 2013, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a e Dendena, 2017). Deve ainda permitir um melhor ajustamento da produção aos mercados (Venâncio, 2012, Castilho *et al.*, 2013, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a e Dendena, 2017).

Nos animais domesticados, o controlo da actividade reprodutiva pode ser conseguido através da manipulação da fase folicular ou da fase lútea do ciclo

éstrico (Wildeus, 2000). Nas ovelhas, ele é exercido essencialmente sobre a fase lútea, por esta ser mais longa e susceptível de manipular eficazmente (Wildeus, 2000 e Venâncio, 2012). Nos pequenos ruminantes, o controlo da actividade reprodutiva engloba a indução ou a sincronização da actividade ovárica (Azevedo *et al.*, 2006, Cortez, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017).

A sincronização consiste na concentração da actividade reprodutiva em um intervalo de tempo restrito (24-72 horas), durante a estação reprodutiva (Steyn, 2003 e Dendena, 2017). Todavia, na estação de anestro sazonal a actividade ovárica tem de ser induzida (Fonseca, 2005, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). Presentemente existem vários métodos de controlo da actividade reprodutiva em pequenos ruminantes: manipulação do fotoperíodo (tratamento luminoso), bioestimulação ou administração de hormonas exógenas (Valentim *et al.*, 2006b, González-Bulnes *et al.*, 2010, David, 2012, Castilho *et al.*, 2013, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a e Dendena, 2017).

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos diversos protocolos de controlo da actividade ovárica baseado na utilização de progestagénios e/ou de PGF_{2α} e de gonadotropinas hipofisárias e/ou coriónicas (Ungerfeld e Rubianes, 2002, Freitas e Rubianes, 2004, Valentim *et al.*, 2006b, González-Bulnes *et al.*, 2010, Abecia *et al.*, 2011, Letelier *et al.*, 2011, Cortez, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015b, Dendena, 2017 e Romano *et al.*, 2017). A resposta dos animais aos diferentes tratamentos adoptáveis varia em função de factores como: a raça, o indivíduo, a idade, a estação do ano, o manejo, o estado nutricional, o estado sanitário, a fase da lactação, o protocolo implementado, as hormonas administradas, as doses empregues, o sistema de beneficiação adoptado (monta natural ou inseminação artificial), entre outros (Azevedo *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b, López-Sebastian *et al.*, 2007, Bartlewski *et al.*, 2008, González-Bulnes *et al.*, 2010 e Bukar *et al.*, 2012, Venâncio, 2012 e Valentim *et al.*, 2015a).

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

4.1. Melatonina

Nos pequenos ruminantes, a melatonina exógena pode ser usada na indução da actividade reprodutiva (Correia, 1996, Valentim *et al.*, 2006a, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015a). Esta hormona actua a vários níveis do eixo endocrino reprodutivo (Valentim 2004, Valentim *et al.*, 2006a, Forcada, 2010, Abecia *et al.*, 2012, Valentim *et al.*, 2015a). Contudo, a sua acção principal exerce-se a nível do sistema nervoso central e relaciona-se com a modificação da frequência de libertação de GnRH/LH (Valentim 2004, Valentim *et al.*, 2006a, Abecia, 2010, Forcada, 2010, Abecia *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). A acção hipotalâmica é mediada por dois mecanismos complementares: modulação directa da secreção de GnRH (esteróide-independente) e alteração da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipofisário face à retroacção negativa exercida pelos esteróides gonadais (esteróide-dependente) (Valentim 2004, Valentim *et al.*, 2006a, Forcada, 2010, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a).

A forma mais comum de administrar melatonina é através de implantes subcutâneos (2 x 4 mm), contendo 18 mg desta hormona (Azevedo *et al.*, 2006, Forcada, 2010, Mateus, 2014 e Afonso, 2015). Estes implantes são colocados na base das orelhas e libertam lentamente para a corrente sanguínea 100-300 pg/ml de melatonina (Valentim, 2004, Forcada, 2010, Abecia *et al.*, 2012, Mateus, 2014 e Valentim *et al.*, 2015a). Esta libertação permanente de melatonina (24 horas) não afecta a libertação endógena de melatonina (Valentim, 2004 e Forcada, 2010). Os implantes mantêm-se funcionais por um período de 60-70 dias (Valentim *et al.*, 2006a, Forcada, 2010, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a), podendo mesmo alcançar os 100 dias (Forcada, 2010).

Vinte e quatro horas após a colocação de implantes subcutâneos de melatonina aumenta a secreção pulsátil de GnRH/LH (Chemineau *et al.*, 1996, Malpoux *et al.*, 1996, Loureiro, 2003, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). Porém a alteração significativa da secreção pulsátil de GnRH/LH só ocorre 40 a 60 dias após a colocação dos referidos implantes de melatonina (Misztal *et al.*, 2002, Rosa e Bryant, 2003, Valentim,

2004, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). A resposta reprodutiva das fêmeas só se torna semelhante à da estação reprodutiva nos três ciclos ovários seguintes (2-4 ciclos pós-tratamento), ou seja, até cerca de 70 dias após a colocação dos implantes subcutâneos de melatonina (Valentim *et al.*, 2006a e Forcada, 2010, Abecia *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). Segundo Forcada (2010) a cobrição das fêmeas antes do 40º dia pós-tratamento prejudica tanto a fertilidade como a fecundidade.

O protocolo de administração de melatonina exógena é simples (Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). Em cada fêmea púbere é colocado um implante subcutâneo de melatonina (Valentim *et al.*, 2006a, Abecia, 2010, Forcada, 2010, Abecia *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). Alcaide *et al.* (2001) entendem que o número de implantes a colocar deve variar em função do peso corporal. Nas ovelhas, por cada 60 kg de peso corporal, deve ser colocado 1 implante subcutâneo de melatonina (Alcaide *et al.*, 2001, Valentim *et al.*, 2006a, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). Nos carneiros, devem ser colocados 3 implantes/macho (Abecia, 2010 e Abecia *et al.*, 2012). Alcaide *et al.* (2001) afirmam que nos machos são necessárias doses mais elevadas – 2-3 implantes/animal (em função do peso corporal). Valentim (2004), após ter colocado 3 implantes/macho, em carneiros da raça Churra Galega Bragançana (peso corporal: 61-80 kg), encontrou indícios de sobredosagem que, no entanto, não pôde comprovar inequivocamente.

No Sul da Europa, a reduzida sazonalidade dos pequenos ruminantes autóctones torna menos evidentes os benefícios da melatonina exógena (Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a). Nos sistemas de produção característicos do Norte de Portugal, os custos inerentes à colocação de implantes de melatonina podem mesmo ser superiores às mais-valias (Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015a).

4.2. Progestagénios

Os progestagénios são análogos sintéticos da P₄, com efeito biológico superior ao da molécula natural e por esta razão, são administrados em doses

mais reduzidas, com implante de esponjas vaginais (Romano, 1996, Hafez e Hafez, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Dixon *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b, Driancourt, 2012, Venâncio, 2012, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015b e Dendena, 2017). Estas hormonas actuam inibindo a secreção de GnRH e das gonadotropinas e, conseqüentemente, o normal crescimento folicular e a ovulação, ou seja, mimetizam os efeitos naturais da P₄ que impedem a ovulação e prolongam a fase lútea (Romano, 1996, Leyva *et al.*, 1998, Hafez e Hafez, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Fernandes, 2008, Padilha, 2007, Abecia *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015). Os progestagénios têm uma semivida reduzida (Driancourt, 2012), pois estes são rapidamente metabolizados (Azevedo *et al.*, 2006) e eliminados pelas fezes e pela urina (Romano, 1996, Venâncio, 2012 e Dendena, 2017).

Terminado o tratamento progestagénico, desencadeia-se rapidamente um retorno à actividade ovárica cíclica (Azevedo *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b, Iwamura, 2008, Abecia *et al.*, 2012, Driancourt, 2012, Mateus, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). Cerca de 24-48 horas após a remoção das esponjas vaginais, as ovelhas apresentam cio (Valentim *et al.*, 2006b, Venâncio, 2012, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). A ovulação surge, normalmente, 48-72 horas pós-tratamento (Valentim *et al.*, 2006b, Venâncio, 2012, Afonso, 2015 e Dendena, 2017).

Nos pequenos ruminantes, os progestagénios mais utilizados são o acetato de fluorogestona (FGA; 20 mg) e o acetato de medroxiprogesterona (MAP; 60 mg), independentemente das ovelhas se encontrarem na estação reprodutiva ou de anestro (Valentim *et al.*, 2006b, Abecia *et al.*, 2011, Cortez, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015b, Dendena, 2017 e Leão, 2017).

Os tratamentos progestagénios são normalmente aplicados através de esponjas vaginais (Romano, 1996, Azevedo *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b, Padilha, 2007, Fernandes, 2008, Abecia *et al.*, 2012, Driancourt, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). Inicialmente, a duração destes tratamentos era equivalente à da fase lútea natural – 10-16 dias (Valentim *et al.*, 2006b, Venâncio, 2012, Afonso, 2015 e Dendena, 2017) ou 12- 15 dias (Baril *et al.*, 1993, Azevedo *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Martemucci e D'Alessandro, 2010, Letelier *et al.*, 2011, Afonso, 2015 e Valentim *et al.*, 2015b)

considerados tratamentos longos (Baril *et al.*, 1993, Azevedo *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b, Letelier *et al.*, 2011, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015b e Dendena, 2017). Presentemente, os tratamentos progestagénicos curtos (5-7 dias) são muito comuns em tratamentos de indução e de sincronização da actividade ovárica (Figura 3) (Valentim *et al.*, 2006b, Simões, 2010, Abecia *et al.*, 2012, Venâncio, 2012, Castilho *et al.*, 2013, Mateus, 2014, Afonso, 2015, Valentim *et al.*, 2015b e Dendena, 2017). Este intervalo de tempo é inferior à duração normal da fase lútea, é necessário proceder à administração de $PGF_{2\alpha}$ ou seus análogos sintéticos para induzir a luteólise no início do tratamento progestagénico (Letelier *et al.*, 2009, Correia *et al.*, 2010a, Abecia *et al.*, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017).

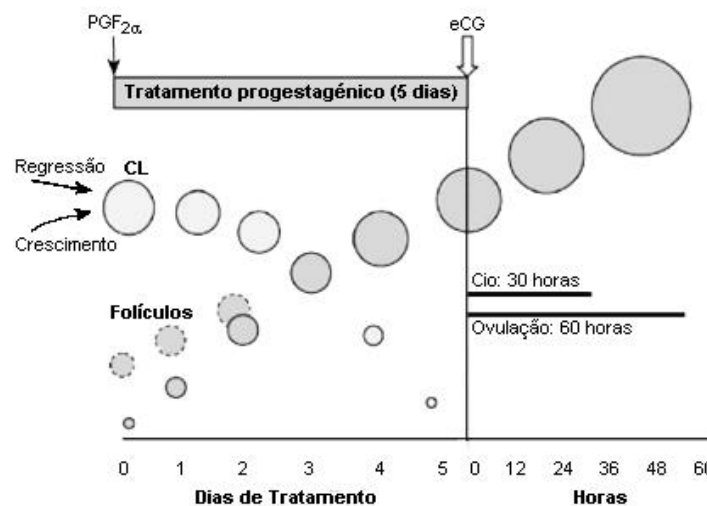


Figura 4: Efeitos do tratamento progestagénico sobre o CL e o crescimento de folículos (Simões, 2010). *Legenda:* $PGF_{2\alpha}$ (Prostaglandina $F_{2\alpha}$), eCG (Gonadotropina Coriónica equina), CL (corpo lúteo)

Na estação reprodutiva, a administração prolongada de progestagénios (tratamentos longos) pode afectar negativamente o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, condicionando a secreção de GnRH/LH e os mecanismos foliculares e ovulatórios, reduzir as manifestações detectáveis de cio, prejudicar a formação de depósitos de espermatozoides no canal cervical e o transporte destes ao longo do tracto genital feminino e conduzindo a uma diminuição da taxa de fertilidade (Leyva *et al.*, 1998, Greyling e van der Nest, 2000, Azevedo *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b, Padilha, 2007, Martemucci e

D'Alessandro, 2010, Martemucci e D'Alessandro, 2011 e Viñoles *et al.*, 2011, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017).

Na estação de anestro, os tratamentos com progestagénios exógenos pré-sensibilizam o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas e melhoram a actividade ovárica (Azevedo *et al.*, 2006, Driancourt, 2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015), as manifestações de cio e o transporte de espermatozóides no trato genital feminino (Azevedo *et al.*, 2006, Mateus, 2014 e Afonso, 2015) e a função lútea (Leyva *et al.*, 1998, Mateus, 2014 e Afonso, 2015). No mesmo sentido, nos períodos de transição entre as estações de anestro e reprodutiva, o uso de P₄ ou seus análogos sintéticos é bastante eficaz (Zelege *et al.*, 2005, Fernandes, 2008, Venâncio, 2012, Cortez, 2012 e Afonso, 2015).

Os efeitos da duração do tratamento progestagénico (longo ou curto) sobre a indução da actividade reprodutiva continuam por estabelecer. Segundo Ungerfeld e Rubianes (1999), Ungerfeld e Rubianes (2002) e Letelier *et al.* (2009), eles são idênticos. Porém, Correia *et al.* (2010b) verificaram que a indução da actividade ovárica (promovida pelo “efeito macho”) foi superior em ovelhas pré-sensibilizadas com um tratamento progestagénico longo (14 dias) do que com um tratamento progestagénico curto (7 dias).

4.3. Gonadotropina Coriónica equina

A Gonadotropina Coriónica equina (eCG) também denominada de Gonadotropina Sérica da Égua Gestante (PMSG) foi uma das primeiras gonadotrofinas a ser comercializada e a ser utilizada na promoção da ovulação ou de superovulações em animais domesticados (Hafez e Hafez, 2004, Adams e Boime, 2008, Iwamura, 2008, Shabankareh *et al.*, 2012, Venâncio, 2012 e Mateus, 2014). Ela foi desenvolvida através de experiências com ratos imaturos aplicando a injeção de soro de éguas prenhas, induzindo a maturidade sexual (Hafez *et al.*, 1987, Venâncio, 2012 e Mateus, 2014).

A eCG possui uma acção simultaneamente FSH (80%) e LH (20%) (Barret *et al.*, 2004, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). Possui uma semivida longa, de até 3 dias, devido à sua elevada concentração em ácido siálico e pode ser administrada numa única injeção (Hafez *et al.*, 1987, Murphy e Martinuk, 1991, Valentim *et al.*, 2006b, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Valentim *et al.*, 2015b e Dendena, 2017). Ela pode ligar-se

a receptores foliculares de FSH e de LH e a receptores lúteos de LH (Neto, 2009, Venâncio, 2012 e Mateus, 2014) ou seja, condiciona o crescimento e a maturação folicular, a ovulação e mantém o CL (Venâncio, 2012 e Mateus, 2014). De acordo com Driancourt (2012), a acção FSH desta hormona promove o crescimento folicular (entre os 2-6 mm de diâmetro) e induz a expressão da aromatase, necessária à conversão dos androgénios em estrogénios (E_2). A acção LH mantém o crescimento folicular entre os 6-8 mm de diâmetro e maximiza a produção de androgénios por parte dos grandes folículos (que depois são aromatizados em E_2) (Driancourt, 2012, Venâncio, 2012).

