

**CONTROLO REPRODUTIVO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL CERVICAL COM SÉMEN
REFRIGERADO EM CABRAS DAS RAÇAS SERRANA, ECÓTIPO TRANSMONTANO,
E PRETA DE MONTESINHO.**

Efeitos da raça e da lavagem do sémen.

Ana Júlia Alves Siqueira

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

Orientado por

Ramiro Corujeira Valentim

Daiane Moreira Silva

Bragança

2023

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, Nossa Senhora e todos aqueles que se fazem parte Dele, minha mãe Érica, meu pai Claudinei, minha irmã Maria Helena, aos meus padrinhos Geny, José Braz e Tatiane que sempre me apoiaram nesta aventura e nunca descreditaram de mim.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Daiane Moreira Silva, do Instituto Federal de Ciência, Tecnologia e Educação do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) – Brasil e Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim, do Instituto Politécnico de Bragança (IPB) - Portugal, por todo carinho, paciência, dedicação e apoio, sendo essencial na minha trajetória acadêmica. Sou eternamente grata por toda atenção e por sempre acreditarem em minha capacidade.

Ao IFSULDEMINAS e IPB, pela oportunidade de realizar o processo de dupla diplomação, sem esse apoio, nada disso seria possível.

Aos funcionários da Quinta Santa Apolónia e do Pinheiro Manso e a técnica de laboratório, Liliana Santos, por toda ajuda e paciência na execução das atividades realizadas com os animais.

Aos meus amigos que estiveram do meu lado nesta jornada, sempre me incentivando, vocês foram um presente que a faculdade me deu, em especial, à Isabela Leon, à Maria Laura Rivani, ao André Luis, à Luara Figueiredo, à Victória Ferreira, à Érika Rizzo e ao Guilherme Borges.

A todos os professores que nos doam o impagável, o conhecimento.

A todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As características do sémen depende de fatores genéticos, individuais, ambientais e comportamentais. As técnicas de recolha, de preservação e de inseminação artificial (IA) influenciam a taxa de fertilidade pós-IA. Nos caprinos, a preservação do sémen apresenta uma dificuldade extra relativamente à preservação de sémen de outras espécies de interesse zootécnico. O seu plasma contém enzimas que interagem com os diluidores seminais à base de gema de ovo e de leite desnatado e que podem prejudicar a integridade da membrana plasmática, a mobilidade e a viabilidade dos espermatozóides, ou seja, que podem afetar negativamente a taxa de fertilidade pós-IA. Neste sentido, vários autores sugerem que o sémen dos bodes deve ser lavado (remoção do plasma seminal) antes deste ser refrigerado ou congelado.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar os efeitos da raça (Serrana vs. Preta de Montesinho) e da lavagem do sémen (cabras Pretas de Montesinho) sobre a taxa de fertilidade pós-IA cervical com sémen refrigerado. Ele foi realizado em Bragança (Portugal), nas Quintas de Santa Apolónia e do Pinheiro Manso, entre 3 de abril e 8 de junho de 2023. Para o efeito foram utilizadas 26 cabras da raça Serranas, ecótipo transmuntano, e 35 cabras da raça Preta de Montesinho, respetivamente, com idades entre 2-9 e 1-6 anos. Como dadores de sémen foram utilizados 4 bodes, 2 Serranos, ecótipo transmuntano, e 2 Pretos de Montesinho. Foram avaliados os efeitos do estado fisiológico inicial das cabras (cíclicas ou anéstricas), da resposta ao tratamento de controlo reprodutivo, das características seminais e do efeito da lavagem do sémen sobre a taxa de fertilidade pós-IA com sémen refrigerado.

Na primeira quinzena de abril todas as cabras Serranas e Pretas de Montesinho estavam cíclicas. Todas elas responderam ao tratamento de controlo reprodutivo. A qualidade do sémen dos bodes Serranos afetou a taxa de fertilidade. O mesmo não sucedeu com o sémen dos bodes Pretos de Montesinho. Quarenta e um dias pós-IA, 88,5% das cabras Serranas e 85,7% das cabras Pretas de Montesinho estavam gestantes. A raça não condicionou a taxa de fertilidade. Na raça Preta de Montesinho, a lavagem do sémen pré-refrigeração não influenciou a taxa de fertilidade.

Palavras chaves: Cabras, Serranas, Pretas de Montesinho, Sémen, Lavagem, taxa de Fertilidade.

ABSTRACT

Semen characteristics depend on genetic, individual, environmental and behavior factors. Semen collection, preservation and artificial insemination (AI) techniques influence the post-AI fertility rate. In goats, semen preservation presents an additional difficulty compared to other farm species' semen preservation. Its seminal plasma contains enzymes that interact with seminal extenders based on egg yolk and skimmed milk, harming membrane integrity and sperm motility and viability and reducing fertility rate. Consequently, several researchers suggest that buck semen should be washed (removal of the seminal plasma) previous to cooling or freezing.

The main goal of this work was to study the effects of breeds (Serrana vs. Preta de Montesinho) and semen washing (Preta de Montesinho) on the fertility rate post-cervical AI with cooled semen. It was conducted in Braganza (Portugal) between April 3 and June 8, 2023, using 26 Serrana, ecotype Transmontano, and 35 Pretas de Montesinho goats, aging between 2-9 and 1-6 years, respectively. Two bucks of each breed were used as semen donors. The effects of the initial physiological state (cycling or non-cycling), the response to reproductive control treatment, the semen characteristics and the semen washing on the fertility rate post-AI with cooled semen were evaluated.

In the first fortnight of April, all Serrana and Preta de Montesinho goats were cycling. All of them responded to the reproductive control treatment. Semen characteristics affected the fertility rate of the Serrana but not the Preta de Montesinho goats. Forty-one days post-AI, 88.5% of the Serrana and 85.7% of the Preta de Montesinho goats were pregnant. Breeds had no effect on the fertility rate. In the Preta de Montesinho breed, semen washing had no effect on the fertility rate.

Keywords: Goats, Serrana, Preta de Montesinho, Semen, Washing, Fertility rate.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Quadros	vii
Lista de Siglas e Abreviaturas	viii
I – Revisão Bibliográfica.....	1
1. Introdução.....	1
2. Sémen.....	1
2.1. Espermatozóides	2
2.2. Plasma Seminal	3
3. Particularidades da Preservação do Sémen de Caprino	4
3.1. Remoção do Plasma Seminal	6
4. Métodos de Preservação do Sémen de Caprino	7
4.1. Sémen Fresco	8
4.2. Sémen Refrigerado.....	8
4.3. Sémen Congelado.....	12
II – Trabalho Experimental	17
1. Material e Métodos.....	17
1.1. Animais.....	17
1.2. Avaliação da Atividade Ovária	17
1.2.1. Avaliação da Ciclicidade Pré-tratamento Hormonal	18
1.2.2. Avaliação da Resposta Ovária ao Tratamento Hormonal.....	18
1.3. Tratamento Aplicado.....	18
1.4. Recolha de Sémen	19
1.5. Análises Seminais	19

1.6. Doses Seminais.....	20
1.6.1. Bodes Serranos.....	20
1.6.2. Bodes Pretos de Montesinho	20
1.7. Inseminação Artificial a Tempo Fixo	21
1.8. Posição das Cabras Durante a Inseminação Artificial	21
1.9. Diagnóstico de Gestação	21
1.10. Análises Estatísticas.....	22
2. Resultados	23
2.1. Estado Fisiológico Inicial.....	23
2.2. Resposta ao Tratamento hormonal	23
2.3. Características Seminais.....	23
2.4. Taxa de Fertilidade Pós-inseminação Artificial	24
3. Discussão	26
4. Conclusões.....	31
III – Referências Bibliográficas.....	32

Índice de Figuras

Figura 1 – Cascata de lesões membranares desencadeada pelo choque ao frio em espermatozóides de carneiro armazenados a temperaturas inferiores a 18°C	10
Figura 2 – Lesões estruturais, funcionais e moleculares sofridas pelos espermatozóides de carneiro submetidos a <i>stress</i> osmótico e térmico durante o período de refrigeração a 5-15°C ou a criopreservação	11
Figura 3 – Componentes da membrana celular	14
Figura 4 – Cabras das raças Serrana, ecótipo Transmontano (esquerda), e Preta de Montesinho (direita)	17
Figura 5 – Dispositivo CIDR (esquerda), aplicador de CIDRs (centro) e colocação de um CIDR (direita)	19
Figura 6 – Eletroejaculador eProvac (esquerda) e coleta de um ejaculado (direita).....	19
Figura 7 – Inseminação artificial de uma cabra Serrana, ecótipo Transmontano	21
Figura 8 – Resultados das ecografias de diagnóstico de gestação.....	22

Índice de Quadros

Quadro I – Impactos da redução da temperatura sobre as células espermáticas.....	13
Quadro II – Distribuição percentual das cabras estudadas segundo a idade e a raça.....	23
Quadro III – Características do sémen produzidos pelos bodes dadores de sémen	24
Quadro IV – Taxas de fertilidade conseguidas pós-inseminação artificial cervical tendo em conta a ocorrência de refluxo e sua intensidade	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% – Percentagem

°C – Grau Celsius

ADN – Ácido desoxirribonucleico

c.v. – Coeficiente de variação

CC – Condição corporal

CIDR – *Controlled internal drug release*

CL – Corpo lúteo

eCG – Gonadotropina Coriônica equina

ESA – Escola Superior Agrária

EYCE – Enzima coaguladora da gema do ovo

FGA – Acetato de fluorogestona

g – Grama

IA – Inseminação artificial

IFSULDEMINAS – Instituto Federal de Ciência, Tecnologia e Educação do Sul de Minas Gerais

IPB – Instituto Politécnico de Bragança

K⁺ – Potássio

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MAP – Acetato de medroxiprogesterona

MHz – Megahertz

ml – Mililitro

MMP – Potencial da membrana mitocondrial

Na⁺ – Sódio

ng – Nanograma

P₄ – Progesterona

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

pH – Potencial hidrogeniônico

PM – Preta de Montesinho

PPCN – Fosfocaseinato nativo

r.p.m. – Rotações por minuto

RIA – Radioimunoensaio

ROS – Espécies reativas de oxigénio

SPZ – Espermatozóides

UI – Unidade internacional

χ^2 – Qui quadrado

μ – Micron

μg – Micrograma

I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

A IA é a técnica mais antiga de reprodução assistida (Faigl *et al.*, 2012 e Silva, 2023). Ela foi inicialmente desenvolvida por motivos sanitários (prevenir a difusão de doenças sexual e não sexualmente transmissíveis) (Cseh *et al.*, 2012, Faigl *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2016). Contudo, os criadores depressa se aperceberam que a sua aplicação possibilitava a rápida introdução e difusão de genes melhoradores nos seus efectivos (Ponsart *et al.*, 2004, Granados *et al.*, 2006, Faigl *et al.*, 2012 e Abecia *et al.*, 2017), com grandes vantagens económicas. Esta técnica é mais utilizada nas explorações leiteiras do que nas de carne (Leboeuf *et al.*, 1998 e Faigl *et al.*, 2012), por motivos de manejo e económicos (Valentim *et al.*, 2016).

A técnica de IA consiste na colocação de sémen no tracto genital da fêmea sem a intervenção directa de um macho, ou seja, com recurso a um instrumento (Faigl *et al.*, 2012 e Conradi, 2018), possibilitando a fecundação e a produção de uma cria (Silva, 2023). Nos pequenos ruminantes, a difusão desta técnica vê-se limitada pela anatomia do canal cervical (Kershaw *et al.*, 2005, Konyali *et al.*, 2013, Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016, Snoeck *et al.*, 2017 e Silva, 2023) e pelas dificuldades em criopreservar o sémen diluído (associadas à composição fosfolipídica e proteica das membranas) (Valentim *et al.*, 2016, Banday *et al.*, 2017, Snoeck *et al.*, 2017 e Silva, 2023). No caso dos caprinos, acresce o facto do plasma seminal conter enzimas que podem afetar negativamente a viabilidade espermática (Leboeuf *et al.*, 1998, 2000 e Siqueira, 2006), quando o diluidor é feito à base de gema de ovo ou de leite desnatado (Roca *et al.*, 1997, Leboeuf *et al.*, 1998, 2000, Siqueira, 2006, Zakaria, 2017 e Mocé *et al.*, 2023), de lecitina de soja ou quando possui uma fracção purificada de proteínas micelares do leite (Mocé *et al.*, 2023).