Nos protocolos de controlo da actividade ovárica e de inseminação a tempo fixo (IATF), a eCG produz uma boa sincronização da actividade ovárica e eleva as taxas de ovulação e de prolificidade (Evans e Robinson 1980, Dias *et al.*, 2001, Barret *et al.*, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Neto, 2009, Abecia *et al.*, 2012, Bukar *et al.*, 2012, Afonso, 2015 e Dendena, 2017). Porém o uso repetido da eCG pode causar a formação de anticorpos contra a eCG e promover uma redução da fertilidade (efeitos negativos sobre a resposta ovulatória e o aparecimento tardio do cio) (Maurel *et al.*, 2003, Valentim *et al.*, 2006b, Driancourt, 2012, Mateus, 2014 e Dendena, 2017). Outros autores afirmam que se podem aplicar vários tratamentos com eCG sem que ocorra a formação de anticorpos específicos (Maurel *et al.*, 2003, Azevedo *et al.*, 2006, Mateus, 2014 e Dendena, 2017).

A dose de eCG que garante a ovulação varia em função da idade (Abecia *et al.*, 2012, Driancourt, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017), do estado fisiológico das fêmeas (Abecia *et al.*, 2012, Driancourt, 2012, Venâncio, 2012, Mateus, 2014, Afonso, 2015 e Dendena, 2017), da estação do ano (Driancourt, 2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015) e da taxa de prolificidade pretendida (Driancourt, 2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015). Nas ovelhas cíclicas é aconselhável administrar doses que variam entre 300-500 UI (Driancourt, 2012) ou 300-350 UI (Abecia *et al.*, 2012). Nas ovelhas em anestro aconselha-se injectar 400-600 UI (Driancourt, 2012) ou 400-500 UI (Abecia *et al.*, 2012). Nas malatas, a dose pode ser inferior – 250-400 UI se estiverem cíclicas e 300-500 UI se estiverem em anestro (Driancourt, 2012). Normalmente, enquanto doses de 450-600 UI promovem a ovulação, doses próximas de 750 UI induzem superovulações (Valentim *et al.*, 2006b, Venâncio,

2012, Mateus, 2014 e Afonso, 2015). Todavia, doses muito elevadas podem resultar em altas perdas embrionárias ou na formação de quistos ováricos (Azevedo *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2006b e Venâncio, 2012 e Mateus, 2014). Nas raças muito prolíficas, a eCG deve ser usada em doses mais baixas (Driancourt, 2012 e Mateus, 2014).

5. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A IA é uma técnica reprodutiva que implica a deposição de espermatozóides no trato reprodutivo feminino por meios artificiais em vez do serviço natural (Gordon, 1997, Aisen, 2004a, Robertson, 2005, Granados *et al.*, 2006, Barbosa e Machado, 2008, Morrell, 2011, Mateus *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Leão, 2017). Ela pode contribuir para, o melhoramento genético dos efectivos (Granados *et al.*, 2006 e Abecia *et al.*, 2017) e para melhorar a gestão das explorações e dos animais, para aumentar as suas taxas produtivas e reprodutivas e conseqüentemente a sua rentabilidade (Granados *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016b). A IA comporta ainda outras vantagens:

- Aumenta o rigor dos registos reprodutivos (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993 e Aisen, 2004a);
- Controlo de doenças sexualmente transmissíveis (Eaglesome e Garcia, 1997, Morrell, 2011, Lazia, 2012 e Abecia *et al.*, 2017);
- Facilita os testes de descendência (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Leethongdee *et al.*, 2007, Fonseca *et al.*, 2010, Santolaria *et al.*, 2014 e Valentim *et al.*, 2016b) e acelera o melhoramento genético (Leethongdee *et al.*, 2007 e Fonseca *et al.*, 2010);
- Maximiza o uso dos reprodutores de elevado valor genético (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Eaglesome e Garcia, 1997, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006, Fonseca *et al.*, 2010 e Valentim *et al.*, 2016b), o que se traduz em uma maior economia não só financeira como de tempo (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006 e Konyali *et al.*, 2013);

- Possibilita a utilização de sémen recolhido e armazenado na estação de anestro (Salamon e Maxwell, 2000 e Konyali *et al.*, 2013);
- Aumenta rapidamente o rendimento genético e produtivo (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Chemineau *et al.*, 1996, Eaglesome e Garcia, 1997, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004a,b, Anel *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Leethongdee *et al.*, 2007, Holtz *et al.*, 2008, El-Shahat e Alsafy, 2009, Fonseca *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011, Morrell, 2011, Cseh *et al.*, 2012, Konyali *et al.*, 2013, Santolaria *et al.*, 2014, Palacios e Abecia, 2015, Abecia *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Yotov *et al.*, 2016, Abecia *et al.*, 2017, Banday *et al.*, 2017 e Romano *et al.*, 2017);
- Possibilita a utilização de reprodutores temporariamente incapacitados para realizar a monta (Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006 e Morrell, 2011);
- Permite identificar atecipadamente situações de subfertilidade masculina (Gordon, 1997 e Tsakmakidis, 2010);
- Aumenta a “vida útil” dos reprodutores, inclusive, após a sua morte, já que os espermatozóides podem ser criopreservados em azoto líquido por tempo indeterminado (Fonseca *et al.*, 2010 e Valentim *et al.*, 2016b);
- Estende os limites geográficos e temporais da cobertura natural (Baril *et al.*, 1993, Campbell *et al.*, 1996, Chemineau *et al.*, 1996, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Granados *et al.*, 2006, Bucak *et al.*, 2010, Morrell, 2011, Konyali *et al.*, 2013, Sieme *et al.*, 2016 e Valentim *et al.*, 2016b);
- Facilita o trânsito nacional e internacional de material genético (Campbell *et al.*, 1996, Aisen, 2004a,b e Sieme *et al.*, 2016);
- Pode ser usada na preservação de raças raras ou em perigo de extinção (Aisen, 2004a,b, Tsakmakidis, 2010, Monrell, 2011, Abecia *et al.*, 2016, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Arando *et al.*, 2017);

- Reduz os custos relacionados com a posse e manutenção de reprodutores e os riscos que os mesmos representam para os outros animais e para os criadores (Baril *et al.*, 1993, Haresign, 1993, Aisen, 2004a e Banday *et al.*, 2017);
- Possibilita um melhor controlo das actividades reprodutiva e produtiva dos efectivos, o que comporta claras vantagens económicas (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006, Valentim *et al.*, 2016b e Abecia *et al.*, 2017). Possibilita a escolha mais precisa da época de partos (Baril *et al.*, 1993, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen, 2004a, Granados *et al.*, 2006, Fonseca *et al.*, 2010, Valentim *et al.*, 2016b e Abecia *et al.*, 2017). 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, Granados *et al.*, 2006 e Fonseca *et al.*, 2010). Permite a 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, Holtz *et al.*, 2008, Fonseca *et al.*, 2010 e Valentim *et al.*, 2016b). Possibilita a programação mais precisa da utilização da mão-de-obra (Valentim *et al.*, 2016b);
- Melhora as taxas reprodutivas durante a estação de anestro (Venâncio, 2012 e Mateus, 2014).

A IA possui igualmente algumas desvantagens:

- Custos iniciais elevados (Aisen, 2004a e Granados *et al.*, 2006);
- Pessoal qualificado para a sua realização (Haresign, 1993 e Granados *et al.*, 2006);
- Concentração da actividade reprodutiva das ovelhas e dos partos em efectivos de grande dimensão (Azevedo *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2016b);
- Dificuldades na deposição do sémen no útero (Baril *et al.*, 1993, Anel

et al., 2006, El-Shahat e Alsafy, 2009, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b);

- Dificuldades na criopreservação do sémen (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006, O'Meara *et al.*, 2007, Morrell, 2011, Konyali *et al.*, 2013, Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Dendena, 2017 e Snoeck *et al.*, 2017);
- Na estação reprodutiva, as taxas de fertilidade aparente são normalmente inferiores às conseguidas por monta natural (Aisen, 2004a, Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2016b);
- 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 falhas genética e de doenças (Baril *et al.*, 1993, Eaglesome e Garcia, 1997, Aisen, 2004a e Leethongdee *et al.*, 2007);
- Alguns são portadores de vírus no sémen, sem sinais clínicos de doença (portadores) (Leethongdee *et al.*, 2007 e Monrell, 2011);
- Algumas bactérias patogénicas são resistentes aos antibióticos presentes nos diluidores seminais ou podem evitar os seus efeitos formando bio películas (Morrell, 2011).

Nos ovinos, uma das principais barreiras à difusão da técnica de IA relacionam-se com a anatomia do canal cervical (Sayre e Lewis, 1996, Baril *et al.*, 1993, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004a,b, Morello e Chemineau, 2004, Anel *et al.*, 2005, Naqvi *et al.*, 2005, Leethongdee *et al.*, 2007, Domínguez *et al.*, 2008, El-Shahat e Alsafy, 2009, Candappa e Bartlewski, 2011, Bromfield, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Banday *et al.*, 2017).

5.1. Cérvix

Na ovelha, o cérvix é longo, fibroso, tubular, tem um lúmen bastante contorcido (Leethongdee *et al.*, 2007, Leethongdee *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011) e possui 3-7 anéis cervicais

desalinhados que funcionam como uma barreira física à entrada de contaminantes externos no útero (Kershaw *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006 e Candappa e Bartlewski, 2011). Nestas fêmeas, os anéis cervicais representam a maior dificuldade à inseminação cervical profunda e uterina (via cervical), pois eles projectam-se para o lúmen (Os externo) e os segundo e terceiro anéis estão frequentemente desalinhados com o primeiro (Figura 4) (Kershaw *et al.*, 2005 e Moura *et al.*, 2011). A raça, a idade e o número de partos anteriores também afectam a forma do cérvix (Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011).



Figura 5: Classificação quanto à direcção e à máxima profundidade de penetração em IA em ovelhas (Kershaw *et al.*, 2005). Legenda: (A) Grau 1, (B) Grau 2 e (C) Grau 3

5.1.1. Os Cervical Externo

No estudo desenvolvido por Kershaw *et al.* (2005), este autor classificou a morfologia do Os externo em 5 tipos (Figura 5):

- A – Bico de pato: duas pregas opostas de tecido cervical, com uma fenda horizontal central onde se situa o orifício externo.
- B – Fenda: sem protrusões na vagina anterior, com uma fenda como abertura do canal cervical.

C – Rosa: conjunto de dobras cervicais que se projecta para a vagina e que obscurece o orifício externo.

D – Papila: prega que sobressai na vagina, com o orifício externo no seu ápice.

E – Aba: prega de tecido cervical que se projecta para a vagina e que se sobrepõe, completa ou parcialmente, ao orifício externo, criando o aspecto de uma aba.



Figura 6: Classificação da morfologia de Os externo da ovelha (Kershaw *et al.*, 2005).

5.2. Métodos de Recolha e de Preservação de Sémén

A recolha de sémén consiste na colheita de um ejaculado, selecionado pelo homem, a partir do aparelho genital masculino com recurso a mecanismos físicos (Ribeiro, 1997 e Granados *et al.*, 2006). O método de colheita é muito importante para a preservação do sémén (Aisen e Venturino, 2004, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012b e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016). Nos pequenos ruminantes, a recolha de sémén é feita, essencialmente, através de dois métodos: vagina artificial (VA) e electroejaculação (Baril *et al.*, 1993, Ribeiro, 1997, Steyn, 2003, Ferra e Sereno, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Maia, 2010, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Leão, 2017).

5.2.1. Vagina Artificial

A vagina artificial (VA) permite a recolha induzida de sémen (Mascarenhas, 2005, Granados, *et al* 2006 e Gonçalves *et al.*, 2008). É o método mais indicado, sendo muito semelhante ao acto da cópula natural (Sorensen Jr., 1979, Baril *et al.*, 1993, Mascarenhas, 2005, Granados *et al.*, 2006, Gonçalves *et al.* 2008, Pérez-Clariget e Porras, 2008 e Leão, 2017). Este método mimetiza as condições naturais de temperatura e de pressão da vagina da ovelha (Aisen e Venturino, 2004, Lucena, 2010 e Leão, 2017). Permite obter sémen de melhor qualidade e com menos contaminantes do meio natural (Lucena, 2010). Este método tem como principal desvantagem a necessidade de treinar os machos doadores (Gordon, 1997, Steyn, 2003, Aisen e Venturino, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Fonseca *et al.*, 2010, Maia, 2010, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Leão, 2017).

A VA é composta por um tubo rígido com uma válvula dupla, uma bainha interior em borracha, um cone flexível (Figura 6) e um tubo de colheita (Granados *et al* 2006 e Lucena, 2010). A VA deve ser exteriormente recoberta por uma capa de térmica (Figura 6) (Granados *et al* 2006 e Lucena, 2010). A bainha deve ser bem lubrificada e a VA deve ser aquecida a cerca de 42-46°C (Gordon, 1997, Ferra e Sereno, 2006 e Lucena, 2010). Quando da recolha, a temperatura da mesma não deve ultrapassar muito os 37°C a fim de evitar o choque térmico nos espermatozóides (Nunes, 2002, Ferra e Sereno, 2006 e Lucena, 2010). Os carneiros devem montar, preferencialmente, uma ovelha em cio natural ou induzido ou um manequim (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Aisen e Venturino, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Maia, 2010, Morrell, 2011, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b e Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016). Quando do salto o pénis deve ser delicadamente desviado para dentro da VA (Nunes, 2002, Ferra e Sereno, 2006 e Lucena, 2010). A pressão interna da vagina deve ser adaptada a cada reprodutor (Nunes, 2002, Ferra e Sereno, 2006, Lucena, 2010 e Leão, 2017).

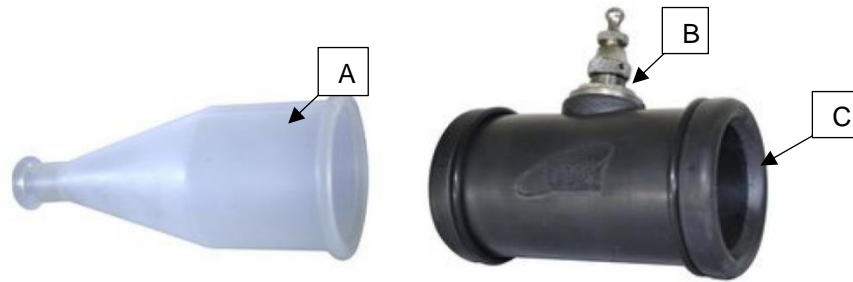


Figura 7: Vagina artificial para pequenos ruminantes e cone flexível.

Legenda: (A) Cone flexível, (B) Válvula dupla, (C) Tubo rígido

Depois de recolhido, o sêmen deve ser protegido da luz solar, de poeira e de agitações bruscas (Lima, 2000 e Granados *et al.*, 2006).

5.2.2. Electroejaculação

Este método é pouco usado nos pequenos ruminantes, o sêmen recolhido tende a ser mais volumoso e apresentar uma menor concentração (Leboeuf *et al.*, 2000, Ferra e Sereno, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a, Ledesma *et al.*, 2016 e Leão, 2017) do que sêmen recolhido por VA, causar elevados níveis de *stress* aos machos dadores (Ax *et al.*, 2004, Morello e Chemineau, 2004, Ferra e Sereno, 2006, Granados *et al.*, 2006, Lucena, 2010 e Leão, 2017) e poder ocasionar a contaminação do ejaculado com urina (Ax *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006 e Lucena 2010). Neste último caso, o ejaculado deve ser rejeitado (Ax *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006 e Lucena 2010).

A electroejaculação só deve ser usada em casos de extrema necessidade: machos não treinados e temporariamente incapacitados de saltar, irrequietos ou com baixa libido (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000, Aisen e Venturino, 2004, Hafez, 2004, Morello e Chemineau, 2004, Granados *et al.*, 2006, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Cebrián *et al.*, 2010a, Morrell, 2011, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2012a,b, Vázquez *et al.*, 2014, Jiménez-Rabadán *et al.*, 2016 e Leão, 2017).

A electroejaculação é realizada com o auxílio de um eletroejaculador, constituído por um equipamento que gera descargas eléctricas alternada (2-4 segundos, com intervalos de 10-20 segundos) de baixa voltagem e por uma sonda que é introduzida no recto do macho dador com o objectivo de estimular os centros nervosos que controlam a erecção e a ejaculação (Ferra e Sereno,

2006, Granados *et al.*, 2006, Cebrián *et al.*, 2010a, Lucena, 2010 e Leão, 2017).

5.3. Métodos de Preservação do Sêmen

Os processos de refrigeração e de congelação de sêmen afectam a capacidade fertilizadora do sêmen de carneiro (Milczewski *et al.*, 2000, O'Meara *et al.*, 2007 e Dendena. 2017). A diluição e a refrigeração do sêmen provocam alterações nas células espermáticas, reduzem a sua motilidade e põem em causa a integridade das membranas dos espermatozóides (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2005, Naqvi *et al.*, 2005, O'Meara *et al.*, 2007, Konyali *et al.*, 2013, Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Banday *et al.*, 2017 e Snoeck *et al.*, 2017). As membranas plasmática e acrossómica são as que mais sofrem com o processo de refrigeração (Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Bernardini *et al.*, 2011 e Amidi *et al.*, 2016). Os métodos de preservação do sêmen condicionam a quantidade de espermatozóides que existem em cada dose seminal (Quadro II).

Quadro II: Características da dose seminal a ser utilizado (ml) em função do local de deposição do sêmen e do método de preservação do sêmen. (Bettencourt, 1999 e Ferra e Sereno, 2006)

Tipo de IA	Volume	Dose seminal (x 10 ⁶ /ml)		
		Fresco	Refrigerado	Congelado
Vaginal	0,30-0,50 ml	300	-	-
Cervical	0,05-0,20 ml	100	150	180
Intra-uterina	0,05-0,10 ml	20	20	20

De seguida são referidos os dois métodos de preservação de sêmen usados no presente estudo: sêmen fresco e refrigerado.

5.3.1 Sêmen Fresco

A inseminação cervical com sêmen fresco implica que a sua recolha e preparação tenham de ser feitas na própria exploração ou nas suas imediações pois ele tem de ser introduzido na fêmeas no menor período de tempo possível (\approx 1 hora), uma vez que os espermatozóides assim conservados se tornam

rapidamente inviáveis (Dendena, 2017). Na verdade, a sua motilidade e viabilidade diminuem rapidamente (O'Hara *et al.*, 2010). Depois de recolhido o sémen deve ser mantido em um banho-maria a 37°C, a fim de prevenir a ocorrência de variações bruscas da sua temperatura e conseqüentemente o choque térmico (Aisen, 2008 e Lucena, 2010).

O sémen fresco pode ser utilizado puro ou diluído (Baril *et al.*, 1993, Aisen, 2004b, Dendena, 2017 e Leão, 2017). Na inseminação cervical, o volume da dose seminal deve variar entre 0,02-0,10 ml (Aisen, 2004b, Gonçalves *et al.*, 2008 e Cseh *et al.*, 2012) e conter entre 50-200 x 10⁶ espermatozoides viáveis (Aisen, 2004b, Gonçalves *et al.*, 2008, Cseh *et al.*, 2012, Santos-Neto *et al.*, 2015, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018). Na realidade, o volume interior do cérvix é inferior a 0,25 ml (Cseh *et al.*, 2012) ou oscila entre 0,1-0,3 ml (Anel *et al.*, 2006).

5.3.2. Sémen Refrigerado

A refrigeração do sémen tem por objectivo reduzir o metabolismo energético dos espermatozoides prolongando no tempo a sua viabilidade e o seu potencial fecundante (Gordon, 1997, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Aisen, 2008, Cebrián *et al.*, 2010c, Leahy *et al.*, 2010, Lucena, 2010, Morrell, 2011, Ledesma *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b, Leão, 2017 e Salmon *et al.*, 2017). O sémen refrigerado pode ser conservado por algumas horas (6-7 horas) (Aisen, 2004b) e ser transportado a longas distâncias (Gordon, 1997, Pérez-Clariget e Porras, 2008, Morrell, 2011 e Leão, 2017). A refrigeração do sémen diluído estende a viabilidade dos espermatozoides (Gordon, 1997, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Leahy *et al.*, 2010, Morrell, 2011, Ledesma *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Salmon *et al.*, 2017), reduzindo o seu metabolismo (Gordon, 1997, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Leahy *et al.*, 2010, Silva e Guerra, 2011, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b) e inibindo o crescimento bacteriano (Morrell, 2011).

A velocidade de refrigeração do sémen deve ser moderada e homogênea (Baril *et al.*, 1993, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006 e Dendena, 2017), oscilando entre -0,1°C e -0,5°C/minuto (Aisen, 2004b). A queda brusca da temperatura induz o choque térmico (Dendena, 2017).

Nos ovinos, cada dose de sêmen diluído e refrigerado (0,25 ml) deve conter entre 200×10^6 (Cseh *et al.*, 2012, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018). O refluxo cervical deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012 e Dendena, 2017), particularmente quando ele é abundante (Dendena, 2017).

5.4. Técnicas de Inseminação Artificial

A IA pode ser realizada com recurso a diferentes técnicas: vaginal, cervical, transcervical e uterina (Figura 7) (Anel *et al.*, 2006, Granados *et al.*, 2006, Fonseca *et al.*, 2010, Valentim *et al.*, 2016b e Leão, 2017).

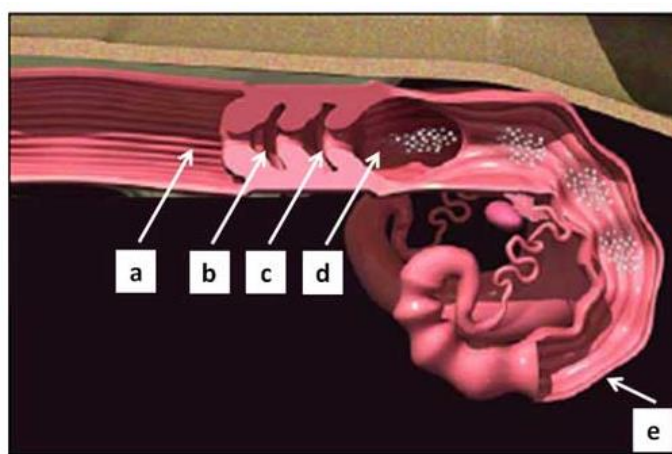


Figura 8: Local de deposição do sêmen e respectivas denominações das técnicas de inseminação (Valentim *et al.*, 2016a). *Legenda:* (a) inseminação vaginal, (b) inseminação cervical superficial, (c) inseminação cervical profunda, (d) inseminação intra-uterina por via transcervical e (e) inseminação intra-uterina por laparoscopia

De seguida são referidos os dois métodos de IA usados no presente estudo: vaginal e cervical.

5.4.1. Inseminação Vaginal

A inseminação vaginal é uma técnica frequentemente denominada de “tiro no escuro” e consiste na deposição do sêmen na vagina, o mais profundamente possível, mas sem qualquer tentativa de localização do cérvix (Myline *et al.* 1997, Bettencourt, 1999, Ferra e Sereno, 2006, Palacios, 2010 e Dendena, 2017). A aplicação desta técnica requer pouco treino e nela deve ser empregue apenas sêmen fresco pouco diluído (Baril *et al.*, 1993, Myline *et al.*

1997 e Bettencourt, 1999). Geralmente, produz baixas taxas de fertilidade (30-65%) (Buckrell *et al.*, 1991, Ferra e Sereno, 2006 e Cseh *et al.*, 2012).

Esta técnica tem a vantagem de utilizar um sistema de contenção mínimo e de não requerer uma manipulação prolongada das fêmeas a inseminar (Ferra e Sereno, 2006 e Oliveira; 2009).

A IA vaginal deve ser feita, preferencialmente, 12-18 horas após a detecção do cio (Evans e Maxwell, 1987 e Cseh *et al.*, 2012). Contudo, ela pode ser feita, com sémen fresco ou refrigerado, a tempo fixo: 48-58 horas (Bettencourt, 1999 e Ferra e Sereno, 2006) ou 55 ± 1 horas pós-término do tratamento de controlo da actividade ovárica (Holtz *et al.*, 2008, Palacios, 2010, Theodosiadou *et al.*, 2014, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018).

Na IA vaginal de ovelhas, as doses seminais devem conter entre $200-400 \times 10^6$ espermatozóides (Ax *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006 e Dendena, 2017).

5.4.2. Inseminação Cervical

Na inseminação cervical o sémen é depositado no canal cervical (Oliveira, 2009 e Abecia e Forcada, 2010). De acordo com o local de deposição do sémen, a inseminação é classificada como: cervical superficial ou cervical profunda (Oliveira, 2009 e Abecia e Forcada, 2010). Esta técnica é fácil e rápida de aplicar e tem custos relativamente baixos (Oliveira, 2009).

Gordon (1997), Ax *et al.* (2004), Cseh *et al.* (2012), Dendena (2017) e Fornazari *et al.* (2018) propõem que a IA cervical seja realizada $55 + 1$ hora depois de terminado o tratamento de controlo da actividade ovárica. Cada dose seminal deve possuir entre $100-200 \times 10^6$ espermatozóides (Aisen, 2004a, Ferra e Sereno, 2006, Valentim *et al.*, 2009, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018).

Na IA cervical, o uso de sémen fresco ou refrigerado resulta em boas taxas de fertilidade (60,0-97,1%) (Ax *et al.*, 2004, Ferra e Sereno, 2006 e Valentim *et al.*, 2009, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018). Porém, as taxas de fertilidade obtidas com sémen congelado tendem a não ser aceitáveis, sendo inferior comparado com semem fresco (Bicudo *et al.*, 2005 e Faigl *et al.*, 2012).

II. TRABALHO EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança, mais precisamente na Quinta do Pinheiro Manso (Latitude 41° 48' 33"N, Longitude 6° 44' 3"W e Altitude 670 metros), pertencente à Escola Superior Agrária, do Instituto Politécnico de Bragança (ESA-IPB), entre 13 de Março e 8 de Julho 2017.

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

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

1.1. Animais

Neste trabalho foram utilizadas 63 ovelhas da raça Churra Galega Bragançana Branca, com idades compreendidas entre 2-10 anos (múltiparas). Todas as ovelhas tinham parido 6 meses antes do início do estudo e estavam secas há cerca de 4 meses (Figura 8).



Figura 9: Ovelhas da raça Churra Galega Bragançana Branca utilizada no ensaio.

1.2. Avaliação da Actividade Ovária

A actividade ovária das ovelhas foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de P_4 . A recolha das amostras de sangue foi feita com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados através de punção da veia jugular (Figura 9). Após a centrifugação do sangue a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante (plasma sanguíneo), que foi pipetado para tubos de Eppendorf devidamente identificados. Em seguida, estes foram congelados numa arca ultracongeladora (-70°C) (Thermo 960[®], Electron Cooperation, Marlotta, EUA) até ao momento do seu processamento.



Figura 10: Colheita de amostra de sangue por punção da veia jugular.

Os níveis plasmáticos de P_4 foram determinados através da técnica de RIA (radioimunoensaio). Esta foi realizada com recurso a um leitor de cintilações DPC[®] Gamma C12 (Bertholt Technologies, Bad Wildbad, Alemanha), segundo a técnica indicada pelo fabricante dos *kits* (DiaSource[®] ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 7,7 e 15,8%.

1.2.1 Avaliação da Ciclicidade Pré-Tratamento Progestagénico

Nas duas semanas anteriores à realização do tratamento progestagénico curto + eCG (4-17 de Abril de 2017), com o objectivo de determinar o estado

fisiológico das ovelhas (Cíclicas vs. Anestro), procedeu-se à colheita de amostras de sangue com 3-4 dias de intervalo. As colheitas foram feitas sempre no período da manhã. A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.1.1.

Considerou-se que as ovelhas estavam em anestro sazonal quando, na totalidade das amostras recolhidas, os níveis plasmáticos de P₄ foram inferiores a 0,5 ng/ml.

1.2.2. Avaliação da Resposta Ovária ao Tratamento Progestagénico curto + eCG

Com o intuito de identificar a formação do primeiro corpo lúteo (CL) pós-tratamento progestagénico curto + eCG, nos cinco dias pós-administração de eCG, procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para posterior determinação dos níveis plasmáticos de P₄. A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.1.1.

Considerou-se que o primeiro CL se havia formado quando os níveis plasmáticos de P₄ ultrapassaram, pela primeira vez, os 0,5 ng/ml.

1.3. Tratamentos Aplicados

O presente trabalho teve início a 13 de Março de 2017, com a colocação de um implante subcutâneo de melatonina – 18 mg (Melovine[®], CEVA, Portugal) em 26 ovelhas (grupo Melatonina) (Figura 10) (Quadro III). As demais ovelhas constituíram o grupo Controlo (n = 37).

Quadro III: Divisão das ovelhas de acordo com os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva aplicados

Número Total de Ovelhas (n = 63)	
Controlo (n = 37)	Melatonina (n = 26)
PGF_{2α} + FGA (5 dias) (n = 63)	

No dia 19 de Abril de 2017, todas as ovelhas (Controlo e Melatonina) receberam uma esponja vaginal impregnada com 20 mg de FGA (Chrono-Gest[®], Intervet, Portugal). Quando da colocação das esponjas vaginais, elas receberam uma injeção intramuscular (i.m.) de 100 mg de cloprostenol (Estrumate[®], MSD Animal Health, Portugal) análogo sintético de PGF_{2α}. O tratamento progestagénico teve a duração de 5 dias.



Figura 11: Pistola para colocação de implante subcutâneo de melatonina.

Legenda: (A) Pistola de Aplicação, (B) Implantes de Melatonina, (C) Agulha

Quando da remoção das esponjas vaginais (24 de Abril de 2017), todas as ovelhas receberam uma injeção i.m. de 500 UI de eCG (Intergonan[®], Intervet, Portugal) (Figura 11).



Figura 12: Remoção das esponjas e aplicação de uma injeção i.m. de 500 UI de eCG.

1.4. Recolha de Sémén

Neste estudo foram utilizados 3 carneiros (3-4 anos de idade) da raça

Churra Galega Bragançana. O sêmen foi recolhido com recurso a vaginas artificiais pré-aquecidas a 42°C (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) (Figura 12). De cada macho foram recolhidos 4 ejaculados: 2 no período da manhã e 2 no período da tarde. Os machos não ejaculavam há 3 dias.

Após a colheita os tubos colectores foram transportados para o laboratório, em menos de 10 minutos protegidas com uma capa termica, onde foram mantidos a 37°C em um banho-maria (Grant International, Cambridge, Inglaterra). No mesmo equipamento foram conservados os diluidores seminais.



Figura 13: Preparação da ovelha para a recolha de sêmen com o auxílio da vaginas artificiais.

1.5. Análises Seminais

O volume do ejaculado 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[®], 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 camera 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-Venep, 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 materiais quentes (pontas de pipetas, tubos, lâminas com 4 câmaras Leja 20).

Os ejaculados utilizados tinham um volume $\geq 2,1$ ml, uma motilidade progressiva $\geq 83\%$ e uma concentração do ejaculado $\geq 2,6 \times 10^9$ espermatozoides.

1.6. Doses Seminais (Frescas e Refrigeradas)

Cada ejaculado foi diluído (1:1) com um de dois diluidores comerciais: INRA 96® (IMV Technologies, L'Aigle, França) ou OviXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, França) (Quadro IV).