2. SÉMEN

O sémen é uma suspensão celular composta por espermatozóides (SPZ) e plasma seminal (Baril *et al.*, 1993a, Zakaria, 2017 e Yata, 2022). Os SPZ são produzidos nos testículos e o plasma seminal tem origem no epidídimo, ampola, próstata, glândulas vesiculares (que contribuem com o maior volume para o ejaculado dos pequenos ruminantes) e glândulas bulbouretrais (secreções importantes para a qualidade do sémen) (Baril *et al.*, 1993a, Parkinson, 2019 e Yata, 2022).

2.1. ESPERMATOZÓIDES

Os SPZ são células altamente especializadas, que asseguram a transmissão do genoma haplóide do macho ao oócito II (Eddy, 2006 e Zakaria, 2017). Estão revestidos pela membrana plasmática (Eddy, 2006 e Yata, 2022). São pequenas células alongadas, muito móveis e com um comprimento que varia com a espécie (nos bodes, 60-65 μ) (Zakaria, 2017). Têm uma cabeça de forma oval, um pescoço e uma cauda (ou flagelo) (Parkinson, 2019 e Yata, 2022).

Nos caprinos, a cabeça tem uma forma massiva, comprida (8 μ) e larga (4,5-5,0 μ) (Zakaria, 2017). É constituída essencialmente por um núcleo muito denso (com cromatina muito condensada), estruturas cito-esqueléticas, um saco membranoso de dupla camada que cobre 2/3 da sua porção anterior – acrossoma ou saco acrossómico – e uma pequena quantidade de citoplasma (Eddy, 2006, Zakaria, 2017, Parkinson, 2019 e Yata, 2022). O acrossoma é uma vesícula que contém várias enzimas hidrolíticas (Eddy, 2006 e Parkinson, 2019), incluindo a hialuronidase e a acrosina (Parkinson, 2019). Enquanto a porção anterior do acrossoma contém hialuronidase, enzima responsável por digerir o material que une as células de *corona radiata*, a porção posterior contém acrosina, enzima responsável pela lise da zona pelúcida do oócito II (Zakaria, 2017 e Parkinson, 2019) e que participa na ligação da cabeça do SPZ à membrana vitelina (Mao e Yang, 2013 e Parkinson, 2019).

A reação acrossómica, que consiste na fusão das membranas acrossómica externa e plasmática, sob o controlo dos níveis de cálcio intra e extracelulares, conduz à libertação das enzimas acrossómicas, quando os SPZ estão próximo ou entram em contacto com a superfície do oócito II (Eddy, 2006 e Parkinson, 2019). Durante a reação acrossómica, a membrana acrossómica interna permanece relativamente estável (Parkinson, 2019). Quando ela termina, a membrana acrossómica interna permanece intacta (Parkinson, 2019), mantendo a ela ligada algumas enzimas acrossómicas (Ferrer *et al.*, 2012 e Parkinson, 2019).

O pescoço é curto (Zakaria, 2017) e é composto por uma pequena porção de citoplasma (2-3 μ) que contém uma placa basal, o centríolo proximal e 9 fibras densas dispostas em volta de um eixo filamentoso complexo (axonema) (Zakaria, 2017). O axonema inclui 9 pares de túbulos periféricos e um par de túbulos centrais (Zakaria, 2017). O todo está envolto por uma bainha de mitocôndrias (Zakaria, 2017).

A cauda pode ser dividida em três partes: peça intermédia, peça principal e peça final (Eddy, 2006, Zakaria, 2017 e Yata, 2022). A peça intermédia começa no centríolo distal e termina num espessamento da membrana plasmática existente na porção caudal (anel) (Eddy, 2006 e Zakaria, 2017). Ela contém os elementos fibrilares presentes no pescoço e as mitocôndrias estão disposta formando uma bainha em espiral (Zakaria, 2017). A peça intermédia é a porção mais

comprida da cauda (Eddy, 2006 e Zakaria, 2017). Aqui, a bainha mitocondrial é substituída por uma bainha fibrosa (Zakaria, 2017). A peça terminal contém apenas o filamento axial, revestido por uma membrana fina que substitui a bainha fibrosa (Zakaria, 2017).

Tal como nos carneiros, os ejaculados dos bodes são pouco volumosos e muito concentrados (Memon *et al.*, 1986 e Shamsunddin *et al.*, 2000).

2.2. PLASMA SEMINAL

O plasma seminal é um meio extremamente complexo que contém numerosas substâncias (Baril *et al.*, 1993a) – hidratos de carbono, lípidos, proteínas, aminoácidos e outros compostos azotados (Yata, 2022). As principais funções do plasma seminal são o transporte e o metabolismo dos SPZ (Baril *et al.*, 1993a e Yata, 2022). Os seus constituintes desempenham ainda um papel fulcral na manutenção da viabilidade, na resistência dos SPZ ao choque térmico (frio) e na prevenção da sua ativação precoce no trato genital feminino (Rozeboom *et al.*, 2000 e Maxwell *et al.*, 2007 e Ohaneje *et al.*, 2021). Consequentemente, ele aumenta o poder fecundante dos SPZ (Ohaneje *et al.*, 2021). Nos SPZ congelados/descongelados, o plasma seminal aumenta a captação de oxigénio, a motilidade progressiva, reverte danos causados pela criopreservação, ajuda a recuperar algumas proteínas de superfície, ou seja, melhora a sua qualidade (Maxwell *et al.*, 2007, Juyena e Stelletta, 2012 e Ohaneje *et al.*, 2021). Nos SPZ resistentes à congelação/descongelação, ele protege o acrossoma e afeta positivamente o processo de capacitação (Al-Essawe *et al.*, 2018 e Ohaneje *et al.*, 2021). Nos não resistentes, ele favorece a integridade da cromatina e das membranas plasmática e acrossómica (Okazaki *et al.*, 2009 e Ohaneje *et al.*, 2021). Contudo, outros autores afirmam que ele continua a influenciar negativamente a motilidade e a viabilidade destes SPZ (Juyena e Stelletta, 2012 e Ohaneje *et al.*, 2021).

Nas espécies pecuárias, as características seminais (volume, pH, densidade, concentração espermática, motilidade, percentagens de SPZ vivos e normais, concentração de hidratos de carbono e de lípidos, entre outras) variam de forma significativa (Yata, 2022), em função da genética (Corteel, 1973, Baril *et al.*, 1993a, Karagiannidis *et al.*, 2000 e Aguiar *et al.*, 2013), da idade (Manfredi *et al.*, 1998, Furstoss *et al.*, 2008 e Zakaria, 2017), do estado de saúde (Baril *et al.*, 1993a), da alimentação (Baril *et al.*, 1993a, Aguiar *et al.*, 2013 e Itodo *et al.*, 2021), da estação do ano (Baril *et al.*, 1993a, Manfredi *et al.*, 1998, Karagiannidis *et al.*, 2000, Aguiar *et al.*, 2013, Zakaria, 2017 e Mohamed *et al.*, 2023), das condições climáticas (Corteel, 1973, Baril *et al.*, 1993a, Aguiar *et al.*, 2013 e Mohamed *et al.*, 2023), do manejo (Aguiar *et al.*, 2013), de fatores sociais (Baril *et al.*, 1993a), da frequência de recolha das amostras de sémen (Baril *et al.*, 1993a,

Manfredi *et al.*, 1998, Shamsuddin *et al.*, 2000, Furstoss *et al.*, 2008 e Zakaria, 2017) e da manipulação do sémen (Chandler *et al.*, 1988 e Hahn *et al.*, 2019). Quando são recolhidos vários ejaculados por semana, a ejaculação pode corresponder a 40-80% da produção diária de SPZ (Leboeuf *et al.*, 2003a e Zakaria, 2017).

Nos caprinos, o plasma seminal possui várias enzimas, algumas delas com efeitos negativos sobre a sua preservação (Leboeuf *et al.*, 1998, 2000, Siqueira, 2006 e Mocé *et al.*, 2023). Estes efeitos persistem mesmo durante a refrigeração e o processo de congelação (Siqueira, 2006).

3. PARTICULARIDADES DA PRESERVAÇÃO DO SÉMEN DE CAPRINO

A preservação de sémen de caprino comporta uma dificuldade específica que não se encontra noutras espécies de interesse zootécnico (Siqueira, 2006, Sandal *et al.*, 2021 e Liang *et al.*, 2023). O seu plasma seminal tem efeitos deletérios sobre a integridade da membrana plasmática (Ohaneje *et al.*, 2021), a motilidade (Ohaneje *et al.*, 2021) e a viabilidade dos SPZ diluídos em soluções com gema de ovo, leite desnatado e lecitina de soja (Roca *et al.*, 1997, Leboeuf *et al.*, 1998, 2000, Siqueira, 2006, Zakaria, 2017 e Mocé *et al.*, 2023). Nos diluidores à base de gema de ovo, estes efeitos deletérios resultam da ação da enzima coaguladora da gema de ovo (EYCE)/fosfolipase A, segregada nas glândulas bulbouretrais (Ritar e Salamon, 1982, 1991, Leboeuf *et al.*, 2000, Paulenz *et al.*, 2005, Maher, 2012, Daramola, 2017, Zakaria, 2017, Gororo *et al.*, 2019, Ohaneje *et al.*, 2021, Sandal *et al.*, 2021, Morrell *et al.*, 2022, Zou *et al.*, 2022 e Liang *et al.*, 2023). Nos diluidores à base de leite desnatado, os efeitos deletérios estão relacionados com uma enzima – triacilglicerol lípase – presente nas secreções das glândulas bulbouretrais, que interage com os constituintes do leite desnatado e inibe a motilidade espermática (Leboeuf *et al.*, 2000 e Zakaria, 2017). Por outro lado, porque hidrolisa triglicérides residuais presentes no meio, ela produz ácidos gordos que são tóxicos para os SPZ (Morrell *et al.*, 2022).

A gema de ovo é usada como protetor da membrana plasmática dos SPZ, uma vez que contém lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Liang *et al.*, 2023) e lecitinas (Ritar e Salamon, 1982, Brito, 2008, Maher, 2012 e Morrell *et al.*, 2022), que protegem a integridade estrutural desta membrana (Liang *et al.*, 2023). As lecitinas estão igualmente presentes na membrana plasmática (Brito, 2008 e Maher, 2012). Contudo, a fosfolipase A1 presente no plasma seminal catalisa a hidrólise de lecitinas em lisolecitinas, com produção de ácidos gordos livres (Ritar e Salamon, 1982, Leboeuf *et al.*, 2000, Siqueira, 2006, Brito, 2008, Maher, 2012, Zakaria, 2017, Gororo *et al.*, 2019 e Zou *et al.*, 2022). Esta reação altera o pH do meio (Zou *et al.*, 2022),

causando a sua coagulação (Ritar e Salamon, 1982 e Zou *et al.*, 2022), e danifica os SPZ (Zou *et al.*, 2022). Adicionalmente, as lisolecitinas (com efeito detergente sobre os lípidos membranares) e os ácidos gordos livres produzidos são tóxicos para os SPZ (Ritar e Salamon, 1982, Leboeuf *et al.*, 2000, Brito, 2008, Daramola, 2017, Zakaria, 2017 e Gororo *et al.*, 2019). Esta toxicidade depende da raça (Gororo *et al.*, 2019), do indivíduo (Paulenz *et al.*, 2005 e Brito, 2008), da estação do ano (Ritar e Salamon, 1991, Paulenz *et al.*, 2005, Brito, 2008 e Zakaria, 2017), do pH e da quantidade do ejaculado e da origem da gema de ovo (espécie e raça) (Zakaria, 2017). Na estação de anestro, as glândulas bulbouretrais hipertrofiam e aumentam a secreção desta enzima (sob ação dos elevados níveis plasmáticos de prolactina) (Brito, 2008). A atividade da fosfolipase A1 depende da presença de cálcio, do pH, da temperatura, da sua concentração no plasma seminal e da espécie da ave que fornece a gema de ovo usada no diluidor seminal (Brito, 2008). Vários autores recomendam a lavagem do sémen de caprino antes de se proceder à sua criopreservação (Paulenz *et al.*, 2005).