Quadro IV: Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com INRA 96® ou com OviXcell®

Número Total de Ovelhas (n = 63)							
Controlo (n = 37)				Melatonina (n = 26)			
Sémen Fresco (n = 18)		Sémen Refrigerado (n = 19)		Sémen Fresco (n = 13)		Sémen Refrigerado (n = 13)	
OviXcell (n = 9)	Inra 96 (n = 9)	OviXcell (n = 9)	Inra 96 (n = 10)	OviXcell (n = 6)	Inra 96 (n = 7)	OviXcell (n = 6)	Inra 96 (n = 7)

Após 10 minutos de repouso a 37°C, a temperatura dos ejaculados recolhidos de manhã foi reduzida, durante cerca de 120 minutos, de 37°C para 15°C, com recurso a um banho-maria refrigerado (Neslab® RTE 221, Newington, EUA). Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. As palhinhas brancas continham sémen diluído com INRA 96® (n = 17) e as vermelhas sémen diluído com OviXcell® (n = 15). As inseminações ocorreram todas no intervalo máximo de 120 minutos pós-refrigeração (15°C).

Os espermatozoides recolhidos de tarde também foram diluídos (1:1) com INRA 96[®] ou com OviXcell[®]. Após 10 minutos de repouso, o sêmen diluído foi aspirado para palhinhas de sêmen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. As palhinhas brancas continham sêmen diluído com INRA 96[®] (n = 16) e as vermelhas sêmen diluído com OviXcell[®] (n = 15). As palhinhas de sêmen refrigerado foram transportadas em uma arca refrigeradora da Minitüb (Tiefenbach, Alemanha) à temperatura de 15°C. As palhinhas de sêmen fresco foram transportadas num banho-maria de transporte da IMV (L'Aigle, França) a 37°C. Entre a preparação das doses seminais de sêmen fresco e o começo da IA passaram menos de 30 minutos.

1.7. Inseminação Artificial a Tempo Fixo

Todas as ovelhas foram inseminadas, independentemente de terem manifestado cio ou não, 55 + 1 horas depois da administração de eCG. Começou-se por inseminar as ovelhas com sêmen fresco.

As IA foram realizadas por dois inseminadores (A vs. B). Quando da IA registaram-se os seguintes parâmetros: cor da mucosa vaginal (Rosa vs. Rosa Pálido vs. Rosa Hemorrágico), grau de lubrificação vaginal (Reduzida vs. Boa vs. Intensa), tipo de Os externo (Kershaw *et al.*, 2005) (Figura 5), viscosidade do muco cervical (Líquida vs. Viscosa), local da deposição de sêmen (Vaginal vs. 1^a prega vs. 2^a prega) (Figura 4) e ocorrência de refluxo (Sem vs. Ligeiro vs. Com). A deposição do sêmen foi feita sempre de forma a não forçar a penetração, evitando inflamar ou ferir a mucosa do canal cervical. No procedimento, utilizaram-se fórceps, sistemas de luz LED e pistoletes Quicklock[®] (Tiefenbach, Alemanha) e bainhas Minitub[®] (Tiefenbach, Alemanha).

Terminadas as IA, o pessoal técnico envolvido retirou-se calmamente do local, as ovelhas foram libertadas e deixadas sozinhas durante 14 horas. Por outro lado, é importante salientar que nos 30 dias seguintes, se manteve o aporte energético/proteico da dieta.

1.7.1. Posição das Fêmeas Durante a Inseminação

As ovelhas foram inseminadas presas ao *cornadís* de alimentação. Para facilitar a observação de Os externo, dois membros da equipa elevaram os

membros posteriores das ovelhas, mantendo os membros anteriores sempre em contacto com o solo (Figura 13).



Figura 14: Imobilização e posição de contenção das ovelhas durante a IA.

1.8. Diagnóstico de Gestação

Quarenta e um dias (5 de Junho de 2017) após a IA (26 de Abril de 2017) procedeu-se ao diagnóstico de gestação por ultra-sonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet e de uma sonda rectal multifrequência (5,0-10,0 MHz). A frequência mais utilizada foi a de 5,0 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 χ^2 (Snedecor e Cochran, 1980).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Peso e Condição Corporal

No início deste estudo, a idade média das ovelhas Churras Galegas Bragançanas era de $3,3 \pm 1,9$ anos (c.v. = 56,5%). As diferenças de idade registadas entre as ovelhas dos grupos Controlo e Melatonina revelaram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$) (Quadro V). Entre tanto, as diferenças de idade encontradas entre ovelhas dos grupos inseminados com sêmen fresco ou refrigerado ($P \leq 0,001$) ou diluído com INRA 96[®] ou com OviXcell[®] diferiram de modo estatisticamente significativo ($P \leq 0,05$). De acordo com Esmailizadeh *et al.* (2009) e Santolaria *et al.* (2011), entre os 2-7 anos de idade, a taxa de fertilidade tende a elevar-se. Santolaria *et al.* (2011) recomendam que as ovelhas só sejam inseminadas com idades compreendidas entre os 2-5 anos de idade. Anel *et al.* (2006) recomendam que, em programas de IA, não sejam utilizadas ovelhas com mais de 5 anos de idade. Fornazari (2018) recomenda a não inseminação de ovelhas com mais de 7 anos de idade.

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

	Idade (anos)	Peso (kg)	CC (pontos)
Controlo	$3,1^a \pm 2,1$	$58,5^a \pm 8,6$	$3,5^a \pm 0,6$
Melatonina	$3,6^a \pm 1,6$	$60,5^a \pm 5,0$	$3,7^a \pm 0,5$
Fresco	$2,4^a \pm 1,2$	$58,1^a \pm 7,6$	$3,6^a \pm 0,6$
Refrigerado	$4,2^b \pm 2,8$	$60,3^a \pm 9,1$	$3,6^a \pm 0,6$
INRA 96[®]	$3,8^a \pm 2,1$	$59,1^a \pm 10,2$	$3,6^a \pm 0,6$
OviXcell[®]	$2,8^c \pm 1,4$	$59,5^a \pm 7,5$	$3,6^a \pm 0,6$

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

As ovelhas pesavam, em média, $59,4 \pm 7,3$ kg (c.v. = 12,3%) e apresentavam uma CC média de $3,5 \pm 0,6$ (c.v. = 16,4%). As diferenças de peso corporal e de CC entre ovelhas Controlo e Melatonina, inseminadas com sêmen fresco ou refrigerado, diluído com INRA 96[®] ou com OviXcell[®] foram estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). As ovelhas apresentavam um

peso e uma CC média adequada à cobertura – 2,5-3,5 pontos (O’Brein, 2002, Scaramuzzi e Martin, 2008 e Karikari e Blasus, 2009) ou 3,0-4,0 pontos (Palacios, 2010 e Valentim *et al.*, 2016b).

2.2. Estado Fisiológico Pré-Tratamento Progestagénico

Nas duas semanas anteriores à aplicação do tratamento progestagénico curto (FGA) + eCG, todas as ovelhas apresentaram em, pelo menos uma das tomas de sangue, níveis plasmáticos de P₄ superiores a 0,5 ng/ml, ou seja, estavam “cíclicas”. Este resultado é superior ao encontrado por Dendena (2017), em ovelhas da mesma raça: 74,6% ($\chi^2 = 28,6$; $P \leq 0,001$). É possível que esta diferença resulte de diferenças anuais nas condições climáticas (Anel *et al.*, 2005), que condicionam o desenvolvimento das pastagens natural, as condições climáticas e, conseqüentemente o estado de saúde e os gastos em termorregulação (Salama *et al.*, 2014, Palacios e Abecia, 2015, Abecia *et al.*, 2016 e Silva *et al.*, 2016).

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

2.3. Resposta Ovária ao Tratamento Progestagénico Curto + eCG

No presente trabalho quando da colocação dos implantes subcutâneos de melatonina desconhecia-se o estado fisiológico (Cíclicas vs. Anestro) das ovelhas. A decisão de os colocar teve por objectivo melhorar as taxas reprodutivas, particularmente caso as ovelhas estivessem em anestro sazonal (Forcada *et al.*, 2001, Sánchez *et al.*, 2003 e Santander *et al.*, 2003, Valentim *et al.*, 2006 e Valentim *et al.*, 2009). Nas ovelhas Churras Bragançanas a eficácia do tratamento curto FGA + eCG foi total – 100,0%. Os efeitos da administração prévia de melatonina exógena foram estatisticamente não significativos ($P > 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Valentim *et al.* (2004), Correia *et al.* (2011), Correia *et al.* (2012), Venâncio (2012) e Fornazari (2018). As condições ambientais particularmente favoráveis, a ciclicidade

apresentada pelas ovelhas, o seu peso e a sua CC são alguns dos factores que terão certamente contribuído para este resultado.

De acordo com Bartlewski *et al.* (1999) os níveis circulantes de P_4 começam a elevar-se 3-7 dias depois da detecção do cio. No presente trabalho a primeira elevação dos níveis plasmáticos de P_4 (PENPP₄) foi detectado em todas as ovelhas, cerca de 32 horas após a administração de eCG. Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018) observaram resultados semelhante aos encontrados no presente trabalho, respectivamente em ovelhas Assaf (28,9 ± 11,5 horas; em 2017) e ovelhas Awassi x Sarda (30,5 ± 12,6 horas; em 2017). Porém, eles diferem significativamente dos registados por Dendena (2017) em ovelhas Churras Bragançanas (53,1 ± 15,6 horas; em 2016) e por Conradi *et al.* (2017) em ovelhas Lacaune (50,9 ± 33,5 horas; em 2017). Os tratamentos progestagénicos produzem respostas reprodutivas variáveis (Evans, 2003 e Martinez *et al.*, 2015), possivelmente porque não controlam o crescimento folicular (Menchaca e Rubianes, 2004 e Martinez *et al.*, 2015). A P_4 exógena pode promover a maturação de folículos pré-ovulatórios (Martin *et al.*, 1986, Chemineau *et al.*, 1987 e Contreras-Solis *et al.*, 2008). Por outro lado, Driancourt *et al.* (1987) demonstraram que a quantidade de gonadotropinas que é necessária para induzir o crescimento folicular final é muito variável. Os resultados encontrados no presente estudo indiciam variações raciais e anuais na resposta das ovelhas aos tratamentos progestagénicos “curtos” + eCG. A administração prévia de melatonina não afectou significativamente a duração do intervalo entre a remoção das esponjas vaginais e a PENPP₄ ($P > 0,05$).

O tempo da inseminação artificial (IA) pós-tratamento de sincronização de cios é muito importante (Kukovics *et al.*, 2011). A melhor altura difere segundo o autor: 46 horas (Fernandez-Abella *et al.*, 2003 e Kukovics *et al.*, 2011), 48-72 horas (Karagiannidis *et al.*, 2001 e Kukovics *et al.*, 2011), 55 horas (Baril *et al.*, 1993, Valentim *et al.*, 2009, Palacios, 2010, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017, Fornazari, 2018 e Fornazari *et al.*, 2018) e 58-63 horas (Donovan *et al.*, 2001, 2004 e Kukovics *et al.*, 2011). Apesar da PENPP₄ ter ocorrido nas primeiras 32 horas pós-administração de eCG, a realização da IA 55 horas depois do tratamento progestagénico curto + eCG resultou em uma boa taxa de fertilidade aos 41 dias.

2.4. Resposta à Inseminação Artificial

Quarenta e um dias após a IA, 84,1% das ovelhas Churras Bragançanas estavam gestantes. Neste trabalho, a taxa de fertilidade foi muito positiva quando comparada com os valores médios da taxa de fertilidade indicados na bibliografia para ovinos: 50-65% (Baril *et al.*, 1993, Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009) e 65-75% (Colas e Guérin, 1979; citados por Cognié, 1988). Vários autores referem valores de fertilidade igualmente elevados – 70,0-82,0% (Donovan *et al.*, 2001, 2004 e Kukovics *et al.*, 2011), 74,5% (Fornazari, 2018), de 76,5% (Fornazari *et al.*, 2018), de 82,2% (Hill *et al.*, 1998, Ehling *et al.*, 2003 e Kukovics *et al.*, 2011), 85,1% (Dendena, 2017), 88,0% (Conradi *et al.*, 2017) e de 80-90% (Kukovics *et al.*, 2011).

2.4.1. Idade, Peso e Condição Corporal

A idade não afectou a taxa de fertilidade ($P>0,05$). Segundo Forcada (2010), as ovelhas com idades superiores a 10 anos apresentam uma redução significativa das funções hipotalâmicas e hipofisárias. De acordo com Fornazari (2017), esta redução surge em ovelhas Awassi x Sarda aos 8-9 anos. Anel *et al.* (2006) recomendam que, em programas de IA, não sejam utilizadas ovelhas com mais de 5 anos de idade. Fornazari (2018) sugere que se evite a inseminação de ovelhas com mais de 7 anos de idade. No presente trabalho, apenas 6 ovelhas tinham mais de 5 anos e 3 mais de 7 anos de idade.

Nem o peso, nem a CC condicionaram a taxa de fertilidade ($P>0,05$). Para além das ovelhas estarem secas há cerca de 4 meses, o regime alimentar praticado era adequado, como demonstra o peso e a CC média (3,5 pontos) das ovelhas estudadas. Segundo O'Brein (2002), Scaramuzzi e Martin (2008) e Karikari e Blasu (2009) a CC ideal no momento da inseminação, deve situar-se entre 2,5-3,5 pontos. Palacios (2010) e Valentim *et al.* (2016b) propoem um intervalo ligeiramente mais elevado – 3,0-4,0 pontos.

2.4.2. Melatonina Exógena

Em França a administração de melatonina exógena melhora as taxas reprodutivas de fertilidade e de prolificidade (Valentim *et al.*, 2006a e Forcada, 2010). Em Espanha os seus efeitos são evidentes essencialmente no que se

refere à taxa de prolificidade (Forcada, 2010). A melhoria da taxa de fertilidade está associada à indução da actividade ovárica (Forcada, 2010). No presente estudo, a administração prévia de melatonina exógena não influenciou a taxa de fertilidade (Controlo: 86,5% vs. Melatonina: 84,0%) ($\chi^2 = 0,2$; $P > 0,05$) (Figura 14). O mesmo foi observado por Fornazari (2018).

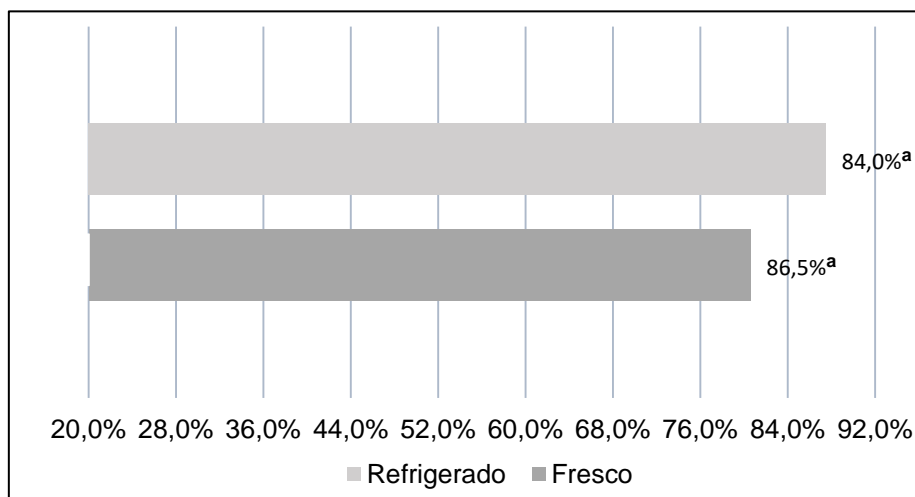


Figura 15: Taxa de fertilidade média das ovelhas dos grupos controlo e melatonina.

É possível que este resultado esteja relacionado com o facto de todas as ovelhas já estarem cíclicas quando da aplicação do tratamento progestagénico curto + eCG. Contudo, há que ter presente que os efeitos de um bom regime alimentar podem camuflar os efeitos positivos da administração de melatonina exógena sobre as taxas reprodutivas (Valentim *et al.*, 2006b e Forcada, 2010). O mesmo sucede com a aplicação de tratamentos progestagénicos + gonadotropinas (Valentim *et al.*, 2006b).

2.4.3. Carneiro

Segundo Anel *et al.* (2005), o carneiro dador de sémen pode afectar significativamente a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial cervical, particularmente quando esta é feita com sémen refrigerado. As diferenças entre carneiros podem resultar, entre outros factores, do tamanho das reservas epididimais de espermatozóides quando da colheita do ejaculado (Baril *et al.*, 1993). Salamon e Maxwell (2000) acreditam que as diferenças entre carneiros têm normalmente origem genética e/ou ambiental. Neste trabalho foram usados

3 carneiros como dadores de sémen. As diferenças de fertilidade entre carneiros foram estatisticamente significativa (Carneiro 219: 87,5% vs. Carneiro 220: 91,7% vs. Carneiro 224: 78,5%) ($\chi^2 = 8,6$; $P \leq 0,05$). Porém, as diferenças de fertilidade observadas entre os carneiros 219 e 220 e os carneiros 219 e 224 revelaram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$) (Figura 15). Pelo contrário, as diferenças de fertilidade registadas entre os carneiros 220 e 224 foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 7,7$; $P \leq 0,01$). Nos ovinos de leite, os machos reprodutores influenciam a taxa de fertilidade pós-IA (Campbell *et al.*, 1996, Anel *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006 e Fornazari, 2018). Todavia, Conradi *et al.* (2017) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre carneiros da raça Lacaune.

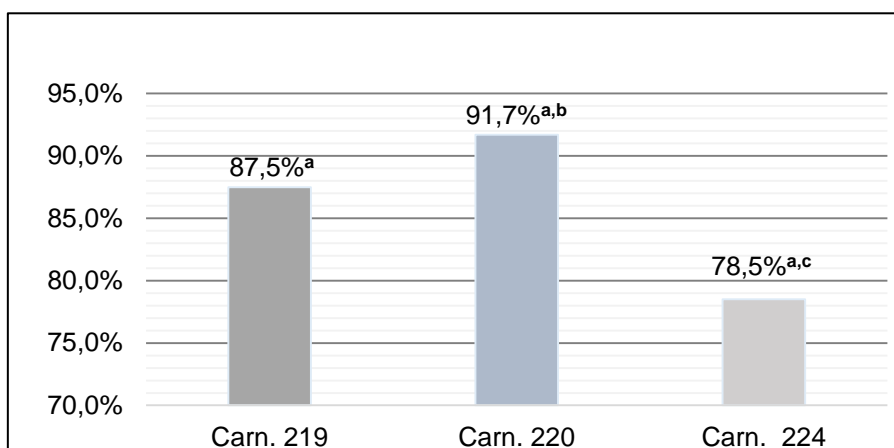


Figura 16: Diferenças da taxa de fertilidade entre carneiros. *Legenda:* a=a, para $P > 0,05$, b≠c, para $P \leq 0,01$

2.4.4. Método de Preservação do Sémen

De um modo geral, as taxas de fertilidade são mais altas após inseminação com sémen fresco do que com sémen refrigerado (Gergatz e Gyoker, 1997, Fernandez-Abella *et al.*, 2003, Aral *et al.*, 2011 e Kukovics *et al.*, 2011). No presente trabalho a taxa de fertilidade não variou significativamente em função da técnica de preservação do sémen utilizada (Fresco: 80,6% vs. Refrigerado: 87,5%) ($\chi^2 = 1,7$; $P > 0,05$) (Figura 16). No mesmo sentido, Fornazari (2018) (Fresco: 81,3% vs. Refrigerado: 72,2%) e Fornazari (2018) (Fresco: 78,6% vs. Refrigerado: 70,4%) não encontraram diferenças estatisticamente significativas na taxa de fertilidade pós-IA com sémen fresco

ou com sêmen refrigerado. Pelo contrário, Dendena (2017) obteve uma taxa de fertilidade superior entre as fêmeas IA com sêmen refrigerado do que com sêmen fresco (Fresco: 79,4% vs. Refrigerado: 90,9%). Conradi *et al.* (2017) também observou uma elevada taxa de fertilidade com sêmen refrigerado (88,0%).

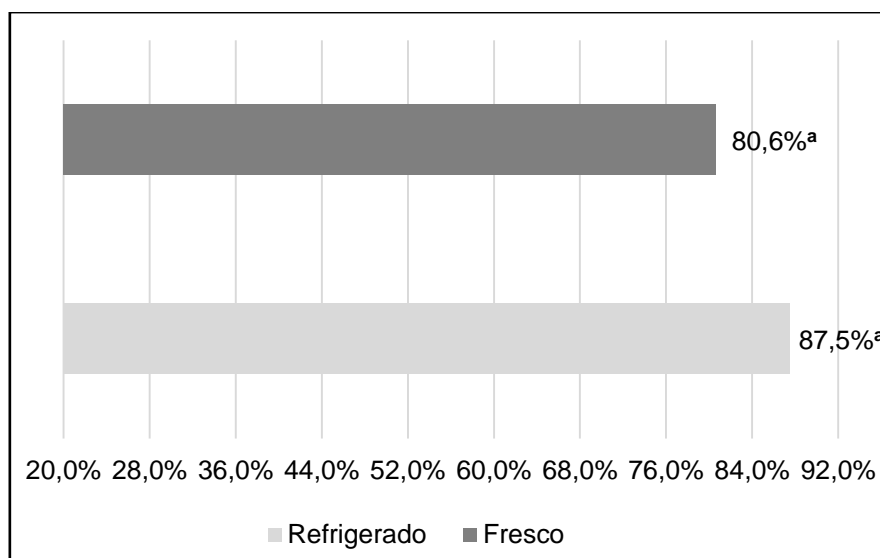


Figura 17: Taxas de fertilidade obtidas pós-imseminação com sêmen diluído fresco ou sêmen diluído refrigerado.

2.4.5. Diluidor Seminal

O tipo de diluidor seminal condiciona a viabilidade dos espermatozoides conservados, dependendo das suas propriedades osmóticas, tampão e de protecção antibacterianas e antifúngicas e contra o choque térmico (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b, Anel *et al.*, 2006, O'Meara *et al.*, 2007, Cebrián *et al.*, 2010b, Bernardini *et al.*, 2011, Morrell, 2011, Amidi *et al.*, 2016, Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016b e Arando *et al.*, 2017). No presente trabalho, o tipo de diluidor seminal não afectou significativamente a taxa de fertilidade (INRA 96[®]: 90,9% vs. OviXcell[®]: 83,3%) ($\chi^2 = 2,8$; $P > 0,05$) (Figura 17). Fornazari (2018) obtiveram resultados idênticos (Andromed[®]: 77,8% vs. OviXcell[®]: 75,0%). A taxa de fertilidade obtida após IA com sêmen diluído com OviXcell[®] foi igual à registada por Fornazari (2018) ($\chi^2 = 1,9$; $P > 0,05$). Dendena (2017) também não encontrou diferenças estatisticamente significativas nas taxas de fertilidade associadas ao tipo de

diluidor seminal utilizado (Andromed[®]: 83,9% vs. INRA 96[®]: 83,3%).

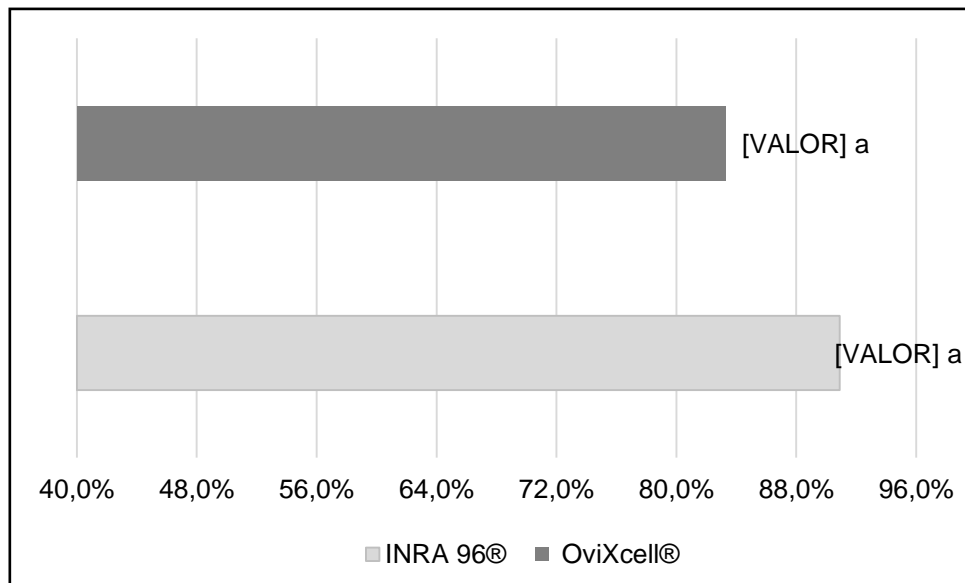


Figura 18: Taxas de fertilidade tendo em conta o diluidor de sêmen utilizado.

Ainda que o INRA 96[®] (sem glicerol) tenha sido desenvolvido para preservar sêmen de equino e o OviXcell[®] (com glicerol) para preservar sêmen de ovino, os efeitos de ambos sobre a fertilidade do sêmen de carneiros Churros Bragançanos foram iguais. O glicerol tem efeitos tóxicos sobre os espermatozóides (Watson, 1992 e Watson, 1995), pois tende a aumentar a pressão osmótica intra-celular (Watson, 1992), a desnaturar as proteínas espermáticas e a promover a fragilização da membrana plasmática (Curry *et al.*, 1995, Watson, 1995 e Seifi-Jamadi *et al.*, 2017). É possível que no presente trabalho, porque o sêmen diluído foi rapidamente inseminado depois de preparado (fresco ou refrigerado), estes efeitos não se tenham mostrado estatisticamente significativos. Durante o processo de refrigeração o glicerol protege os espermatozóides do choque térmico (Salamon e Maxwell, 2000, Anel *et al.*, 2006 e Forouzanfar *et al.*, 2010). No presente estudo é possível que este efeito protector tenha contribuído para que a taxa de fertilidade do sêmen refrigerado tenha sido igual à do sêmen fresco. Durante o processo de refrigeração do sêmen ocorrem perdas de motilidade, alterações morfológicas e um declínio da sua capacidade de sobrevivência no tracto genital feminino, reduzindo a taxa de fertilidade e aumentando a taxa de mortalidade

embrionária (Paulenz *et al.*, 2002, O'Hara *et al.*, 2010 e Dendena, 2017). Contudo, apesar de se ter utilizado uma diluição de 1:1, o choque térmico pode ter sido prevenido apenas porque a refrigeração do sémen foi realizado de forma regular ($\approx 0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) (Baril *et al.*, 1993, Salamon e Maxwell, 2000, Aisen, 2004b e Anel *et al.*, 2006).

2.4.6. Os Externo

No presente trabalho foram encontrados todos os tipos de Os externo da Tabela de Kershaw *et al.* (2005) (Quadro VI). O mesmo sucedeu no trabalho desenvolvido por Conradi *et al.* (2017), Dendena (2017), Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018). No presente trabalho, a distribuição percentual foi relativamente uniforme, com excepção do tipo Fenda (mais elevada). Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018) também encontraram uma distribuição percentual relativamente uniforme, com excepção do tipo Aba (mais reduzida). A distribuição percentual verificada no presente trabalho e no de Dendena (2017), com ovelhas da raça Churra Galega Bragançana, de Fornazari (2018), com ovelhas Awassi x Sarda e de Fornazari *et al.* (2018), com ovelhas da raça Assaf foi diferente e reflecte possíveis diferenças genéticas, de idade e do número de partos (Kershaw *et al.*, 2005 e Aral *et al.*, 2011).

O tipo de Os externo influenciou a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 14,5$; $P \leq 0,01$) (Quadro VI). O mesmo foi observado por Conradi *et al.* (2017), Dendena (2017), Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018). No presente trabalho, os tipos de Os que produziram taxas de fertilidade mais elevadas foram a Aba (90,9%) e a Fenda (89,5%). O Papila (75,0%) e o Bico de Pato (77,8%) determinaram as piores taxas de fertilidade. O Rosa resultou em um valor intermédio (83,3%). Conradi *et al.* (2017) obteve os melhores resultados com os tipos Bico de pato (100%), Papila (100%) e Fenda (100%). Dendena (2017) encontraram as melhores taxas de fertilidade com os tipos Papila e Fenda. Fornazari *et al.* (2018) registou as melhores taxas de fertilidade com os tipos Bico de pato (85,7%), Papila (100,0%), Fenda (88,9%) e Rosa (80,0%). Por seu turno, Fornazari (2018) observou a melhor taxa de fertilidade após IA de ovelhas com o tipo Aba (83,3%).

Quadro VI: Tipos de Os externo (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Os externo	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Bico de Pato	14,3% ^a (9/63)	77,8% ^x (7/9)
Aba	17,5% ^{a,c} (11/63)	90,9% ^y (10/11)
Rosa	19,0% ^{a,b} (12/63)	83,3% ^{x,y} (10/12)
Papila	19,0% ^{a,b} (12/63)	75,0% ^x (9/12)
Fenda	30,2% ^b (19/63)	89,5% ^y (17/19)

a=a e b=b, para P>0,05; b≠c, para P≤0,05; a≠b, para P≤0,01; x=x e y=y, para P>0,05; x≠y, para P≤0,01 (entre linhas, mesmo parâmetro).

2.4.7. Cor da Mucosa e Lubrificação Vaginal

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

Quadro VII: Nível de lubrificação vaginal (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Lubrificação	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Reduzida	9,5% ^a (6/63)	83,3% ^x (5/6)
Boa	61,9% ^b (39/63)	87,2% ^x (34/39)
Abundante	28,6% ^c (18/63)	88,9% ^x (16/18)

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

Fonseca *et al.* (2017) pensam que a aparência macroscópica das secreções vaginais pode ser usada na estimação do período da fase folicular em que a fêmea se encontra. Estas são mais cristalinas e mais abundantes quando o ovário é “dominado” por folículos antrais de grandes dimensões (Fonseca *et al.*, 2017). Quando da ovulação, as secreções vaginais são essencialmente estriadas/caseosas (Fonseca *et al.*, 2017). No presente trabalho, o nível de lubrificação vaginal variou significativamente entre ovelhas ($\chi^2 = 62,0$; P≤0,001) (Quadro VII). Contudo, este não afectou significativamente a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 1,6$; P>0,05). O mesmo foi referido por Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018). Conradi *et al.* (2017) e Dendena (2017) observaram melhores taxas de fertilidade quando a lubrificação vaginal era líquida (cristalina ou cristalina/estriada) e abundante.