As proteínas presentes no leite desnatado têm propriedades tampão (regulação do pH) e absorvem íões de metais pesados presentes no sémen (Batellier *et al.*, 2001 e Liang *et al.*, 2023). Os seus grupos sulfidril, β -lactoglobulina e fosfocaseinase protegem os SPZ dos seus subprodutos metabólicos (Liang *et al.*, 2023). As micelas de caseína protegem os SPZ dos ataques das espécies reativas de oxigénio (ROS) e mantêm a integridade da membrana plasmática (Bergeron e Manjunath, 2006 e Liang *et al.*, 2023). Mais, na presença do glicerol, estas micelas protegem os SPZ no processo de congelação/descongelação (Choong e Wales, 1963 e Liang *et al.*, 2023). Nos diluidores à base de leite desnatado, a triacilglicerol lípase determina a diminuição da motilidade espermática (Leboeuf *et al.*, 2000 e Zakaria, 2017), a deterioração do movimento dos SPZ (Leboeuf *et al.*, 2000), a rutura do acrossoma (Leboeuf *et al.*, 2000 e Zakaria, 2017) e a morte das células espermáticas (Leboeuf *et al.*, 2000, Maher, 2012 e Zakaria, 2017). Estes efeitos negativos parecem ser mediados pela hidrólise dos triglicéridos presentes no leite, que resultam na libertação de ácidos gordos tóxicos para os SPZ (Leboeuf *et al.*, 1998, 2000, Maher, 2012 e Zakaria, 2017), como o ácido oleico (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a, Siqueira, 2006 e Maher, 2012).

A lecitina extraída da soja pode substituir os fosfolípidos e as lipoproteínas de elevado peso molecular presentes na gema de ovo, reduzindo ou prevenindo os danos causados na membrana plasmática dos SPZ pela diluição, congelação e criopreservação (Layek *et al.*, 2016 e Liang *et al.*, 2023). Ela tem-se revelado um eficiente crioprotetor, dado que baixa o ponto de congelação das membranas espermáticas, substituindo os fosfolípidos membranares (Mehdipour *et al.*, 2016 e Liang *et al.*, 2023). Adicionalmente, a lecitina forma uma membrana

protetora que envolve os SPZ, reduzindo a formação de cristais de gelo e conseqüentemente as lesões membranares (Emamverdi *et al.*, 2013 e Liang *et al.*, 2023).

3.1. REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL

Nos caprinos, a necessidade de se proceder à remoção do plasma seminal, por centrifugação (Leboeuf *et al.*, 2000 e Liang *et al.*, 2023) ou por lavagem do sémen (Zakaria, 2017 e Liang *et al.*, 2023), continua a não ser consensual. Alguns autores recomendam a sua realização antes de se proceder à refrigeração ou à congelação de sémen diluído numa solução com gema de ovo ou leite desnatado (Azerêdo *et al.*, 2001, Roof *et al.*, 2012, Santiago-Moreno *et al.*, 2017, Ohaneje *et al.*, 2021 e Liang *et al.*, 2023), uma vez que ela aumenta a percentagem de células espermáticas vivas, a motilidade e a capacidade fertilizadora dos SPZ (Leboeuf *et al.*, 2000, Siqueira, 2006 e Zakaria, 2017). Daramola (2017) refere que a lavagem do sémen aumenta a percentagem de SPZ que apresentam capacitação e reação acrossómica. Corteel (1974, 1975a) recomendam a remoção do plasma seminal, mesmo que o diluidor seminal não contenha gema de ovo. Leboeuf *et al.* (2003a) afirmam que este procedimento não é necessário à sobrevivência dos SPZ refrigerados a 4°C. Nas cabras Murciana-Granadinas, a IA com sémen lavado, diluído numa solução Tris-gema de ovo e refrigerado a 5°C, não melhora a taxa de sobrevivência dos SPZ (Roca *et al.* 1997).

Nos caprinos, a separação dos SPZ do plasma seminal pode ser feita por centrifugação (Leboeuf *et al.*, 2000 e Liang *et al.*, 2023) ou lavagem do sémen (Zakaria, 2017 e Liang *et al.*, 2023). Os SPZ têm uma densidade que difere da dos leucócitos, das bactérias e dos restos celulares, o que permite a sua separação dos restantes componentes do ejaculado (Morrell, 2006). O plasma seminal fica no topo do gradiente (Morrell, 2006).

O processo de lavagem dos SPZ começa com a diluição do ejaculado numa solução de lavagem (1:5-1:10) (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a). Segue-se a centrifugação da diluição a 600-1.000 g (2.210-2.853 r.p.m.), durante 10-15 minutos (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a), a 20°C (Zakaria, 2017). Duas das soluções fisiológicas de lavagem mais utilizadas são a solução tampão Krebs Ringer fosfato (com ou sem glicose) (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a e Zakaria, 2017) e um diluidor de congelação (leite desnatado, tris ou outro meio) sem glicerol (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a). Leethongdee *et al.* (2021) lavaram o sémen diluindo-o em lactato de Ringer (1:19) e centrifugado-o a 1.500 g, durante 10 minutos.

A eficácia da eliminação do plasma seminal depende da intensidade da lavagem, ou seja, do grau de diluição e do número de centrifugações (Leboeuf *et al.*, 2000). Sob diluições de 1:5 ou 1:10 devem-se fazer duas centrifugações (Leboeuf *et al.*, 2000). Sob diluições de 1:20 pode

ser feita apenas uma centrifugação (Ritar e Salamon, 1982 e Leboeuf *et al.*, 2000). No método desenvolvido por Corteel (Corteel, 1974, 1975a, 1990), depois de lavados, os SPZ são suspensos num diluidor não glicerado (de modo a obter metade da concentração espermática final), antes da solução ser arrefecida dos 30°C até aos 4°C, no período de 1 hora (Leboeuf *et al.*, 2000). De seguida adiciona-se o resto do diluidor contendo 14% de glicerol, atingindo-se uma concentração final de 400-500 x 10⁶ SPZ (concentração final de glicerol de 7%) (Leboeuf *et al.*, 2000). Segue-se um período de 1-3 horas de estabilização a 4°C (Leboeuf *et al.*, 2000).

A lavagem do sémen comporta outras vantagens que não prevenir os efeitos negativos das enzimas presentes no plasma seminal. Depois dela ser feita, a percentagem de células espermáticas móveis e a sua motilidade é superior à observada antes da lavagem (Corteel, 1974, Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a e Morrell, 2006). Os SPZ móveis tendem a deslocar-se no sentido da força centrífuga e a depositar-se mais rapidamente do que os SPZ imóveis (Morrell, 2006). A seleção do tempo e da velocidade de centrifugação é essencial à separação dos SPZ móveis dos imóveis (Morrell, 2006). Também os SPZ imaturos, senis e com lesões no ácido desoxirribonucleico (ADN) tendem a ficar presos na parte superior do gradiente ou nas interfases (Morrell, 2006). Neste sentido, os SPZ presentes no depósito tendem a produzir melhores taxas de fertilidade (Morrell, 2006).

4. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN DE CAPRINO

Os métodos de conservação do sémen fresco, refrigerado ou congelado afetam a sua capacidade fertilizadora (Leboeuf *et al.*, 2000, Dendena, 2017, Zakaria, 2017, Conradi, 2018 e Fornazari, 2018). A diluição e a refrigeração do sémen provocam alterações nas células espermáticas, reduzem a sua motilidade e põem em causa a integridade das membranas dos SPZ (Sieme *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016, Banday *et al.*, 2017, Snoeck *et al.*, 2017 e Bashawat *et al.*, 2021). A congelação/descongelação do sémen de pequenos ruminantes dita uma série de alterações estruturais, bioquímicas e funcionais que reduzem a motilidade (Maxwell e Watson, 1996, Leboeuf *et al.*, 2000, Bucak *et al.*, 2007, Dorado *et al.*, 2007, Bucak *et al.*, 2009, Tuncer *et al.*, 2013 e Zakaria, 2017), a integridade das membranas plasmática e acrossómica (Maxwell e Watson, 1996, Bucak *et al.*, 2007, Dorado *et al.*, 2007, Bucak *et al.*, 2009, Tuncer *et al.*, 2013 e Amidi *et al.*, 2016) e a capacidade fertilizadora dos SPZ (Maxwell e Watson, 1996, Leboeuf *et al.*, 2000, Donovan *et al.*, 2004, Bucak *et al.*, 2007, Dorado *et al.*, 2007, Bucak *et al.*, 2009, Tuncer *et al.*, 2013 e Zakaria, 2017) e aumentam a taxa de mortalidade embrionária (Donovan *et al.*, 2004). Na verdade, estes processos ditam a morte de uma elevada percentagem de SPZ (40-50%). A taxa média de fertilidade ronda os 58% (Olesen, 1993 e Donovan *et al.*, 2004).

4.1. SÉMEN FRESCO

Nos caprinos, a IA com sémen fresco é já uma grande realidade (Batista *et al.*, 2009). Na inseminação com sémen fresco, a sua recolha e a preparação das doses seminais têm de ser feitas próximo do local onde estão alojadas as fêmeas, uma vez que esta tem de ser feita no menor intervalo de tempo possível (≈ 1 hora) (Dendena, 2017). Na verdade, esta forma de conservação dos SPZ torna-os rapidamente inviáveis (Donovan *et al.*, 2004, Paulenz *et al.*, 2005 e Dendena, 2017). Na verdade, a sua motilidade e viabilidade diminuem rapidamente (O'Hara *et al.*, 2010).

O sémen fresco pode ser utilizado puro ou diluído (Dendena, 2017 e Leão, 2017). Na inseminação vaginal, o volume da dose seminal deve variar entre 0,3-0,5 ml (Macías *et al.*, 2020) e conter 300-400 x 10⁶ SPZ (Nutti, 2007 e Macías *et al.*, 2020). Na inseminação cervical, o volume da dose seminal deve ter em conta o volume interno do cérvix e o volume mínimo de sémen que deve ser inseminado (Salamon e Maxwell, 2000).

Nos caprinos, a IA cervical com sémen fresco continua a ser considerada a melhor escolha (Csech *et al.*, 2012). As taxas de fertilidade conseguidas variam entre os 60-80% (Paulenz *et al.*, 2005, Batista *et al.*, 2009 e Francisco, 2018). A todavia, nos trabalhos realizados por Leão (2017) e Francisco (2018), a taxa de fertilidade pós-IA com sémen refrigerado foi igual à conseguida com sémen fresco.

4.2. SÉMEN REFRIGERADO

Nas cabras, a IA com sémen refrigerado é bastante comum (Leboeuf *et al.*, 2008, Sadeghi *et al.*, 2020 e Mocé *et al.*, 2023). Em França, ela é normalmente realizada fora da estação reprodutiva, com sémen diluído recolhido no máximo 24 horas antes (Leboeuf *et al.*, 2008). Relativamente à IA com sémen fresco, a IA com sémen refrigerado é mais cara (maiores custos de produção) (Priskas *et al.*, 2019). Por outro lado, ela comporta algumas dificuldades técnicas. Mesmo quando são aplicados os melhores protocolos de refrigeração, os SPZ deterioram-se e a sua viabilidade e capacidade fertilizadora diminuem com o tempo (Mocé *et al.*, 2023). Durante o armazenamento, a motilidade dos SPZ baixa e as alterações estruturais e a apoptose das células espermáticas aumentam (Mocé *et al.*, 2023).

Através da refrigeração do sémen procura-se reduzir o metabolismo energético dos SPZ (Morrell, 2011, Silva e Guerra, 2011, Valentim *et al.*, 2016, Francisco, 2018 e Sadeghi *et al.*, 2020), estendendo a sua viabilidade e mantendo o seu potencial fertilizador (Morrell, 2011, Daramola *et al.*, 2015, Ledesma *et al.*, 2016, Valentim *et al.*, 2016, Leão, 2017, Salmon *et al.*, 2017, Francisco, 2018 e Sadeghi *et al.*, 2020). Este último é conseguido prolongando a função, a

ultra-estrutura e as propriedades bioquímicas dos SPZ (Rizkallah *et al.*, 2022). A refrigeração do sémen estende ainda o período fértil dos SPZ inibindo o crescimento bacteriano (Morrell, 2011 e Moucé *et al.*, 2023). As bactérias presentes no sémen, aproveitando os nutrientes presentes no diluidor seminal, multiplicam-se (competindo com os SPZ) (Morrell, 2011) e libertam subprodutos metabólicos que criam um ambiente desfavorável à sobrevivência dos SPZ (Morrell, 2011 e Meena *et al.*, 2017). Mais, a morte das bactérias conduz à libertação de endotoxinas deletérias para os SPZ (Morrell, 2011).