2.4.8. Viscosidade das Secreções Cervicais

Fonseca *et al.* (2017) acreditam que a aparência macroscópica do muco cervical pode ser utilizada na determinação do momento ideal para proceder à IA. Este varia de cristalino a caseoso entre o início e o fim do cio (Siqueira *et al.*, 2009 e Fonseca *et al.*, 2017). No presente trabalho, a maioria das ovelhas apresentou um muco cervical líquido (cristalino ou cristalino/estriado) (Quadro VIII). As demais ovelhas exibiram um muco cervical viscoso (estriado ou estriado/caseoso) ($\chi^2 = 50,0$; $P \leq 0,001$). Dendena (2017) também observou maioritariamente uma lubrificação líquida (cristalina ou cristalina/estriada). Conradi *et al.* (2017), Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018) verificaram que 100% das ovelhas apresentavam um muco cervical líquido (cristalino e cristalino/estriado). Os resultados encontrados relacionam-se, certamente, com os tratamentos aplicados, com o momento em que surgiu a PENPP₄ e o momento em que se procedeu à IA e indiciam que as ovelhas estavam bem alimentadas, saudáveis e maioritariamente em um período avançado da fase folicular.

Quadro VIII: Nível de lubrificação vaginal (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Secreção	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Líquida	74,6% ^a (47/63)	83,0% ^x (39/47)
Viscosa	25,4% ^b (16/63)	93,8% ^y (15/16)

a≠b, para $P \leq 0,001$; x≠y, para $P \leq 0,05$ (entre linhas, mesmo parâmetro).

As secreções cervicais líquidas (cristalinas ou cristalinas/estriadas) facilitam a entrada e a progressão dos espermatozoides através do canal cervical (McKusick *et al.*, 1998 e El-Shahat e Alsafy, 2009). No presente trabalho, a taxa de fertilidade foi superior entre as ovelhas que apresentaram secreções cervicais viscosas (estriadas ou estriadas/caseosas) do que entre aquelas que revelaram secreções cervicais líquidas (cristalinas ou cristalinas/estriadas) (Líquidas: 80,0% vs. Viscosas: 93,8%) ($\chi^2 = 5,9$; $P \leq 0,05$) (Quadro VIII). O muco cervical dos tipos cristalino e estriado está associado à presença de folículos antrais de grande tamanho (Fonseca *et al.*, 2017). A maioria das ovulações ocorre quando a secreção de muco cervical é estriado/caseoso, os pequenos ruminantes a redução no diâmetro dos folículos

pré-ovulatórios precede, normalmente, a sua ruptura (ovulação) (Fonseca *et al.*, 2017). Os resultados registados no presente estudo parecem estar de acordo com as observações de Fonseca *et al.* (2017) em cabras.

2.4.9. Local de Deposição de Sêmen

Na inseminação cervical, a taxa de fertilidade é maior quanto mais profundamente o sêmen for depositado (Candappa e Bartlewski, 2011). De acordo com Kaabi *et al.* (2006) e Anel *et al.* (2006), as raças espanholas com menores taxas de fertilidade (Assaf e Churra) têm um cérvix mais complexo que impede a sua penetração profunda. No presente trabalho o sêmen foi depositado maioritariamente após a 1ª prega (Quadro IX). Este resultado indica uma reduzida penetrabilidade do canal cervical. Esta pode estar associada ao reduzido diâmetro do canal cervical (McKusick *et al.*, 1998, Leethongdee *et al.*, 2007 e Candappa e Bartlewski, 2011), à forma das pregas cervicais (Anel *et al.*, 2006, Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011) e/ou ao seu desalinhamento (Naqvi *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006, Perry *et al.*, 2010, Candappa e Bartlewski, 2011, Moura *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b).

Quadro IX: Local da deposição do sêmen (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Local Deposição do Sêmen	Percentagem	Taxa de Fertilidade
1ª prega	95,2% ^a (60/63)	88,3% ^x (53/60)
2ª prega	4,8% ^b (3/63)	66,7% ^y (2/3)

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

A melhor taxa de fertilidade verificou-se nas IA cervicais pouco profundas (pós-1ª prega) ($\chi^2 = 12,6$; P≤0,001). Resultado contrário foi observado por Conradi *et al.* (2017). Nos estudos de Fornazari (2018) e Fornazari *et al.* (2018) as melhores taxas de fertilidade foram conseguidas igualmente após IA cervical. Dendena (2017) registou as piores taxas de fertilidade nas inseminações cervicais mais profundas. Nesse trabalho as IA vaginais produziram uma taxa de fertilidade igual à conseguida após a ultrapassagem da 1ª prega. Na verdade a inflação ou a lesão da mucosa cervical pode diminuir o diâmetro interior do canal cervical e causar um afluxo anormal de

células de defesa ao seu lúmen (Aisen, 2004a, Candappa e Bartlewski, 2011, Morrell, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b).

2.4.10. Refluxo Vaginal

As ovelhas que produzem refluxo cervical apresentam taxas de fertilidade mais baixas (Candappa e Bartlewski, 2011 e Morrell, 2011). O refluxo cervical deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012, Dendena, 2017 e Fornazari, 2018), particularmente quando este é abundante (Dendena, 2017). De acordo com Langford e Marcus (1982), Santolaria *et al.* (2011), Cseh *et al.* (2012) e Mehr *et al.* (2013), a inseminação cervical de uma pequena (0,25 ml) mas concentrada dose de sémen (200×10^6 espermatozóides) é a mais apropriada para contornar os problemas associados a um cérvix difícil de ultrapassar e reduzir a ocorrência de refluxo cervical. No presente trabalho a percentagem de ovelhas que apresentou refluxo cervical foi estatisticamente igual à das ovelhas que não o fizeram ($\chi^2 = 2,8$; $P > 0,05$) (Quadro X). No estudo realizado por Dendena (2017), a maioria das ovelhas Churras Bragançanas não fez refluxo cervical. O mesmo resultado foi observado por Conradi *et al.* (2017), em ovelhas Lacaune, Fornazari (2018), em ovelhas Awassi x Sarda e Fornazari *et al.* (2018), em ovelhas Assaf.

Quadro X: Refluxo cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Refluxo Seminal	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Sem	55,6% ^a (35/63)	85,7% ^x (30/35)
Ligeiro	44,4% ^b (28/63)	82,1% ^x (23/28)

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

A taxa de fertilidade não foi significativamente influenciada pela ocorrência ou não de refluxo cervical ($\chi^2 = 0,6$; $P > 0,05$). Segundo Dendena (2017) as taxas de fertilidade são superiores quando não existe refluxo ou particularmente quando este é ligeiro. No mesmo sentido Fornazari (2018) registou a melhor taxa de fertilidade entre as ovelhas que apresentaram um refluxo vaginal ligeiro. O contrário foi encontrado por Fornazari *et al.* (2018). Por seu turno, Conradi *et al.* (2017) não conseguiram estabelecer qualquer

relação estatisticamente significativa entre a taxa de fertilidade e o refluxo cervical.

2.4.11. Inseminador

Na inseminação artificial, a taxa de fertilidade pode variar em função do inseminador (Gordon, 1997, Donovan *et al.*, 2004 e Anel *et al.*, 2005). A ultrapassagem do canal cervical depende muito da aptidão do inseminador (Eppleston e Maxwell, 1993, Santolaria *et al.*, 2011 e Dendena, 2017). No presente trabalho a taxa de sucesso do inseminador A foi estatisticamente igual à do inseminador B (A: 84,4% vs. B: 90,0%) ($\chi^2 = 1,5$; $P > 0,05$), o que revela a experiência e a qualidade técnica de ambos. O mesmo foi observado por Conradi *et al.* (2017). Pelo contrário, Dendena (2017) identificou diferenças de fertilidade associadas ao inseminador.

3. CONCLUSÕES

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

- Na primeira quinzena de Abril, todas as ovelhas Churras Bragançanas estavam cíclicas.
- Todas as ovelhas responderam ao tratamento FGA + eCG, independentemente de terem sido previamente tratadas ou não com melatonina exógena.
- Quarenta e um dias após a inseminação artificial, 84,1% das ovelhas Churras Bragançanas estavam gestantes.
- A taxa de fertilidade foi significativamente influenciada pelo carneiro dador de sémen (Carneiro 220: 91,7% vs. Carneiro 224: 78,5%), pelo tipo de Os externo, pela viscosidade das secreções cervicais (Líquidas: 81,3% vs. Viscosas: 93,3%) e pelo local de deposição do sémen (1ª prega: 88,3% vs. 2ª prega: 66,7%).
- A taxa de fertilidade não foi significativamente alterada pela administração prévia de melatonina (Controlo: 86,5% vs. Melatonina: 84,0%), pelo método de preservação do sémen (Fresco: 80,6% vs. Refrigerado: 87,5%), pelo tipo de diluidor (INRA 96[®]: 90,9% vs. OviXcell[®]: 83,3%), pela cor (Rosa: 100%) e pelo grau de lubrificação (Reduzida: 83,3% vs. Boa: 87,2% vs. Abundante: 88,9%) da mucosa vaginal, pelo refluxo cervical (Sem: 85,7% vs. Ligeiro: 82,1%) ou pelo inseminador (A: 84,4% vs. B: 90,0%).

III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, J.A., Arrébola, F., Macías, A., Laviña, A., González-Casquet, O., Benítez, F. e Palacios, C., 2016. Temperature and rainfall are related to fertility rate after spring artificial insemination in small ruminants. *International Journal of Biometeorology*, **60**, 1603-1609.
- Abecia, J.A., Forcada, F. e González-Bulnes, A., 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **27** (1), 67-79.
- Abecia, J.A., Forcada, F. e González-Bulnes, A., 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130** (3), 173-179.
- Abecia, J.A., Máñez, J., Macias, A., Laviña, A. e Palacios, C., 2017. Climate zone influences the effect of temperature on the day of artificial insemination on fertility in two Iberian sheep breeds. *Journal of Animal Behavior Biometeorology*, **5**, 124-131.
- ACOB, 2017. Folheto da ovelha Churra Galega Bragançana. Redovicrapa, Associação Nacional de Criadores de ovinos da raça Churra Galega Bragançana, Bragança, Portugal, 2 p. <http://www.acob.org.pt/index.php/folhetos/29-folheto-ovelha-churra-galega-bragancana>
- Adams, T.E. e Boime, I., 2008. The expanding role of recombinant gonadotropins in assisted reproduction. *Reproduction of Domestic Animals*, **43** (Suppl 2), 186-192.
- Afonso, F.M.T., 2015. Antecipação da Estação Reprodutiva em Ovelhas da Raça Churra Galega Bragança. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Aisen, E.G. e Venturino, A., 2004. Recolección e evaluación del semen. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 5, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Aisen, E.G., 2004a. Procesamiento y conservación del material seminal. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 6, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..

- Aisen, E.G., 2004b. Inseminación artificial de ovejas y cabras. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 8, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Aisen, E.G., 2008. Reprodução ovina e caprina. MedVet, São Paulo, Brasil, 203 pp..
- Amidi, F., Pazhohan, Maryam, A., Nashtaei, S., Khodarahmian, M. e Nekoonam, S., 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: A review. *Cell Tissue Bank*, **17**, 745-756.
- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E. e de Paz., P., 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, **41** (Suppl. 2), 30-42.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., de la Fuente, L.F. e de Paz., P., 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay. *Theriogenology*, **63**, 1235-1247.
- Aral, F., Temamoğullari, F. e Aral, S.S., 2011. Mechanical and pharmacologic applications of artificial insemination in ewes. *In: Veterinary medicine and science*. M. Manafi (Ed), Cap 14, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J.V., Arrebola, F.A. e Perez-Marín, C.C., 2017. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, **181**, 175-185.
- 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., Valentim, R.C. e Correia, T.M., 2006. Controlo hormonal da actividade ovárica em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, **2** (6), 4-8.
- Banday, M.N., Lone, F.A., Rasool, F., Rashid, M. e Shikari, A., 2017. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*, **74**, 25-30.
- Barbosa, R.T. e Machado, R., 2008. Panorama da inseminação artificial em

bovinos. Documentos 84 (INFOTECA-E), Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brasil, 28 pp..

Baril, G., Chemineau, P., Cognié, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P. e Vallet, J.-C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. *In: Étude FAO Production et Santé Animales*, Roma, Itália, 193 pp..

Barrett, D.M.W., Bartlewski, P.M., Batista-Arteaga, M., Symington, A. e Rawlings, N.C., 2004. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, **61** (2), p. 311-327.

Bartlewski, P.M., Alexander, B.D. e King, W.A., 2008. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. *Small Ruminant Research*, **75**, 210-216.

Bartlewski, P.M., Baby, T.E. e Giffin, J.L., 2011. Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, **124**, 259-268.

Bartlewski, P.M., Beard, A.P. e Rawlings, N.C., 1999. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, **52**, 115-130.

Bernardini, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Fornés, M.W., Alberio, R.H. e Cesari, A., 2011. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*, **76**, 436-447.

Bettencourt, E.M.V., 1999. Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 106 pp.. (*Tese de Mestrado*)

Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Silva Maia, M.S., Sousa, D.B. e Rodello, L., 2005. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, **33** (Supl 1), 127-130.

Bromfield, J.J., 2016. A role for seminal plasma in modulating pregnancy outcomes in domestic species. *Reproduction*, **152**, R223-R232.

- Bucak, M.N., Sariözkan, S., Tuncer, P.B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksiz, R. e Çevik, M., 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, **89**, 24-30.
- Buckrell, B.C., Halbert, G.W., Gartley, C.J. e Bretzlaff, K.N., 1991. Artificial insemination of small ruminants. *Theriogenology*, **10**, 87-91.
- Bukar, M.M., Yusoff, R., Haron, A.W., Dhaliwal, G.K., Khan, M.A.G e Omar, M.A., 2012. Estrus response and follicular development in Boer does synchronized with flugestone acetate and PGF_{2α} or their combination with eCG or FSH. *Tropical Animal Health Production*, **44**, 1505-1511.
- Campbell, J.A., Harvey, T.G., McDonald, M.F. e Sparksman, R.I., 1996. Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, **45**, 1535-1544.
- Candappa, I.B.R. e Bartlewski, P.M., 2011. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, **3**, 162-175.
- Castilho, C., Almeida, M.F. de, Costa, M.Z., Cesare, A.G. de e Filho, L.R.A.G., 2013. Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas. *Ciência Animal Brasileira*, **14** (1), 91-97.
- Cebrián, J.A.P., Muiño, M.T.B., Pérez, R.P. e Casao, A.G., 2010a. Obtención del semen. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Cebrián, J.A.P., Muiño, M.T.B., Pérez, R.P. e Casao, A.G., 2010b. Manejo e conservación del semen. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Chemineau P. 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrus cycles in anovulatory goats: A review. *Livestock Production Science*, **17**, 135-147.
- Chemineau, P., Berthelot, X., Malpoux, B., Guérin, Y., Guillaume, D. e Pelletier, J., 1993. La maitrisé de la reproduction par la photopériode et la

mélatonine chez les mammifères d'élevage. *Cashiers Agricultures*, **2**, 81-92.

Chemineau, P., Malpoux, B., GužRin, Y., Maurice, F., Daveau, A. e Pelletier, J., 1992. Lumière et mélatonine pour la maitrisé de la reproduction des ovins et des caprins. *Annales de Zootechnie*, **41**, 247-261.

Chemineau, P., Malpoux, B., Pelletier, J., Lebouf, B., Delgadillo, J.A., Deletang, F., Pobel, T. e Brice, G., 2006. Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maitriser la reproduction saisonnières chez les ovins et les caprin. *INRAProduction Animales*, **9** (1), 45-60.

Clark, I.J., Thomas, G.B., Yao, B. e Cummins, J.T., 1987. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology*, **46**, 82-88.

Conradi, A., Correia, T., Mateus, Ó., Quintas, H., Maurício, R., Francisco, L., Fornazari, R., Pereira, F., Álvaro, A. e Valentim, R., 2017. Controlo reprodutivo e inseminação artificial com sémen refrigerado em ovelhas da raça Lacaune. *In: II Congresso Nacional de Escolas Superiores Agrárias, Escola Superior Agrária de Elvas, Elvas, Portugal*, 227-228.

Contreras-Solis, I., Gomez-Brunet, A., Encinas, T., Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J. e Lopez-Sebastian, A., 2008. Influence of vehicle on kinetics of exogenous progesterone administered either by subcutaneous and intramuscular routes to sheep. *Research in Veterinary Science*, **85** (1), 162-165.

Correia, T., Azevedo, J., Mendonça, A., Fontes, P., Galvão, L., Cardoso, M., Velasco, H., Maurício, R. e Valentim, R., 2010a. Effects of PGF_{2α} administration at the onset or the end of a short-term progestagen treatment in Serrana goats. *Reproduction in Domestic Animals*, **45** (Suppl 3), 83.

Correia, T., Azevedo, J., Mendonça, A., Fontes, P., Velasco, H., Maurício, R., Cardoso, M. e Valentim, R., 2010b. Utilización de diferentes tratamientos con el efecto macho en la interrupción del anestro estacional en ovejas de la raza Churra Galega Bragançana. *In: XXV Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Valladolid, Espanha*, 203-206.

- Correia, T., Azevedo, J., Mendonça, A., Fontes, P., Velasco, H., Simões, J., Maurício, R., Cardoso, M., Barbosa, L. e Valentim, R., 2011. Interrupção do anestro sazonal em ovelhas da Raça Churra Galega Bragançana. *In: Actas do V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 160.
- Correia, T., Azevedo, J., Mendonça, A., Maurício, R., Cardoso, M., Velasco, H., Quintas, H., Fontes, P., Simões, J., Barbosa, L. e Valentim, R., 2012. Hormonal control of the breeding activity in Churra Galega Bragançana ewes. *In: XXVII Congresso Mundial de Buiatria*, 307-308.
- Correia, T.M.M.A.A., 1996. Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana. Centre International de Hautes Études Agronomiques Méditerranéennes, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, Saragoça, Espanha, 84 pp..
- Correia, T.M.M.A.A., 1996. Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra da Terra Quente. Tese de Mestrado em Ciência Animal, Instituto Agronómico Mediterráneo de Saragoça, Saragoça, Espanha, 84 pp..
- 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*)
- Cseh, S., Faigl, V. e Amiridis, G.S., 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**, 187-192.
- Curry, M., Redding, B. e Watson, P., 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa, *Cryobiology*, **32**, 175-181.
- 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*)
- Dias, F.E.F., Lopes Júnior, E.S., Villaroel, A.B.S., Rondina, D., Lima-Verde, J.B., Paula, N.R.O. e Freitas, V.J.F., 2001. Sincronização do estro,

indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslançadas após tratamento hormonal com gonadotropina coriônica eqüina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **53** (5), 618-623.

- Dixon, A.B., Knights, M., Pate, J.L., Lewis, P.E. e Inskeep, E.K., 2006. Reproductive performance of ewes after 5-days treatment with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of Prostaglandin F_{2α}. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**, 142-148.
- Domínguez, M.P. Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A. e Alberio, R.H., 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, **69**, 564-573.
- Donovan A, Hanrahan, J.P., Kummen, E., Duffy, P. e Boland, M.P., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, **84** (3-4), 359-368.
- Donovan, A., Hanrahan, J.P., Lally, T., Boland, M.P., Lonergan, G.P. e O'Neil, D.J., 2001. AI for sheep using frozen-thawed semen. ARMIS 4047 Project Report, Under the Research Stimulus Fund; OPARDF Measure 5b.
- Downey, B.R., 1980. Regulation of the estrous cycle in domestic animals: A review. *Canadian Veterinary Journal*, **21**, 301-306.
- Driancourt, M.A., 2012. Chronogest CR and Folligon. http://www.merck-animal-health.com/binaries/Chronogest_and_Folligon-tcm50-262063.ppt
- Driancourt, M.A., Fry, R.C., Clarke, I.J. e Cahill, L.P., 1987. Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, **79**, 635-641.
- 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. *Revue Scientifique et Technique del International Office of Epizootics*, **16** (1), 215-225.
- Ehling, C., Wirth, P., Schindler, L., Hadelers, K.-G., Döpke, H.-H., Lemme, E., Herrmann, D. e Niemann, H., 2003. Laparoscopical intrauterine

insemination with different doses of fresh, conserved, and frozen-thawed semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*, **60**, 777-787.

El-Shahat, K.H.M. e Alsafy A.M., 2009. The anatomical structures of sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating catheter into the uterine lumen. *Veterinary Medicine Journal of Giza*, **57** (2), 211-222.

Eppleston, J. e Maxwell, W.C.M., 1993. Recent attempts to improve the fertility of frozen ram semen inseminated into the cervix. *Wool Sheep Breed*, **41**, 291-302.

Esmailzadeh, A.K., Dayani, O. e Mokhtari, M.S., 2009. Lambing season and fertility of fat-tailed ewes under an extensive production system are associated with liveweight and body condition around mating. *Animal Production Science*, **49** (12), 1086–1092.

Evans, A.C., 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*, **78**, 289-306.

Evans, G. e Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth, Sydney, Austrália, 194 pp..

Evans, G. e Robinson, T.J., 1980. The control of fertility in sheep: Endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season. *The Journal of Agricultural Science*, **94** (1), 69-88.

Faigl, V., Vass, N., Jávör, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G. e Cseh, S., 2012. Artificial insemination of small ruminants – A review. *Acta Veterinaria Hungarica*, **60** (1), 115-129.

Fernandes, S.M.G., 2008. Antecipação da estação reprodutiva em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Inseminação artificial. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 29 pp.. (*Tese de Mestrado*)

Fernandez-Abella, D., Becu-Villalobo S.D., Lacau-Mengido, I.M., Villegas, N. e Bentancur, O., 1999. Sperm production, testicular size, serum gonadotrophins and testosterone levels in Merino and Corriedale breeds. *Reproduction Nutrition Development*, **39** (5-6), 617-624.

- Fernandez-Abella, D., Preve, M.O. e Villegas, N., 2003. Insemination time and diluting rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. *Theriogenology*, **60**, 21-26.
- Ferra, J.C e Sereno, J.R.B., 2006. Inseminação artificial em ovinos. EMBRAPA Cerrados, Planaltina, Goiás, Brasil, 26 pp..
- Fonseca, J.F. da, Cruz, R.C., Pinto P. H.N. e Facó, O., 2010. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. *In: I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia, BA-UDESC, Ilhéus, Bahia, Brasil, 1-30.*
- Fonseca, J.F., 2005. Estratégias para o controlo do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, Brasil, 1-9.*
- Fonseca, J.F., Souza-Fabjanb, J.M.G., Oliveira, M.E.F., Cruzd, R.C., Esteves, L.V., Matos de Paiva, M.P.S.L., Brandão, F.Z. e Mancio, A.B., 2017. Evaluation of cervical mucus and reproductive efficiency of seasonally anovular dairy goats after short-term progestagen-based estrous induction protocols with different gonadotropins. *Reproductive Biology*, **17** (4), 363-369.
- Forcada, F., 2010. Control de la actividad reproductiva mediante el tratamiento con melatonina. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..*
- Forcada, F., Abecia, J.A. e Zuñiga, O., 2001. Efecto de la melatonina sobre la secreción de progesterona in vivo y el desarrollo embrionario *in vitro*. *Producción Ovina y Caprina*, **XXVI**, 1010-1015.
- Fornazari, R., 2018. Controlo reprodutivo e inseminação artificial com sémen fresco e refrigerado em ovelhas Awassi x Sarda em Maio. Efeitos da administração de melatonina exógena, de tratamentos progestagénicos curtos, de diluidores seminais e de técnicas de preservação do sémen. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 89 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Fornazari, R., Mateus, Ó., Correia, T., Quintas, H., Maurício, R., Conradi, A., Francisco, L., Álvaro, A. e Valentim, R., 2018. Estrus synchronization and artificial insemination with fresh and chilled semen in Assaf ewes.

Agricultural Sciences, **9** (1), 8-22.

- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S.M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., Abedi, P., Nili, N., Rahmani, H.R. e Nasr-Esfahani, M.H., 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, **73**, 480-487.
- Freitas, V.J.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..
- García, J.E.Y., 2002. Catálogo de raças autóctones de Castela e Leão (Espanha) – Região Norte de Portugal. II. Espécies ovina, caprina, porcina, cães de gado e galinhas. Fundação Rei Afonso Henriques, Salamanca, Espanha, 378 pp..
- Gergátz, E. e Gyökér, E., 1997. Cervico-uterinal insemination method with cooled and deep frozen ram semen. *In: 48th Annual Meeting of EAAP, Book of Abstract*, Vienna, Áustria, 319-325.
- Gonçalves, P.B.D., de Figueiredo, J.R., e Freitas, V.J.F., 2008. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2^a Edição, Editora Roca, São Paulo, Brasil, 408 pp..
- González-Bulnes, A., Vázquez, M.I. e Pallarés, P., 2010. Métodos de control del ciclo sexual. Progestagenos y prostaglandinas. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- 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.

- Greyling, J.P.C. e van der Nest, M., 2000. Synchronization of oestrus in goats: dose effect of progestogen. *Small Ruminants Research*, **36**, 201-207.
- Hafez, E.S.E. e Hafez, B., 2004. Ciclos Reprodutivos. In: Reprodução animal. E.S.E. Hafez e B. Hafez (Eds), 7ª Edição, Editora Manole, Barueri, Brasil, 531 pp..
- Hafez, E.S.E., 1987. Reproductive cycles. In: Reproduction in farm animals. E.S.E. Hafez (Ed), 5ª Edição, Lea & Febiger, Filadélfia, EUA, 649 pp..
- Hall, D.G., Fogarty, N.M. e Gilmour, A.R., 1986. Seasonality of ovulation and estrus and the ram effect in Poll Dorset ewes. *Theriogenology*, **25**, 455.
- Haresign, W., 1993. New techniques for reducing seasonal breeding in males and females. In: 44th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Aarhus, Dinamarca.
- Hill, J.R., Thomson, J.A. e Perkins, N.R., 1998. Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28,447 Merino ewes under commercial conditions: A survey. *Theriogenology*, **49**, 697-709.
- Holtz, W., Sohnrey, B., Gerland, M. e Driancourt, M.-A., 2008. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. *Theriogenology*, **69**, 785-792.
- Hutchinson, J.S.M., 1979. Gonadotrophic hormones. In: The hypothalamo-pituitary control of the ovary. D.F. Horrobin (Ed), Eden Press, Quebec, Canadá, 48-63.
- Iwamura, J., 2008. Avaliação dos protocolos de sincronização de estro em ovelhas, com diferentes tempos de exposição aos progestágenos e distintas doses de eCG. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, 58 pp.. (Dissertação de Pós-graduação)
- Jiménez-Rabadán, P., Morrell, J.M., Johannisson, A., Ramona, M., Garcia-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Alvaro-Garcia, P.J., Perez-Guzman, M.D., Fernandez-Santos, M.R., Garde, J.J. e Soler, A.J., 2012b. Single layer centrifugation (SLC) improve sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtiberica buck semen. *Animal Reproduction Science*, **136**, 47-54.
- Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., del

- Olmo, E., Pérez-Guzmán, M.D., Bisbal, A., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J. e Soler A.J., 2012a. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science*, **132**, 88-95.
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A.J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M.R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M.D. e Garde, J.J., 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **167**, 103-108.
- Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C.A., Boixo, J.C., de Paz, P. e Anel, L., 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*, **66**, 1876-1883.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G. e Brozos, C., 2001. Effect of time of artificial insemination on fertility of progestegen and PMSG treated indigenous Greek ewes, during non-breeding season. *Small Ruminant Research*, **39**, 67-71.
- Karikari, P.K. e Blasu, E.Y., 2009. Influence of nutritional flushing prior to mating on the performance of West African Dwarf goats mated in the rainy season. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8** (7), 1068-1073.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J. e Robinson, J.E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Program in Hormone Research*, **40**, 185-225.
- Konyali, C., Tomas, C., Blanch, E., Gomez, E.A., Graham, J.K. e Mocé, E., 2013. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. *Cryobiology*, **67**, 124-131.
- Kukovics, S., Gyökér, S., Németh, T. e Gergátz, E., 2011. Artificial insemination of sheep – possibilities, realities and techniques at the farm level. *In: Veterinary medicine and science*. M. Manafi (Ed.), Cap 3, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..

- Langford, G.A. & Marcus, G.J., 1982. Influence of sperm number and seminal plasma on fertility of progestagen-treated sheep in confinement. *Journal of Reproduction Fertility*, **65**, 325-329.
- Leão, A.S.M., 2017. Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial de cabras da raça Serrana – Ecótipo Transmontano. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 61 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Leboeuf, B., Restall, B. e Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, **62**, 113-141.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F. e Cesari, A., 2016. Seminal plasma proteins interacting with sperm surfacerevert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal Reproduction Science*, **173**, 35-41.
- Leethongdee, S., Kershaw-Young, C.M., Scaramuzzi, R.J. e Khalid, M., 2010. Intra-cervical application of Misoprostol at estrus alters the content of cervical hyaluronan and the mRNA expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR), luteinizing hormone receptor (LHR) and cyclooxygenase-2 in the ewe. *Theriogenology*, **73**, 1257-1266.
- Leethongdee, S., Khalid, M., Bhatti, A., Ponglowhapan, S., Kershaw, C.M. e Scaramuzzi, R.J., 2007. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, **67**, 767-777.
- Legan, S.J. e Karsch, F.J., 1979. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biology Reproduction*, **20**, 74-85.
- 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.
- Levi-Setti, P.E., Cavagna, M., Baggiani, A., Zannoni, E., Colombo, G.V. e Liprandi, V., 2004. FSH and LH together in ovarian stimulation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **115S**, S34-

S39.