O sémen dos mamíferos é muito sensível ao processo de arrefecimento (Medeiros *et al.*, 2002 e Moucé *et al.*, 2023) e armazenamento a baixas temperaturas (Moucé *et al.*, 2023). A redução da temperatura do sémen induz o choque térmico (Medeiros *et al.*, 2002 e Dendena, 2017). Nos SPZ, o choque térmico está normalmente associado ao *stress* oxidativo e à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), produzidas pelos SPZ mortos ou a partir de oxigénio molecular presente no meio (Bucak *et al.*, 2009 e Tuncer *et al.*, 2013). O *stress* oxidativo é uma condição celular geralmente caracterizada pelo desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante da célula (Bucak *et al.*, 2009 e Tuncer *et al.*, 2013). Sempre que a produção de ROS excede a capacidade do sistema antioxidante celular, os organelos sofrem importantes danos oxidativos, que afetam os lípidos, as proteínas e o ADN (Bucak *et al.*, 2009 e Tuncer *et al.*, 2013).

Durante o processo de refrigeração do sémen, o *stress* oxidativo reduz a qualidade dos SPZ (Figura 1) (Bucak *et al.*, 2007 e Daramola *et al.*, 2015). Na verdade, à medida que o sémen é arrefecido, a integridade das membranas e a motilidade dos SPZ diminui, o que conduz a uma redução do seu tempo de sobrevivência no trato genital feminino e do seu poder fertilizador e ao aumento das perdas embrionárias (Medeiros *et al.*, 2002, Tuncer *et al.*, 2013, Fang *et al.*, 2015 e Rizkallah *et al.*, 2022). No sentido de se adaptarem ao meio envolvente, as membranas dos SPZ sofrem uma transição termotrópica natural que envolve a redistribuição dos seus componentes (Drobnis *et al.*, 1993, Medeiros *et al.*, 2002 e Rizkallah *et al.*, 2022). Os fosfolípidos passam de uma fase líquida-cristalina para gelatinosa, tornando-se a estrutura das membranas mais rígidas (Medeiros *et al.*, 2002). Os diferentes fosfolípidos membranares mudam de fase a temperaturas específicas, originando uma migração lateral, com rearranjo dos componentes membranares e lípidos em diferentes fases dentro do plano da membrana (Medeiros *et al.*, 2002). A migração lateral pode criar micro-domínios sem lípidos na bicamada da membrana e modificar o ambiente proteico envolvente (Medeiros *et al.*, 2002). Esta transição ocorre naturalmente durante a capacitação ou como defesa face ao abaixamento da temperatura (White, 1993, Gillan *et al.*, 2004 e Rizkallah *et al.*, 2022). Quando a redução da temperatura não é feita corretamente, ela induz o desenvolvimento de fases termotrópicas precoces, que

conduzem a lesões nas membranas – reconfiguração proteica e aglutinação lipídica – e que criam zonas irreversivelmente livres de partículas (White, 1993 e Rizkallah *et al.*, 2022).

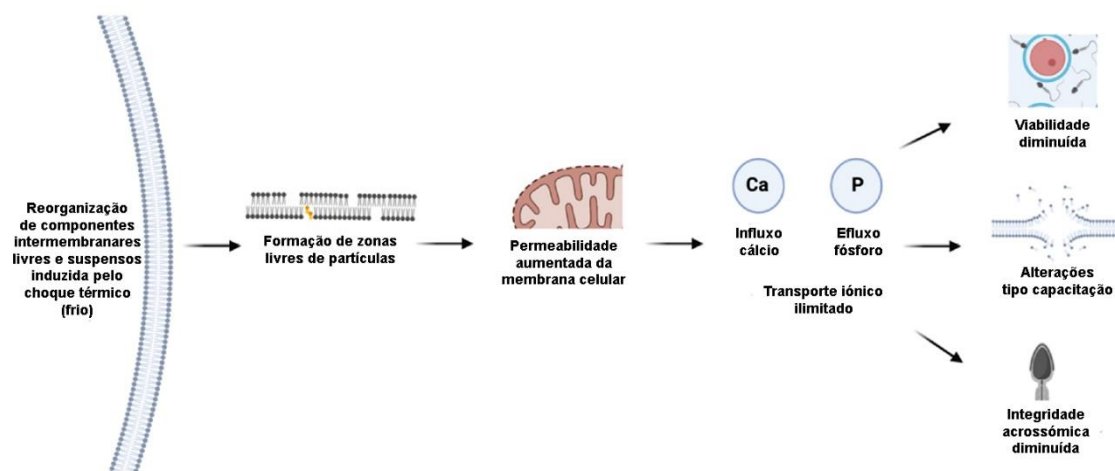


Figura 1 – Cascata de lesões membranares desencadeada pelo choque ao frio em espermatozoides de carneiro armazenados a temperaturas inferiores a 18°C (Rizkallah *et al.*, 2022).

O processo de refrigeração do sêmen pode ainda ter outros efeitos negativos sobre as células espermáticas, nomeadamente na homeostase do sódio (Na^+) (Rauen e de Groot, 2002 e Sadeghi *et al.*, 2020). Assim, por exemplo, a 5°C, a atividade das bombas de Na^+ /potássio (K^+) reduz-se, de que resulta a elevação dos níveis intracelulares de Na^+ (Vishwanath e Shannon, 2000, Murphy *et al.*, 2016 e Sadeghi *et al.*, 2020).

A velocidade de refrigeração do sêmen deve ser moderada e homogênea (Anel *et al.*, 2006, Dendena, 2017 e Francisco, 2018), oscilando entre -0,1°C e -0,5°C/minuto (Aisen, 2004). Outros autores referem que a refrigeração até aos 15°C deve ocorrer ao ritmo de -2,4°C a -3,7°C/minuto e até aos 5°C ao ritmo de -1,8°C a -2,7°C/minuto (Maxwell e Watson, 1996 e Valentim *et al.*, 2009). Contudo, se ela for muito lenta afeta negativamente a capacidade fertilizadora dos SPZ (Medeiros *et al.*, 2002 e Francisco, 2018).

Durante o período de conservação dos SPZ refrigerados, a sua motilidade tende a diminuir, o mesmo sucedendo com a sua capacidade fertilizadora, que se reduz para cerca de metade (Salamon e Maxwell, 2000, Siqueira, 2009, Santolaria *et al.*, 2014 e Sadeghi *et al.*, 2020) (Figura 2). Sadeghi *et al.* (2020) observaram ainda perda progressiva do potencial da membrana mitocondrial (MMP) e da resposta oxidativa. Porém, estes autores não registaram uma diminuição significativa do índice de fragmentação do ADN dos SPZ.

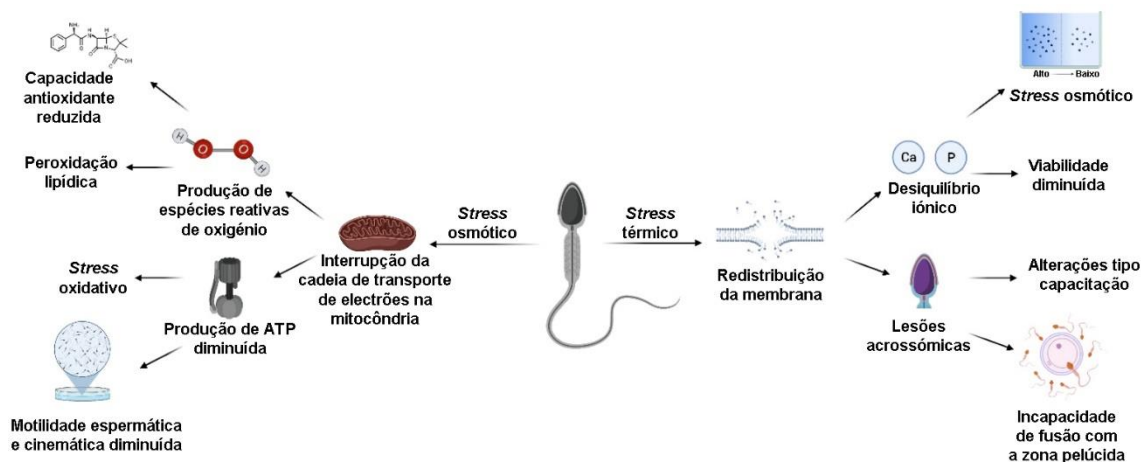


Figura 2 – Lesões estruturais, funcionais e moleculares sofridas pelos espermatozoides de carneiro submetidos a *stress* osmótico e térmico durante o período de refrigeração a 5-15°C ou a criopreservação (Rizkallah *et al.*, 2022).

O sémen de caprino deve ser refrigerado a temperaturas de 2-15°C (Leboeuf *et al.*, 2003b). Geralmente, ele é preservado a 4°C (Luo *et al.*, 2019). Leboeuf *et al.* (2003a) recomendam a sua preservação a 4°C, quando diluído em leite ou em fosfocaseinato nativo (PPCN). O sémen refrigerado a 15°C mantém o seu poder fertilizador durante algumas horas – 6-7 horas (Aisen, 2004 e Gororo *et al.*, 2019). Consequentemente, as cabras a inseminar têm de estar próximo do centro de IA (Gororo *et al.*, 2019). O sémen refrigerado a 4-5°C mantém o seu poder fertilizador até 12-24 horas (Luo *et al.*, 2019) ou 48-72 horas (Bashawat *et al.*, 2021), após o que decresce à medida que o tempo de preservação aumenta (Luo *et al.*, 2019). Ele tornando possível a inseminação de cabras alojadas a alguma distância do centro de inseminação (Morrell, 2011, Leão, 2017, Sadeghi *et al.*, 2020 e Rizkallah *et al.*, 2022). O sémen refrigerado por um período de 10 dias mantém algum poder fertilizador se for inseminado intrauterinamente (Maxwell e Salamon, 1993). De acordo com Nishikawa *et al.* (1961) (citados por El-Battawy, 2019), os SPZ diluídos em solução Neoseminan e armazenados a 4°C mantêm o seu poder fertilizador durante 6 dias. Eppleston *et al.* (1994) verificaram que os SPZ diluídos numa solução Tris-Frutose-ácido cítrico - gema de ovo e armazenados a 5°C mantêm o seu poder fertilizador durante 8 dias.

Nos pequenos ruminantes, a IA cervical com sémen diluído e refrigerado deve ser feita usando palhinhas francesas de 0,25 ml, com 100×10^6 (Sadeghi *et al.*, 2020), 120×10^6 SPZ (Ritar e Ball, 1993), 150×10^6 SPZ (Nutti, 2007), 200×10^6 SPZ (Corteel *et al.*, 1975b, Cseh *et al.*, 2012, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018), 400×10^6 SPZ (Macías *et al.*, 2020) ou 800×10^6 SPZ (Sadeghi *et al.*, 2020). Na IA transcervical, cada dose seminal deve ter um

volume de 0,05-0,1 ml e uma concentração de 60×10^6 SPZ (Nutti, 2007 e Macías *et al.*, 2020). Na IA intrauterina (laparoscopia), o volume da dose seminal deve variar entre 0,05-0,1 ml de e a concentração espermática ser de 20×10^6 SPZ (Macías *et al.*, 2020).

A IA com sémen refrigerado, relativamente ao sémen congelado, apresenta várias vantagens (Sadeghi *et al.*, 2020). Com o intuito de se obterem as melhores taxas de fertilidade, as doses de sémen refrigerado não necessitam de ter um número tão elevado de SPZ como as de sémen congelado (Cseh *et al.*, 2012, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2018). Mais, a longevidade dos SPZ refrigerados é superior à dos SPZ congelados/descongelados (Sadeghi *et al.*, 2020). Neste sentido, as taxas de fertilidade pós-IA com sémen refrigerado tendem a ser mais elevadas do que as conseguidas com sémen congelado (Sadeghi *et al.*, 2020). Por outro lado, o sémen refrigerado é mais fácil de manipular e de transportar (Sadeghi *et al.*, 2020). Consequentemente, os custos são menores quando se trabalha com sémen refrigerado (Sadeghi *et al.*, 2020).

Nos caprinos, as taxas de fertilidade conseguidas pós-IA cervical com sémen refrigerado variam entre os 60-80% (Paulenz *et al.*, 2005, Batista *et al.*, 2009, Francisco, 2018, Silva *et al.*, 2019 e Quintas *et al.*, 2002a,b).

4.3. SÉMEN CONGELADO

Nos mamíferos, a criopreservação dos SPZ é um processo complexo que envolve vários fatores que têm de ser tidos em conta para se obterem resultados satisfatórios (Tuncer *et al.*, 2013). Com ela promove-se a suspensão completamente da função bioquímica dos SPZ (Rizkallah *et al.*, 2022).

Nos caprinos, a criopreservação de sémen é uma técnica comum (Bucak *et al.*, 2009 e Bashawat *et al.*, 2021), embora a sua utilização comercial continue a ser relativamente limitada (Batista *et al.*, 2009) devido às baixas taxas de fertilidade alcançadas (Ohaneje *et al.*, 2021). De facto, a congelação dos SPZ resulta em danos ultraestruturais, funcionais e bioquímicos que aumentam a permeabilidade das membranas, causam hiperoxidação e formação de ROS e promovem danos na bainha de mitocôndrias e na cauda do axonema (Ntemka *et al.*, 2018 e Ohaneje *et al.*, 2021).

Após a ejaculação, os SPZ sofrem uma série de alterações estruturais, bioquímicas, da cromatina e da estrutura das membranas espermáticas (Maxwell e Watson, 1996, Medeiros *et al.*, 2002 e Tuncer *et al.*, 2013), que os preparam para a interação com o oócito II e a fecundação (Maxwell e Watson, 1996). Estas alterações ocorrem naturalmente durante os processos de capacitação e de reação acrossómica (Maxwell e Watson, 1996 e Medeiros *et al.*, 2002). Os

processos de congelação/descongelação promovem alterações semelhantes à da capacitação, o que se traduz no encurtamento da vida fértil dos SPZ (Maxwell e Watson, 1996, Bucak *et al.*, 2007 e Batista *et al.*, 2009), na diminuição da sua capacidade de interação com o trato genital feminino (Maxwell e Watson, 1996) e na redução da sua capacidade fertilizadora (Maxwell e Watson, 1996 e Rather *et al.*, 2016). Consequentemente, na IA cervical, os SPZ congelados/descongelados tendem a apresentar um período de vida fértil reduzido (Batista *et al.*, 2009, Gangwar *et al.*, 2015 e Gororo *et al.*, 2019) e a alcançar o ócito II com uma capacidade fertilizadora diminuída (Quadro I) (Bucak *et al.*, 2007, 2009, Gangwar *et al.*, 2015 e Gororo *et al.*, 2019). Contudo, quando depositados diretamente no útero ou no oviduto, resultam em altas taxas de fertilidade (85-93%) (Maxwell e Watson, 1996 e Purdy *et al.*, 2020).

Quadro I – Impactos da redução da temperatura sobre as células espermáticas (Maher, 2012)

Temperatura (°C)	Impactos
37 a 15	Choque térmico (Bakhach <i>et al.</i> , 2007) Lesões celulares (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
5 a -15	Lesões celulares (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
0 a -25	Alterações mais intensas da membrana (Drobnis <i>et al.</i> , 1993)
0 a -80	Redução da atividade enzimática (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
-15 a -60	Maioria dos danos celulares (Mazur, 1963 e Gao <i>et al.</i> , 1997)
≤ -40 a -130	Suspensão das tocas físico-químicas (Bakhach <i>et al.</i> , 2007)
≤ -130	Conservação celular a longo prazo (Mazur, 1984, Medeiros <i>et al.</i> , 2002 e Bakhach <i>et al.</i> , 2007)

A congelação dos SPZ permite estender temporalmente a sua viabilidade (Daramola *et al.*, 2015 e Meena *et al.*, 2017). À temperatura do azoto líquido (-196°C), as reações metabólicas ficam suspensas (Maher, 2012). A criopreservação do sémen permite preservar o sémen por longos períodos de tempo (Donovan *et al.*, 2004, Nuti, 2007, Maher, 2012, Zanganeh *et al.*, 2013, Daramola *et al.*, 2015, Rather *et al.*, 2016, Meena *et al.*, 2017 e Gororo *et al.*, 2019), ainda que durante a congelação a manutenção do seu poder fertilizador não esteja garantida (Nuti, 2007 e Daramola *et al.*, 2015). Qualquer variação de temperatura, nomeadamente, no manuseamento do sémen pode infligir danos aos SPZ (Maher, 2012). Sempre que a temperatura

subir dos - 130°C, vários tipos de lesões podem ocorrer nos SPZ e a taxa a que estes ocorrem está positivamente correlacionada com a subida da temperatura (Nutti, 2007). Assim, por exemplo, tirar as palhinhas de sémen de dentro do tanque para confirmar o número ou mudá-las de um tanque para outro, diminui o poder fertilizador dos SPZ criopreservados (Nutti, 2007).

O processo de congelação dos SPZ tem efeitos deletérios sobre o ADN, as mitocôndrias e particularmente sobre a estrutura e a função da membrana plasmática (Zanganeh *et al.*, 2013). Uma das características das membranas biológicas é a disposição assimétrica dos fosfolípidos na bicamada (Figura 3) (Bucak *et al.*, 2009). Nos mamíferos, a composição fosfolipídica da membrana plasmática dos SPZ difere da das células somáticas (Bucak *et al.*, 2009). As primeiras possuem mais ácidos gordos polinsaturados do que as segundas (Bucak *et al.*, 2009). A suscetibilidade dos SPZ aos danos da criopreservação depende da espécie animal¹ e está correlacionada com a composição fosfolipídica da membrana espermática (Medeiros *et al.*, 2002 e Bucak *et al.*, 2007), da relação colesterol/fosfolípidos (Medeiros *et al.*, 2002 e Rizkallah *et al.*, 2022), do grau de saturação da cadeia de hidrocarbonetos e da relação entre proteínas e fosfolípidos (Medeiros *et al.*, 2002). As moléculas extras de colesterol intramembranar elevam a estabilidade das membranas (Flesch *et al.*, 2001 e Rizkallah *et al.*, 2022). Durante o processo de arrefecimento, elas limitam o movimento das partículas nas membranas e conseqüentemente reduzem os eventos desestabilizadores das membranas em 30% (Kessel *et al.*, 2001 e Rizkallah *et al.*, 2022).

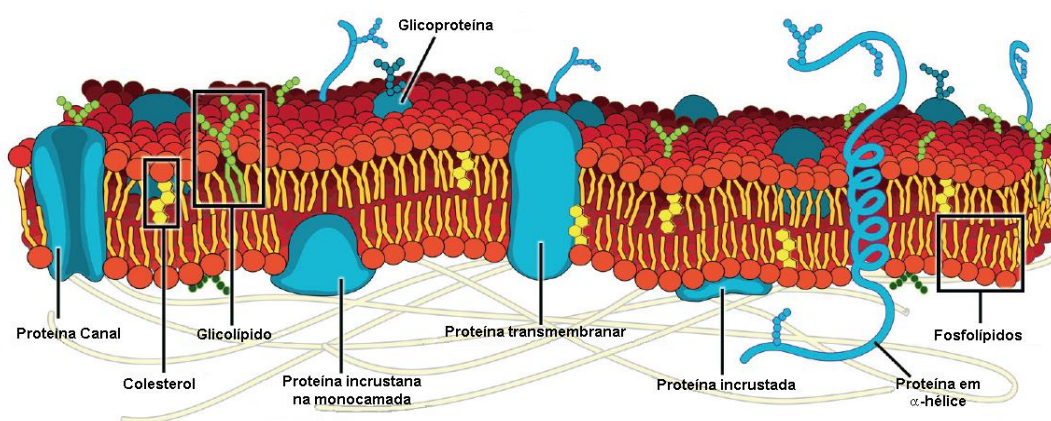


Figura 3 – Componentes da membrana celular (CECIERJ, 2023).

¹ – O sémen de suíno é o mais sensível ao choque térmico (Medeiros *et al.*, 2002). O sémen de bovino, ovino e equino são muito sensíveis (Medeiros *et al.*, 2002). O de canino e felino é algo sensível (Medeiros *et al.*, 2002). O de leporídeo, humano e galo são pouco sensíveis (Medeiros *et al.*, 2002).

As espécies animais que produzam baixos níveis de esteróides e que apresentem elevadas quantidades membranares de ácidos gordos polinsaturados estão mais predispostos a danos peroxidativos (Alberti, 2007, Daramola *et al.*, 2015 e Gangwar *et al.*, 2015). O mesmo sucede quando a relação colesterol/fosfolípidos é baixa (Rizkallah *et al.*, 2022). É o caso dos pequenos ruminantes (Alberti, 2007, Bucak *et al.*, 2007, 2009 e Gangwar *et al.*, 2015). O plasma seminal destes animais possui um sistema antioxidante que contraria os efeitos deletérios das ROS e que parece ser muito importante na proteção dos SPZ (Daramola *et al.*, 2015 e Gangwar *et al.*, 2015). Contudo, a sua capacidade antioxidante é reduzida (Daramola *et al.*, 2015). Os próprios SPZ possuem alguma capacidade antioxidante (de origem citoplasmática), que é, no entanto, muito limitada (Bucak *et al.*, 2007, Zanganeh *et al.*, 2013, Daramola *et al.*, 2015, Fang *et al.*, 2015 e Gangwar *et al.*, 2015). Na verdade, nos últimos estados da espermatogénese, os SPZ perdem muito do seu citoplasma e com ele os antioxidantes que combatem os efeitos nocivos das ROS e da peroxidação lipídica (Bucak *et al.*, 2007). Consequentemente, nos ovinos, estima-se que a congelação/descongelação do sémen (que apresenta uma elevada sensibilidade ao choque térmico), resulta na não sobrevivência de 40-50% (Maxwell e Watson, 1996, Watson, 2000 e Nuti, 2007), até 60% (Rizkallah *et al.*, 2022) ou 70% dos SPZ (Meena *et al.*, 2017).

A congelação expõe as células espermáticas a diferentes situações de *stress* (Maxwell e Watson, 1996 e Dorado *et al.*, 2007), de que resulta a perda da integridade das membranas, o prejuízo da função celular e a redução da motilidade e da capacidade fertilizadora (Bucak *et al.*, 2007, 2009 Tuncer *et al.*, 2013, Gangwar *et al.*, 2015 e Rather *et al.*, 2016). As grandes variações de temperatura alteram a disposição espacial dos constituintes das membranas espermáticas, com implicações na sua permeabilidade (Maxwell e Watson, 1996). Os SPZ têm ainda de enfrentar a formação de cristais de gelo pontiagudos (que provocam ruturas nas membranas espermáticas) e o *stress* osmótico causado pelos elevados gradientes de concentração de solutos no meio diluidor (Medeiros *et al.*, 2002, Rather *et al.*, 2016 e Meena *et al.*, 2017). Por outro lado, a criopreservação altera a atividade enzimática (Meena *et al.*, 2017). Os SPZ que consigam ultrapassar estes problemas têm ainda que ser capazes de superar o *stress* da descongelação (Maxwell e Watson, 1996).

No sémen congelado, a contaminação microbiana determina primeiramente a produção de macrófagos e de granulócitos polimorfonucleares (primeira linha de defesa) (Diemer *et al.*, 1996 e Meena *et al.*, 2017), que induzem um processo inflamatório com efeitos nocivos sobre os SPZ (Diemer *et al.*, 1996). Estas células produzem ainda ROS (Morrell, 2006) e toxinas (Diemer *et al.*, 1996, 2003 e Morrell, 2006). Por outro lado, as bactérias aderem aos SPZ e interferem com a sua motilidade (Diemer *et al.*, 1996, 2003 e Morrell, 2006). Podem inibir a motilidade reagindo diretamente com o SPZ (Diemer *et al.*, 2003) ou o acrossoma (Morrell, 2006) ou

indiretamente via citotoxinas (Diemer *et al.*, 1996, 2003 e Morrell, 2006). Algumas bactérias parecem afetar os SPZ diretamente, através de interações celulares ou de fenômenos de adesão, causando alterações na motilidade espermática e distúrbios na integridade celular e na estrutura molecular destas células (Diemer *et al.*, 2003). Porém, a criopreservação dos SPZ por longos períodos de tempo tem um efeito nocivo sobre a população microbiana existente no sémen (Meena *et al.*, 2017). Nos bovinos, a carga microbiana do sémen diminui com o passar do tempo, ou seja, aumentando o tempo de criopreservação, baixa o número de microrganismos presentes nas doses seminais (Meena *et al.*, 2017).