- Leyva, V., Buckrell, B.C. e Walton, J.S., 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestogen. *Theriogenology*, **50**, 395-416.
- Lima, F.R.G., 2010. Pesquisa de novo método de congelação para sêmen de ovinos Santa Inês. Universidade Federal do Ceará/Universidade Federal da Paraíba/Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fortaleza, Brasil, 121 pp.. (*Tese de Doutorado*)
- Lincoln, G.A., 1992. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Animal Reproduction Science*, **28**, 203-217.
- Loureiro, M.F.P., 2003. Indução de estro por implante de melatonina em ovinos da raça Suffolk. Biblioteca da Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 70 pp.. (*Dissertação de Pós-graduação*)
- Lucena, J.A.O., 2010. Inseminação artificial em ovinos. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Brasil, 50 pp.. (*Tese de Doutorado*)
- Maia, M.S., 2010. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. EMPARN, Natal, Brasil, 95 pp..
- Malpoux, B., Viguié, C., Thiéry, J.C. e Chemineau, P., 1996. Contrôle photopériodique de la reproduction. *INRA Production Animales*, **9** (1), 9-23.
- Martemucci, G. e D'Alessandro, A.G., 2010. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGF_{2α} and estradiol benzoate treatments. *Small Ruminant Research*, **91**, 41-47.
- Martemucci, G. e D'Alessandro, A.G., 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF_{2α}, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Animal Reproduction Science*, **123**, 32-39.
- Martin, G.B., Hötzel, M.J., Blache, D., Walkden-Brown, S.W., Blackberry, M.A., Boukhliq, R., Fischer, J.S. e Miller, D.W., 2002. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food

- supply. *Reproduction Fertility Development*, **14**, 165-175.
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Cognié, Y. e Pearce, D.T., 1986. The physiological response of anovulatory ewes to the introduction of rams - A review. *Livestock Production Science*, **15**, 219-247.
- Martinez, M.F., McLeod, B., Tattersfield, G., Smaill, B., Quirke, L.D. e Juengel, J.L., 2015. Successful induction of oestrus, ovulation and pregnancy in adult ewes and ewe lambs out of the breeding season using a GnRH + progesterone oestrus synchronisation protocol. *Animal Reproduction Science*, **155**, 28-35.
- Mascarenhas, R. e Simões, J., 2005. Inseminação artificial em caprinos de raças autóctones. *Ancabra*, **7**, 11-14.
- Mateus, O., Correia, T., Maurício, R., Pereira, F., Quintas, H., Carloto, A., Dendena, M. e Valentim, R., 2016. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. *In: Redovicapra, ACOB/ANCRAS, Bragança/Mirandela, Portugal, 22 p..* [<http://www.acob.org.pt/index.php/artigos-tecnicos/36-maneio-reprodutivo>] ou [<http://www.ancras.pt/artigos-tecnicos/82-maneio-reprodutivo>]; consultados a 13 de Abril de 2017.
- Mateus, O.J.P., 2014. Controlo reprodutivo em ovelhas Awassi x Sarda. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Maurel, M.C., Roy, F., Hervé, V., Bertin, J., Vaiman, D., Crihiu, E. e Guillou, F., 2003. Immune response to equine chorionic gonadotropin used for the induction of ovulation in goats and ewes. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, **31** (9), 766-769.
- McCracken, J.A., Custer, E.E. e Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. *Physiology Review*, **79** (2), 263-323.
- McDonald, L.E., 1991. Veterinaria: Reproducción y endocrinología. 6ª Edição, Mejjico D.F., México, 294-344.
- Menchaca, A., Rubianes, E., 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, **16**, 403-413.
- Milczewski, V., Kozicki, L.E., Luz, S.L.N. e Neves, J.P., 2000. Inseminação

artificial intrauterine e cervical em ovelhas utilizando sémen fresco. *Archives of Veterinary Science*, **5**, 35-39.

- Misztal, T., Romanowicz, K. e Barcikowski, B., 2002. Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. *Animal Reproduction Science*, **69**, 187-198.
- Monteiro, D.O, Mestre, R.B, Pimenta. A e Azevedo, T.J., 2005. A raça Ovina Churra Galega Bragançana. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 22 pp..
- Morello, H.H. e Chemineau, P., 2004. Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor de la hembra. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed), Cap. 2, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Morrell, J.M., 2011. Artificial insemination: Current and future trends. *In: Artificial insemination in farm animals*. M. Manafi (Ed), InTech, Rijeka, Croácia, 300 p..
- Moura, D.S., Lourenço, T.T., Moscardini, M.M., Scott, C., Fonseca, P.O. e Souza, F.F., 2011. Aspectos morfológicos da cervice de ovelhas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **31** (Supl 1), 33-38.
- Murphy, B.D. e Martinuk, S.D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, **12** (1), 27-44.
- Mylne, M.J.A., Hunton, J.R. e Buckrell, B.C., 1997. Artificial Insemination of sheep. *In: Current therapy in large animal theriogenology*. R.S. Youngquist (Ed), Cap 86, Saunders Company, St Louis, EUA, 898 pp..
- Naqvi, S.M.K., Pandey, G.K., Gautam, K.K., Joshi, A., Geethalakshmi, V. e Mittal, J.P., 2005. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Animal Reproduction Science*, **85**, 337-344.
- Neto, B.M.C., 2009. Sincronização da ovulação utilizando hormônio folículo estimulante em substituição a gonadotrofina coriônica em ovelhas Santa Inês. Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil, 49 pp.. (*Dissertação de Pós-graduação*)
- Nunes, J.F., 2002. Inseminação artificial em caprinos. *In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. P.B.D. Gonçalves, J.R. Figueiredo e V.J.F. Freitas

(Eds), Livraria Varela, São Paulo, Brasil, 340 pp..

O'Brein, A., 2002. Flushing the ewe flock: Is it beneficial? *In: Animal Science FactSheets*, Ministério da Agricultura e Alimentação, Ontário, Canadá, 2 pp..

O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Vans, A.C.O. e Lonergan, O., 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, **73**, 541-549.

O'Meara, C.M., Donovan, A., Hanrahan, J.P., Duffy, P., Fair, S., Evans, A.C.O e Lonergan, P., 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*, **67**, 1262-1268.

Oliveira, M.E.F., 2009. Técnicas de inseminação artificial em ovinos e caprinos. http://www.farmpoint.com.br/tecnicas-deinseminacao-artificial-em-ovinos-ecaprinos_noticia_52391_3_30_.aspx

Oliveira, R.P.M. e Oliveira, F.F., 2008. Manipulação do ciclo estral em ovinos, *PUBVET*, **2** (7), 1-29.

Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J. e Volland-Nail, P., 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, **7**, 305-345.

Padilha, R.T., 2007. Indução do estro/ovulação e fertilidade em ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com diferentes dispositivos intravaginais. Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil, 76 pp.. (Tese de Mestrado)

Palacios, C. e Abecia, J.A., 2015. Meteorological variables affect fertility rate after intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: A 7-year study. *International Journal of Biometeorology*, **59**, 585-592.

Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. e Berger, K.A., 2002. Effect of different extenders and storage temperature on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, **57**, 823-836.

- Pereira, G.E. e Rodrigues, A.C., 1952. Boletim Pecuário nº2. Ministério da Economia, Direcção Geral dos Serviços Pecuários, Sociedade Astória Lda., Lisboa, Portugal.
- Pérez, R., López, A., Castrillejo, A., Bielli, A., Laborde, D., Gastel, T., Tagle, T., Queirolo, D., Franco, J., Forsberg, M. e Rodríguez-Martínez, H., 1997. Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **38**, 109-117.
- Pérez-Clariget, R. e Porras, A.A., 2008. Ovinos. *In: Reproducción de animales domésticos*. C. Galina e J. Valencia (Eds), 3ª Edição, Cap 25, Limusa, México D.F., México, 582 pp..
- Perry, K., Haresign, W., Wathes, D.C. e Khalid, M., 2010. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, **74**, 1685–1690.
- Perry, T.C., 1991. Reproduction in domestic animals. 4ª Edição, Los Angeles Academic Press, Los Angeles, EUA, 670 pp..
- Potes, J.A.C., 1989. Ovulações controladas e superovulação em caprinos. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 79 pp.. (*Tese de Doutoramento*)
- Raju, G.A.R., Chavan, R., Deenadayal, M., Gunasheela, D., Gutgutia, R., Haripriya, G., Govindarajan, M., Patel, N.H. e Patki, A.S., 2013. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *Journal of Human Reproduction Science*, **6** (4), 227-234.
- Ribeiro, S.D.A., 1997. Caprinocultura: criação racional de caprinos. Editora Nobel, São Paulo, Brasil, 318 pp..
- Robertson, S.A., 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Research*, **322**, 43-52.
- Romano, J.E., 1996. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal pessaries for estrus synchronization in dairy goats. *Small Ruminant Research*, **22** (3), 219-223.

- Romano, J.E., Alkar, A. e Amstalden, M., 2017. Onset of luteolytic action of exogenous prostaglandin $F_{2\alpha}$ during estrous cycle in goats. *Theriogenology*, **92**, 45-50.
- Romano, J.E., Alkar, A. e Amstalden, M., 2017. Onset of luteolytic action of exogenous prostaglandin $F_{2\alpha}$ during estrous cycle in goats. *Theriogenology*, **92**, 45-50.
- Rosa, H.J.D. e Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, **48** (3), 155-171.
- Rubianes, E., 2000. Control farmacológico del ciclo estral em caprinos y ovinos. *In: Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes*. Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 255-282.
- 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.
- Sadler, R.M.F.S., 1969. The ecology of reproduction in wild and domestic mammals. Methuen & Co Ltd, Londres, RU, 321 pp..
- Safari, J., Kifaro, G.C., Mushi, D.E., Mtenga, L.A., Adnøy T. e Eik, L.O., 2012. Influence of flushing and season of kidding on reproductive characteristics of Small East African goats (does) and growth performance of their kids in a semi-arid area of Tanzania. *African Journal of Agricultural Research*, **7** (35), 4948-4955.
- Salama, A.A.K., Caja, G., Hamzaoui, S., Badaoui, B., Castro-Costa, A., Façanha, D.A.E., Guilhermino, M.M. e Bozzi, R., 2014. Different levels of response to heat stress in dairy goats. *Small Ruminant Research*, **121**, 73-79.
- Salamon, S. e Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 77-111.
- Salamonsen, L.A., Jonas, H.A., Burger, H.G., Buckmaster, J.M., Chamley, W.A., Cumming, I.A., Findlay, J.K. e Goding, J.R., 1973. A heterologous radioimmunoassay for Follicle-stimulating Hormone: application to measurement of FSH in the ovine estrous cycle and in several other species including man. *Endocrinology*, **93**, 610-618.

- Salmon, V.M., Castonguay, F., Demers-Caron, V., Leclerc, P. e Bailey, J.L., 2017. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*, **177**, 1-11.
- Sánchez, A., Serrano, M.A., Deletang, F., Martin, S. e Martino, A., 2003. Resultados reproductivos con implantes de melatonina en ovejas cruce Merino/Fleischaff en la Coop ALANSER. Interpretación de curvas de partos. *Producción Ovina y Caprina*, **XXVIII**, 212-214.
- Santander, L., Salinas, M.S., Martin, S. e Martino, A., 2003. Índices reproductivos obtenidos utilizando el método de sincronización con esponjas vaginales e inducción con implantes de melatonina en raza Rasa Aragonesa. *Producción Ovina y Caprina*, **XXVIII**, 215-217.
- Santolaria, P., Palacin, I. e Yaniz, J., 2011. Management factors affecting fertility in sheep. *In: Veterinary medicine and science*. M. Manafi (Ed.), Cap 11, InTech, Rijeka, Croacia, 312 pp..
- Santolaria, P., Yániz, J., Fantova, E., Vicente-Fiel, S. e Palacín, I., 2014. Climate factors affecting fertility after cervical insemination during the first months of the breeding season in Rasa Aragonesa ewes. *International Journal of Biometeorology*, **58**, 1651-1655.
- Santos-Neto, P.C. dos, García-Pintos, C., Pinczak, A. e Menchaca, A., 2015. Fertility obtained with different progestogen intravaginal devices using short-term protocol for fixed-time artificial insemination (FTAI) in sheep. *Livestock Science*, **182**, 125-128.
- Sayre, B.L. e Lewis, G.S., 1996. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, **45**, 1523-1533.
- Scaramuzzi, R.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. *Reproduction Nutrition Development*, **46** (4), 339-354.
- Sebastian Lopez, A., 1989. Estacionalidad de la reproducción. *Ovis*, **1**, 59-73.

- Seifi-Jamadi, A., Ahmad, E., Ansari, M. e Hamid Kohram, 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*, **75**, 15-20.
- Senger, P.L., 2011. Pathways to pregnancy and parturition. 2ª Edição, Current Conceptions Inc, Washington, EUA, 373 pp..
- Shabankareh, H.K., Seyedhashemi, S.B., Torki, M., Kelidari, H. e Abdolmohammadi, A., 2012. Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG-superovulated Sanjabi ewes. *Tropical Animal Health Production*, **44**, 1865-1871.
- Sicherle, C.C., 2005. Fisiologia da ovulação e controle ovulatório em ovelhas. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil, 21 pp.. (*Dissertação de Pós-graduação*)
- Sieme, H., Oldenhof, H. e Wolkers, W.F., 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, **169**, 2-5.
- Silva, S.V. e Guerra, M.M.P., 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **35** (4), 370-384.
- Silva, T.P. D., Torreão, J.N. da C., Marques, C.A.T., Araújo, M.J. de, Bezerra, L.R., Dhanasekaran, K.D. e Sejian, V., 2016. Effect of multiple stress factors (thermal, nutritional and pregnancy type) on adaptive capability of native ewes under semi-arid environment. *Journal of Thermal Biology*, **59**, 39-46.
- Silvia, W.J. e Raw, R.E., 1993. Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F_{2α} from the ovine uterus by ovarian steroids. *Journal of Reproduction and Fertility*, **98** (2), 341-347.
- Simonetti, L., 2008. Simplificación de los métodos de superovulación en ovejas de la raza Corriedale. Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Valência, Espanha, 230 pp.. (*Tese de Doutorado*)

- Siqueira, A.P., Fonseca, J.F., Silva Filho, J.M., Bruschi, J.H., Viana, J.H.M., Palhares, M.S., Bruschi, M.C.M. e Peixoto, M.P., 2009. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **61** (2), 299-305.
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- Snoeck, P.P.N., Moura, L.C.O., Silva, M.C., Machado-Neves, M., Melo, M.I.V., Heneine, L.G.D. e Henry, M. 2017. Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation. *Cryobiology*, **75**, 88-90.
- 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.
- Teixeira, A., 2011. Novos produtos cárneos de ovinos e caprinos. *In: Evolução recente dos sistemas de produção de pequenos ruminantes no sul de Portugal*. Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia, Pólo da Mitra da Universidade de Évora, Évora, Portugal, 1 p.
- Theodosiadou, E. Amiridis, G.S. e Tsiligianni, T., 2014. Relationship between electrical resistance of cervical mucus and ovarian steroid concentration at the time of artificial insemination in ewes. *Reproductive Biology*, **14**, 234-237.
- Thiéry, J.-C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M. e Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, **23**, 87-100.
- Tsakmakidis, I.A., 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, **92**, 126-130.
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., e 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. e Correia, T., 2014. Caracterização reproductiva 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., 2015a. Maneio reproductivo em ovinos e caprinos. 4. Controlo da atividade reproductiva em pequenos ruminantes – métodos naturais. *Agrotec, 17, 19-23.*

Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., 2015b. Maneio reproductivo em ovinos e caprinos. 5. Controlo da atividade reproductiva em pequenos ruminantes – métodos hormonais. *Agrotec, 18, 25-28.*

Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., 2016a. Maneio reproductivo em ovinos e caprinos. 6. Controlo da atividade reproductiva em pequenos ruminantes – *Flushing* alimentar. *Agrotec, 20, 12-15.*

Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., 2016b. Maneio reproductivo 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., 2006a. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. *Albêitar Portuguesa, 2 (6), 18-22.*

Valentim, R.C. Correia, T.M. e Azevedo, J.M., 2006b. Controlo hormonal da actividade ovárica em ovinos. *Albêitar Portuguesa, 2 (6), 4-8.*

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.. (*Tese de Doutoramento*)

- Valentim, R.C., Azevedo, J., Correia, T.M., Almeida, J.C., Fontes, P., Galvão, L., Maurício, R. e Mendonça, A., 2004. Tratamiento de interrupción del anoestro estacional en ovejas Suffolk. XXIX Jornadas Científicas y VIII Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Lérida, Espanha, **XXIX**, 170-172.
- Venâncio, D., 2012. Diferentes tratamentos de antecipação da estação reprodutiva em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 34 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- 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. *Animal Production Science*, **51**, 565-569.
- Watson, P., 1992. Semen technology. *In*: Curso Superior de Reproducción Animal, Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, Saragoça, Espanha, 25 pp.. (*Documento Interno*)
- Watson, P., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction, Fertility and Development*, **7**, 871-891.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60/61**, 481-492.
- Wildeus, S., 2000. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Journal of Animal Science*, **77**, 1-14.
- Yotov, S.A., Velislavova, D.V. e Dimova, L.R., 2016. Pregnancy rate in Bulgarian White milk goats with natural and synchronized estrus after artificial insemination by frozen semen during breeding season. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5** (2), 144-147.