O número de SPZ que deve estar presente em cada dose seminal depende do poder fertilizador do macho, do inseminador e do momento em que a inseminação é feita, relativamente ao momento da ovulação (Nutti, 2007). A técnica utilizada é igualmente importante (Donovan *et al.*, 2004 e Nutti, 2007). IA cervical com sémen criopreservado devem ser usadas doses seminais com 100×10^6 SPZ (Corteel *et al.*, 1988, Leboeuf *et al.*, 1998, 2000 e Luo *et al.*, 2019), 150×10^6 SPZ (Corteel *et al.*, 1988), 180×10^6 SPZ (Nutti, 2007) ou 200×10^6 SPZ (Corteel *et al.*, 1988 e Paulenz *et al.*, 2007). Na IA transcervical, as doses seminais devem conter 60×10^6 SPZ (Nutti, 2007). Na IA intrauterina (laparoscopia), cada dose seminal deve conter 1×10^6 SPZ (Ritar e Ball, 1993) ou 20×10^6 SPZ (Nutti, 2007).

A taxa de fertilidade pós-IA com sémen congelado/descongelado varia entre 30-70% (Batista *et al.*, 2009). Luo *et al.* (2019) obtiveram taxas de fertilidade de 60-65%. No trabalho realizado por Cortez (2012), 70% das cabras Serranas inseminadas artificialmente com sémen congelado/descongelado estavam gestantes 41 dias pós-IA. Contudo, apenas 30% pariu. Segundo Seifi-Jamadi *et al.* (2017), as taxas de fertilidade pós-IA por laparoscopia com sémen congelado/descongelado são muito elevadas. Podem alcançar os 92,5% (Leethongdee *et al.*, 2021).

II – TRABALHO EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em Bragança, mais precisamente nas Quintas de Santa Apolónia (latitude 41° 79' 83" N, longitude 6° 76' 61" W e altitude 685 metros) e do Pinheiro Manso (Latitude 41° 80' 86" N, Longitude 6° 73' 35" W e altitude 627 metros), pertencente à Escola Superior Agrária (ESA), do IPB, entre 3 de abril e 8 de junho 2023.

As cabras foram alimentadas em pastoreio de prados naturais e suplementadas, em grupo, com feno de prados naturais (*ad libitum*) e 300-350 g/dia/cabra de alimento concentrado comercial. Nos 30 dias seguintes à IA manteve-se o aporte energético/proteico da dieta.

Este ensaio teve início com a determinação da condição corporal (CC), segundo a tabela de classificação de [Villaquiran et al. \(2004\)](#). Foram considerados intervalos de 0,25 pontos.

1.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizadas 26 cabras Serranas e 35 cabras Pretas de Montesinho (Figura 4). As cabras Serranas tinham 2-9 anos de idade e as Pretas de Montesinho 1-6 anos de idade. A última parição tinha ocorrido há, pelo menos, 45 dias.



Figura 4 – Cabras das raças Serrana, ecótipo Transmontano (esquerda), e Preta de Montesinho (direita).

1.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVÁRICA

A atividade ovárica das cabras foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de progesterona (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. Após centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante (plasma sanguíneo), que foi pipetado para tubos de Eppendorf devidamente identificados.

Posteriormente, estes foram congelados numa arca ultracongeladora (-70°C) (Thermo 960®, Electron Cooperation, Marlotta, EUA) até ao momento do seu processamento.

Os níveis plasmáticos de P₄ foram determinados através da técnica de radioimunoensaio (RIA). 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, respetivamente, de 7,4 e 15,7%.

1.2.1. AVALIAÇÃO DA CICLICIDADE PRÉ-TRATAMENTO HORMONAL

Nas duas semanas anteriores (3-13 de abril de 2023) à realização do tratamento curto com P₄ + Gonadotropina Coriónica equina (eCG), com o objetivo de determinar o estado fisiológico das cabras (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 1.2.

Considerou-se que as cabras 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 OVÁRICA AO TRATAMENTO HORMONAL

Com o intuito de identificar a formação do primeiro corpo lúteo (CL) pós-tratamento curto com P₄ + 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 1.2.

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. TRATAMENTO APLICADO

No dia 13 de abril de 2023, as cabras receberam um dispositivo vaginal com 0,35 g de P₄ (*controlled internal drug release*; CIDR®; Zoetis, Portugal) (Figura 5). Na mesma altura foram-lhes administrados intramuscularmente 100 µg de Cloprostenol (Estrumate®, MSD Animal Health, Portugal). O tratamento com P₄ teve a duração de 6 dias.

Quando da remoção dos dispositivos vaginais (19 de abril de 2023), às cabras foram administradas intramuscularmente 300 UI de eCG (Intergonan®, Intervet, Portugal).



Figura 5 – Dispositivo CIDR (esquerda), aplicador de CIDRs (centro) e colocação de um CIDR (direita).

1.4. RECOLHA DE SÉMEN

Os bodes estavam alojados numa instalação separada da das cabras. O sémen foi recolhido com o auxílio de um eletroejaculador – eProvac (Minitube[®], modelo MT, Tiefenbach, Alemanha) (Figura 6). Os 4 bodes (2 Serranos e 2 Pretos de Montesinho) não ejaculavam há 3 dias.



Figura 6 – Eletroejaculador eProvac (esquerda) e coleta de um ejaculado (direita).

Feitas as colheitas dos ejaculados, os tubos colectores foram transportados para laboratório, onde foram mantidos a 37°C, num banho-maria refrigerado (Neslab[®] RTE 221, Newington, EUA). No mesmo equipamento foi previamente conservado o diluidor seminal e a solução de lavagem.

1.5. ANÁLISES SEMINAIS

O volume foi medido através da graduação existente nos tubos colectores. A concentração (SPZ/ml) e a motilidade espermática foram avaliadas com o auxílio do sistema CASA (*computer assisted sperm analysis*) da Minitube (Androvision[®], Minitüb, Tiefenbach, Alemanha), constituído por um microscópio de contraste de fases Carl Zeiss Axioscope 5 (Gottngun, Alemanha), com

placa aquecida (37°C) e uma câmara de vídeo (Basler camera A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha). Nas análises foram usadas lâminas Leja 20 não reutilizáveis com 4 câmaras (Leja Products, B.V., Nieuw-Vennep, Holanda).

1.6. DOSES SEMINAIS

1.6.1. BODES SERRANOS

Antes de se realizarem as análises seminais, os ejaculados foram diluídos (1:1) com um diluidor comercial – INRA 96[®] (IMV, L'Aigle, França). Feitas as análises, o volume de sémen diluído foi acertado com os valores calculados pelo programa Androvision[®] (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). De seguida, a temperatura do sémen diluído foi reduzida, durante cerca de 90 minutos, de 37°C para 15°C (-0,24°C/minuto), com recurso a um banho-maria refrigerado (Neslab[®] RTE 221, Newington, EUA). No final, após 10 minutos de repouso, este foi aspirado para palhinhas francesas de 0,25 ml, que foram seladas com pó polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, 200 x 10⁶ SPZ.

Entre o término do processo de refrigeração e o começo da IA passou cerca de 30 minutos.

1.6.2. BODES PRETOS DE MONTESINHO

Antes de se realizarem as análises seminais, os ejaculados foram diluídos (1:1) com um diluidor comercial – INRA 96[®] (IMV, L'Aigle, França). Feitas as análises, todos os ejaculados foram divididos ao meio. Metade foi lavado e a outra metade não. A lavagem foi feita diluindo o sémen (1:5) em Lactato de Ringer não glicosado (Braun Vet, Barcarena, Portugal) e centrifugando-o (VWR[®] MEGA STAR 1.6R, Allentown, EUA) a 2.853 r.p.m. (1.000 g), durante 15 minutos (Leboeuf *et al.*, 2000, 2003a), a 20°C (Zakaria, 2017). No final, o sobrenadante foi removido e rejeitado. Adicionou-se então a quantidade de diluidor calculado pelo programa Androvision[®] (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). O sémen não lavado foi imediatamente diluído com INRA 96[®], respeitando os valores indicados pelo programa Androvision[®].

Posteriormente, a temperatura do sémen diluído foi reduzida, durante cerca de 90 minutos, de 37°C para 15°C (-0,24°C/minuto), com o auxílio de um banho-maria refrigerado (Neslab[®] RTE 221, Newington, EUA). No final, após 10 minutos de repouso, este foi aspirado para palhinhas francesas de 0,25 ml, que foram seladas com pó polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, 200 x 10⁶ SPZ.

Entre o término do enchimento das palhinhas e o começo da IA passou cerca de 30 minutos.

1.7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL A TEMPO FIXO

Todas as cabras foram inseminadas (21 de abril de 2023), independentemente de terem ou não manifestado cio, 43 + 1 horas depois da administração de eCG. As IA foram realizadas por um inseminador, com o auxílio de um espéculo vagina IMV® (L'Aigle, França) munido de luz LED e pistoletes médios IMV® (L'Aigle, França) para pequenos ruminantes.

As cabras Serranas foram todas inseminadas com sémen não lavado. No que diz respeito às cabras Pretas de Montesinho, 20 foram inseminadas com sémen não lavado e 15 com sémen lavado.

A deposição do sémen foi feita sempre o mais profundamente possível sem, no entanto, forçar a passagem do pistoleta pelo canal cervical, a fim de evitar inflamar ou ferir a mucosa do canal cervical.

1.8. POSIÇÃO DAS CABRAS DURANTE A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação foi feita no estábulo com as cabras em estação (Figura 7). Porém, para facilitar a observação de Os externo e para maior comodidade do inseminador, um ou dois membros da equipa levantavam os membros posteriores das cabras, mantendo, no entanto, os membros anteriores sempre em contacto com o solo.



Figura 7 – Inseminação artificial de uma cabra Serrana, ecótipo Transmontano.

1.9. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Quarenta e um dias após a IA (9 de junho) procedeu-se ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia em tempo real (Figura 8), com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet e de uma sonda rectal multifrequência (5,0-10,0 MHz).

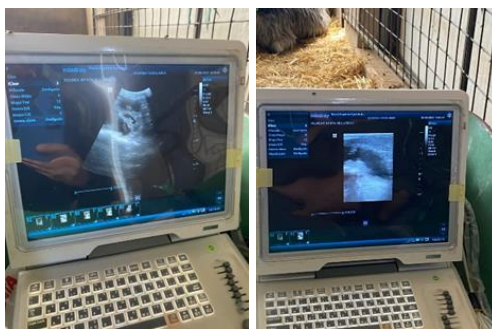


Figura 8 – Resultados das ecografias de diagnóstico de gestação.

1.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No sentido de identificar diferenças estatisticamente significativas entre alguns parâmetros, efetuaram-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 comparar frequências utilizou-se o teste de qui quadrado (χ^2) (Snedecor e Cochran, 1980).

2. RESULTADOS

As cabras Serranas usadas neste trabalho tinham $5,5 \pm 2,5$ anos (c.v. = 45,2%) e as Pretas de Montesinho $3,1 \pm 1,3$ anos de idade (c.v. = 41,1%) (Quadro II). Esta diferença revelou-se significativa ($P \leq 0,001$). A idade média das cabras Pretas de Montesinho inseminadas com sémen não lavado era igual à das inseminadas com sémen lavado (não lavado: 3,0 anos vs. lavado: 3,1 anos; $P > 0,05$).

Quadro II – Distribuição percentual das cabras estudadas segundo a idade e a raça

Idade	Serranas (%) (n)	Pretas Montesinho (%) (n)
< 3 anos	3,8% (1)	34,3% (12)
3-6 anos	61,5% (16)	65,7% (23)
> 6 anos	34,6% (9)	0% (0)

Quando do início deste estudo, as cabras Serranas apresentavam uma CC de $2,7 \pm 0,4$ pontos (c.v. = 14,3%) e as Pretas de Montesinho de $2,9 \pm 0,4$ pontos (c.v. = 14,4%). Esta diferença mostrou-se não significativa ($P > 0,05$). As cabras Pretas de Montesinho inseminadas com sémen não lavado apresentavam uma CC média igual à das cabras inseminadas com sémen lavado (não lavado: 2,9 pontos vs. lavado: 2,8 pontos; $P > 0,05$).

Em ambas as raças, nem a idade, nem a CC afetaram o estado fisiológico pré-tratamento, a resposta ao tratamento hormonal e a taxa de fertilidade pós-IA ($P > 0,05$).

2.1. ESTADO FISIOLÓGICO INICIAL

Na primeira quinzena de abril, todas as cabras Serranas e Pretas de Montesinho apresentaram, em pelo menos uma toma de sangue, níveis plasmáticos de P_4 superiores a 0,5 ng/ml, ou seja, considerou-se que todas elas estavam cíclicas.

2.2. RESPOSTA AO TRATAMENTO HORMONAL

Nos cinco dias pós-administração de eCG, todas as cabras responderam ao tratamento hormonal aplicado, uma vez que apresentaram níveis plasmáticos de P_4 superiores a 0,5 ng/ml.

2.3. CARACTERÍSTICAS SEMINAIS

Os bodes dadores de sémen produziram ejaculados com as características indicadas no Quadro III.

Quadro III – Características do sêmen produzidos pelos bodes dadores de sêmen

Raça	Macho	Volume (ml)	Concentração espermática (SPZ/ml)	Motilidade (%)
Serrana	A	2,8	1.779	81,1
	B	2,5	2.988	87,1
Preta Montesinho	A	2,5	3.328	95,0
	B	1,0	3.865	96,4

A taxa de fertilidade das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, foi influenciada pelas características seminais do bode dador de sêmen (A: 82,4% vs. B: 100%) ($\chi^2 = 19,8$; $P \leq 0,001$). Tal não se verificou nas cabras Pretas de Montesinho (A: 85,7% vs. B: 85,7%) ($\chi^2 = 0,0$; $P > 0,05$).

2.4. TAXA DE FERTILIDADE PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Quarenta e um dias após a IA, 88,5% (n = 23) das cabras Serranas e 85,7% (n = 30) das cabras Pretas de Montesinho estavam gestantes. A diferença entre raças revelou-se não significativa ($P > 0,05$).

A lavagem do sêmen dos bodes Pretos de Montesinho não afetou a taxa de fertilidade (não lavado: 85,7% vs. lavado: 85,7%) ($\chi^2 = 0,0$; $P > 0,05$).

Nas duas raças, a inseminação foi maioritariamente cervical. Nalgumas cabras Serranas, ecótipo Transmontano, ela pôde ser feita uterinamente. A diferença entre raças foi significativa (Serrana: 87,5% vs. Preta de Montesinho: 100%) ($\chi^2 = 12,8$; $P \leq 0,001$).

Das cabras Serranas inseminadas cervicalmente, 29,2% não apresentou refluxo de sêmen, 62,5% produziu um refluxo ligeiro (presença de sêmen em Os externo) e 8,3% um refluxo moderado (ligeira perda de sêmen por Os externo). Nestas cabras, a taxa de fertilidade foi afetada pela ocorrência e pelo tipo de refluxo seminal ($\chi^2 = 58,9$; $P \leq 0,001$). Ainda que o refluxo cervical ligeiro não tenha afetado a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 0,0$; $P > 0,05$) (Quadro IV), o refluxo cervical moderado diminuiu-a ($\chi^2 = 29,8$; $P \leq 0,001$).

Quadro IV – Taxas de fertilidade conseguidas pós-inseminação artificial cervical tendo em conta a ocorrência de refluxo e sua intensidade

Refluxo	Taxa de Fertilidade	
	Serrana	Preta Montesinho
Ausente	85,7% ^a	90,9% ^a
Ligeiro	93,3% ^a	83,3% ^a
Moderado	50,0% ^b	-

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

Nas cabras Pretas de Montesinho, enquanto 31,4% delas não apresentou refluxo de sêmen, as demais 68,6% produziram um refluxo ligeiro. Também nestas cabras, a taxa de

fertilidade não foi condicionada pela ocorrência de refluxo seminal ligeiro ($\chi^2 = 2,8$; $P > 0,05$).

3. DISCUSSÃO

Na zootecnia, a fertilidade é um dos parâmetros com maior impacto económico (Mocé *et al.*, 2022). Na IA, baixas taxas de fertilidade determinam perdas económicas imediatas (custos do tratamento hormonal, das doses seminais e da mão-de-obra) e não imediatas resultantes do aumento do período improdutivo e da redução da produção (Mocé *et al.*, 2022). Neste sentido, é importante conhecer os fatores que condicionam este parâmetro reprodutivo.

Antes de se dar início a um tratamento de controlo reprodutivo é importante conhecer o estado fisiológico das cabras (cíclicas ou anéstricas) (Steyn, 2003 e Błaszczuk *et al.*, 2004), uma vez que este condiciona a resposta ao mesmo (Lunstra e Christenson, 1981, Ritar, 1994, Steyn, 2003, Błaszczuk *et al.*, 2004 e Robertson *et al.*, 2020). Na verdade, esta resposta tende a ser inferior nas cabras em anestro (Lunstra e Christenson, 1981, Ritar, 1994, Steyn, 2003, Hamed, 2010, Joshi *et al.*, 2018 e Robertson *et al.*, 2020). Na estação de anestro, o intervalo entre a remoção das esponjas vaginais e o pico pré-ovulatório de Hormona Luteinizante (LH) é mais variável (Pierson *et al.*, 2001). O mesmo sucede relativamente ao início do cio (Baril e Vallet, 1990). De acordo com Correia *et al.* (2006), Mascaranhas (2006) e Correia *et al.* (2009), no mês de abril, as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, estão em anestro sazonal. Contudo, Correia *et al.* (2006) referem que, nalguns anos, a estação reprodutiva destas cabras começa no mês de abril. Efetivamente, na segunda quinzena do mês de abril, Francisco (2018) observou que 63,6% das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, estavam cíclicas. Por seu turno, Leão (2017) verificou que na primeira quinzena do mês de abril todas as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, estavam cíclicas. Este resultado foi igual ao observado no presente trabalho. É possível que as diferenças encontradas entre trabalhos (cabras Serranas, ecótipo Transmontano) resultem de variações anuais nas condições climáticas que condicionam o crescimento das pastagens naturais (Anel *et al.*, 2005) e os gastos de energia em termorregulação (Salama *et al.*, 2014, Abecia *et al.*, 2016 e McGrath *et al.*, 2018).

No que concerne às cabras Pretas de Montesinho, sabe-se apenas que na segunda quinzena de abril elas estão cíclicas (Francisco, 2018). No presente trabalho, todas as cabras Pretas de Montesinho estavam cíclicas na primeira quinzena de abril.

Nas cabras, a idade pode condicionar o sucesso dos tratamentos de controlo reprodutivo (Sánchez *et al.*, 2018), a taxa de fertilidade (Hamed, 2010, Arrébola *et al.*, 2016, Tekin, 2019, Robertson *et al.*, 2020 e Mocé *et al.*, 2022) e o sucesso da IA (Erasmus *et al.*, 1985, Mellado *et al.*, 2006, Arrebola *et al.*, 2014 e Khanal, 2016). Mocé *et al.* (2022) afirmam que a idade se correlaciona negativamente com a taxa de fertilidade. Contudo, Amnate *et al.* (2016) e Tekin (2019) não conseguiram estabelecer qualquer relação entre a idade e as taxas de fertilidade,

prolificidade e fecundidade. [Francisco \(2018\)](#), trabalhando com cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e Pretas de Montesinho, também não identificou qualquer efeito da idade sobre a taxa de fertilidade. No presente trabalho, a idade das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e Pretas de Montesinho não condicionou a taxa de fertilidade.

De acordo com [Gordon \(1997\)](#), [Mellado et al. \(2006\)](#) e [Robertson et al. \(2020\)](#), a taxa de fertilidade das fêmeas nulíparas é normalmente inferior à das fêmeas múltiparas, porque elas tendem a ovular mais cedo e a apresentar ciclos éstricos mais curtos ([Steyn, 2003](#)). Por outro lado, na IA das cabras nulíparas é mais difícil penetrar no cérvix ([Houdeau et al., 2008](#)). Mais, a estimulação excessiva do trato genital, associada à dilatação vaginal e à tentativa de ultrapassar o cérvix, reduz a taxa de fertilidade, uma vez que aumenta a motilidade uterina ([Houdeau et al., 2008](#)). [Gordon \(1997\)](#) afirma que a subfertilidade das fêmeas primíparas resulta, fundamentalmente, de um aumento da taxa de mortalidade embrionária. Na verdade, a taxa de abortos entre as cabras Zaraibi com 2-6 anos de idade é cerca de metade da das cabras com idades fora deste intervalo (< 2 anos ou > 6 anos) ([Hamed, 2010](#)). [Mellado et al. \(2006\)](#) verificaram que a taxa de fertilidade das cabras que pariram mais de 5 vezes é geralmente inferior à das que pariram 2-5 vezes. Segundo [Hamed \(2010\)](#), a taxa de fertilidade das cabras Zaraibi com 2-6 anos de idade é 1,6 vezes superior à das cabras com menos de 2 anos ou com mais de seis anos de idade. [Bansal et al. \(2022\)](#) não encontraram qualquer relação entre o número de partos e a taxa de fertilidade. Pelo contrário, [Mocé et al. \(2022\)](#) referem que a taxa de fertilidade das cabras Murciana-Granadinas primíparas é 2,4 vezes superior à das cabras com 4 ou mais anos de idade. No presente trabalho, todas as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e 88,6% das Pretas de Montesinho eram múltiparas. A ausência (Serranas) ou o reduzido número (Pretas de Montesinho) de cabras primíparas não terão permitido identificar diferenças significativas na taxa de fertilidade entre elas e as cabras múltiparas.

A CC influencia a percentagem de fêmeas que manifestam cio, a taxa de ovulação ([Sánchez et al., 2018](#)) e a taxa de fertilidade ([Absy et al., 2001](#), [Hamed, 2010](#), [Khanal, 2016](#) e [Robertson et al., 2020](#)). O *deficit* nutricional aumenta a sensibilidade da hipófise anterior à retroação negativa exercida pelo estradiol, prejudicando a libertação de Hormona Libertadora de gonadotropinas (GnRH)/LH ([Sánchez et al., 2018](#)). Relativamente às cabras com uma CC de 3 pontos, as cabras com uma CC inferior a 2 pontos apresentam uma taxa de ovulação até 16% inferior ([Sánchez et al., 2018](#)). Uma CC baixa encurta a estação reprodutiva e aumenta a ocorrência de ciclos curtos ([Rekik et al., 2014](#)). A meio da gestação, a carência de nutrientes não altera a taxa de mortes fetais ([Kelly et al. 1989](#)). Todavia, no final da gestação, a falta de nutrientes aumenta esta mesma taxa ([Robertson et al., 2020](#)), uma vez que nesta altura é mais comum a ocorrência de toxemia da gestação ([Besier et al. 2010](#)). No presente trabalho, a CC das cabras Serranas, ecótipo

Transmontano, e Pretas de Montesinho não afetou a taxa de fertilidade. A maioria das cabras Serranas (88,5%) e Pretas de Montesinho (85,7%) estudadas apresentavam uma CC adequada à actividade reprodutiva – 2,5-3,5 (O’Brein, 2002, Scaramuzzi e Martin, 2008 e Karikari e Blasu, 2009). O mesmo foi observado por Francisco (2018).

Na generalidade dos sistemas de produção animal, a sincronização deaios desempenha um papel central no sucesso da aplicação da técnica de IA (Leboeuf *et al.*, 1998, Andrabi e Mehmood, 2015, Omontese *et al.*, 2016, Hashemi e Safdarian, 2017 e Alvarado-Espino *et al.*, 2019). Nos tratamentos hormonais, a resposta das fêmeas depende da hormona utilizada e do tipo de dispositivo (Romano, 2004, Padilha *et al.*, 2011 e Santos-Neto *et al.*, 2015). Nos caprinos, os dispositivos CIDR são eficazes na sincronização dosaios (Ritar *et al.*, 1990, Romano, 2004, Fleisch *et al.*, 2012, Omontese *et al.*, 2016 e Alvarado-Espino *et al.*, 2019). Os tratamentos de controlo da actividade ovárica podem ser complementados com a administração única de eCG (Ritar *et al.*, 1984, Freitas *et al.*, 1997, Błaszczuk *et al.*, 2004, Omontese *et al.*, 2016 e Alvarado-Espino *et al.*, 2019), de modo a melhorar a sincronização dosaios (Hameed *et al.*, 2020), antecipar os momentos do cio (Baril *et al.*, 1993b e Hameed *et al.*, 2020) e da ovulação (Omontese *et al.*, 2016 e Eşki *et al.*, 2021) e garantir melhores respostas foliculares (Ritar *et al.*, 1984, Leboeuf *et al.*, 1998 e Omontese *et al.*, 2016) e lúteas (Hameed *et al.*, 2020 e Eşki *et al.*, 2021). A sincronização não estreita da actividade ovárica faz variar o intervalo entre a IA e a ovulação, de que resultam oscilações na taxa de fertilidade (Leboeuf *et al.*, 1998). No presente trabalho, todas as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e Pretas de Montesinho responderam ao tratamento hormonal aplicado. No trabalho realizado por Cortez (2012), igualmente com cabras Serranas, ecótipo Transmontano, foram 81,3% as que o fizeram. No levado a cabo por Leão (2017) esta percentagem foi de 94,2%. Por seu turno, Francisco (2018) refere uma taxa de 98,2%. No que concerne às cabras Pretas de Montesinho, este autor verificou uma taxa de resposta à aplicação de um tratamento progestagénico curto + eCG de 100%.

Um dos fatores mensuráveis capazes de afetar a taxa de fertilidade é a qualidade do sémen usado na IA (Broekhuijse *et al.*, 2012 e Mocé *et al.*, 2022). Esta qualidade é medida através de vários parâmetros seminais, sendo os mais comunmente usados a motilidade espermática, a percentagem de SPZ vivos e a percentagem dos SPZ normais. A motilidade espermática é um dos parâmetros seminais mais importantes, uma vez que os SPZ necessitam de se movimentar através do trato genital feminino e de ultrapassar a zona pelúcida do oócito (Graham e Mocé, 2005). As amostras de sémen com baixa motilidade espermática resultam em baixas taxas de fecundação (Yániz *et al.*, 2018). Tendo em conta os resultados obtidos no presente trabalho, a motilidade espermática do sémen dos bodes Serranos não foi responsável pela diferença

observada na taxa de fertilidade ($\chi^2 = 1,3$; $P > 0,05$). Como este foi o único parâmetro qualitativo avaliado não é possível explicar a diferença encontrada.

A raça afeta o sucesso reprodutivo das cabras (Donovan *et al.*, 2004, Mellado *et al.*, 2006, Notter, 2012 e Robertson *et al.*, 2020). Ela condiciona a resposta aos tratamentos de controlo reprodutivo (López-Sebastian *et al.*, 2007, Bukar *et al.*, 2012 e Alvarado-Espino *et al.*, 2019), a taxa ovulatória (Notter, 2012) e a estrutura do cérvix (Donovan *et al.*, 2004). De acordo com Mellado *et al.* (2006), as taxas de fertilidade das cabras leiteiras francesas (Saanen, Toggenburg e Alpina) tendem a ser nove vezes inferiores às das raças Nubiana e Murciana-Granadina. Segundo Donovan *et al.* (2004), o efeito da raça sobre a taxa de fertilidade pode estar associado a diferenças na estrutura do cérvix, que condicionam a profundidade da colocação da dose seminal (Salvador *et al.*, 2005). Quando mais profundamente esta for colocada dentro do cérvix maior tende a ser a taxa de fertilidade (Donovan *et al.*, 2004, Salvador *et al.*, 2005 e Joshi *et al.*, 2018) e mais ainda no útero (Ritar e Salamon, 1983 e Salvador *et al.*, 2005). No presente trabalho, a taxa de fertilidade 41 dias pós-IA não variou em função da raça (Serranas: 88,5% vs. Pretas de Montesinho: 85,7%). Também Francisco (2018) não encontrou qualquer efeito da raça sobre a taxa de fertilidade (Serranas: 66,7% vs. Pretas de Montesinho: 60,0%).

Vários autores recomendam a lavagem do sémen de caprino antes de se proceder à sua refrigeração ou congelação, quando diluído numa solução com gema de ovo ou leite desnatado (Azerêdo *et al.*, 2001, Roof *et al.*, 2012, Santiago-Moreno *et al.*, 2017, Ohaneje *et al.*, 2021 e Liang *et al.*, 2023). Ao que tudo indica, ela melhora a sobrevivência, a motilidade, o desenvolvimento dos SPZ no trato genital feminino e a sua capacidade fertilizadora (Leboeuf *et al.*, 2000, Siqueira, 2006, Daramola, 2017 e Zakaria, 2017). Todavia Roca *et al.* (1997) e Leboeuf *et al.* (2003a) afirmam que este procedimento não é necessário à sobrevivência dos SPZ refrigerados a 4-5°C. No presente trabalho, a lavagem do sémen dos bodes da raça Preta de Montesinho não condicionou a taxa de fertilidade. De acordo com este resultado, o sémen destes bodes pode ser diluído com INRA 96® e ser conservado, a 15°C, por um período de tempo inferior a 3 horas, sem necessitar de ser lavado. O INRA 96® é um diluidor seminal desenvolvido para conservar sémen de equinos, que contém apenas a fração purificada de proteínas micelares do leite, a qual favorece a conservação, a 4°C (condições anaeróbicas) ou a 15°C (condições aeróbicas), e mantém a capacidade fertilizadora do sémen diluído, por um período de até 48 horas (IMV, 2023). Por outro lado, os resultados obtidos mostram que o processo utilizado de lavagem do sémen não reduz a sua capacidade fertilizadora.

Na IA cervical, o refluxo seminal deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012 e Dendena, 2017), particularmente quando este é abundante (Dendena, 2017), porque ele está associado a uma redução da taxa de fertilidade (Candappa e Bartlewski, 2011). O refluxo cervical ligeiro pode ter

várias origens: reduzido volume interior do canal cervical (Cseh *et al.*, 2012), introdução pouco profunda do pistolete (Aisen, 2004, Candappa e Bartlewski, 2011 e Valentim *et al.*, 2016), descarga demasiadamente rápida da dose seminal ou acompanhada da retirada do pistolete (Francisco, 2018). No presente trabalho, apenas nas cabras Serranas, ecótipo Transmontano, foi possível realizar IA uterina. Em ambas as raças estudadas, o refluxo cervical ligeiro não influenciou a taxa de fertilidade, indiciando que a quantidade de sémen diluído que permaneceu no interior do canal cervical foi suficiente para fecundar o(s) oócito(s). Leão (2017) e Francisco (2018) referem que o refluxo cervical ligeiro afetava negativamente a taxa de fertilidade. Desconhece-se o motivo desta diferença.

4. 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 cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e Pretas de Montesinho estavam cíclicas.
- Todas as cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e Pretas de Montesinho responderam ao tratamento hormonal aplicado.
- Na raça Serrana, ecótipo Transmontano, as características do sémen dos bodes dadores afetaram a taxa de fertilidade. Na raça Preta de Montesinho não.
- Quarenta e um dias pós-IA, 88,5% das cabras Serranas, ecótipo Transmontano, e 85,7% das cabras Pretas de Montesinho estavam gestantes.
- A taxa de fertilidade não foi condicionada pela raça.
- Nas cabras Pretas de Montesinho, a taxa de fertilidade não foi modificada pelo processo de lavagem do sémen.
- Em ambas as raças, o refluxo cervical ligeiro não influenciou a taxa de fertilidade. Contudo, na raça Serrana, ecótipo Transmontano, o refluxo cervical moderado determinou uma redução da taxa de fertilidade.

III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Absy, G., Abuzead, S.M.M. e Zeidan, A.E., 2001. Resumption of postpartum ovarian activity in goats as affected by kidding season and body condition score under Egyptian conditions. *Indian Journal of Animal Science*, **71**, 922-926.
- Aguiar, G.V., van Tilburg, M.F., Catunda, A.G.V., Celes, C.K.S., Lima, I.S.C., Campos, A.C.N., Moura, A.A.A. e Araújo, A.A., 2013. Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **65** (1), 6-12.
- Aisen, E.G., 2004. Inseminación artificial de ovejas y cabras. *In: Reproducción ovina y caprina*. E.G. Aisen (Ed.), Cap. 8, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp.
- Alberti, K., 2007. Inovações metodológicas na congelação de sêmen bovino. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil. 136 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Al-Essawe, E.M., Wallgren, M., Wulf, M., Aurich, C., Macías-García, B., Sjunnesson, Y. e Morrell, J.M., 2018. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. *Theriogenology*, **115**, 99-107.
- Alvarado-Espino, A.S., Menchaca, A., Meza-Herrera, C.A., Carrillo-Moreno, D.I., Zúñiga-García, S., Arellano-Rodríguez, F., Mellado, M. e Véliz, F.G., 2019. Ovarian response is not affected by the stage of seasonal anestrus or breed of goats when using a progesterone injection plus human chorionic gonadotropin-based protocol. *Animal Reproduction Science*, **204**, 60-65.
- 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.
- Amnate, A.A., Mohammed, Q.S., Mahdi, Z.M., Mahdi, A.J., Jaffar, H.M., Sammen, M.M. e Hamd, R.A., 2016. A study of some factors affecting fertility, fecundity and twinning rate in local and Cyprus goats. *Al-Anbar Journal of Veterinary Science*, **9** (2), 94-99.
- Andrabi, S.M.H., Anwar, M. e Mehmood, A., 2015. Efficacy of short-term estrus synchronization protocols and timed artificial insemination in subtropical goats. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **25** (1), 298-300.

- Anel, L., Alvarez, M., Martínez-Pastor, F., García-Macias, V., Anel, E. e de Paz., P., 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, **41** (Supl. 2), 30-42.
- Arrébola, F., González, O., Torres, R. e Abecia, J.A., 2014. Artificial insemination in Payoya goats: Factors affecting fertility. *Animal Production Science*, **54**, 356-362.
- Arrébola, F., Sánchez, M., López, M.D., Rodríguez, M., Pardo, B., Palacios, C. e Abécía, J.-A., 2016. Effects of weather and management factors on fertility after artificial insemination in Florida goats: A ten-year study. *Small Ruminant Research*, **137**, 47-52.
- Azerêdo, G.A., Esper, C.R. e Resende, K.T., 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Ruminant Research*, **41**, 257-263.
- 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.
- Bansal, S., Dixit, A., Potdar, V.V., Joshi, S. e Jadhav, R., 2022. Factors affecting conception rate in goats. *Journal of Livestock Science*, **13**, 234-238.
- Baril, G. e Vallet, J.C., 1990. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulate with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. *Theriogenology*, **34**, 303-311.
- 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. Étude FAO Production et Sante Animales, Roma, Itália, 231 p.
- Baril, G., Leboeuf, B. e Saumande, J., 1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, **40** (3), 621-628.
- Bashawat, M., Hensel, B., Müller, K. e Schulze, M., 2021. Cooled storage of semen from livestock animals (Part II): Camelids, goats, and sheep. *Animal Reproduction Science*, **234**, 106855.
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M. e Magistrini, M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, **68** (3-4), 181-190.

- Batista, M., Nino, T., Alamo, D., Castro, N., Santana, M., Gonzalez, F., Cabrera, F. e Gracia, A., 2009. Sucessfull artificial insemination using semen frozen and stored by ultrafreezer in Majorera goat breed. *Theriogenology*, **712**, 1307-1315.
- Bergeron, A. e Manjunath, P., 2006. New insights towards under-standing the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, **73** (10), 1338-1344.
- Besier, B., Jacobsen, C., Woodgate, R. e Bell, K., 2010. Sheep health. *In: International sheep and wool handbook*. D.J. Cottle (Ed.), Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido, 775 p.
- Błaszczyk, B., Udała J. e Gączarzewicz, D., 2004. Changes in estradiol, progesterone, melatonin, prolactin and thyroxine concentrations in blood plasma of goats following induced estrus in and outside the natural breeding season. *Small Ruminant Research*, **51** (3), 209-219.
- Brito, B.G. de M., 2008. Viabilidade do sêmen caprino conservado em três diferentes diluidores: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal. Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 50 p. (*Tese de Mestrado*)
- Broekhuijse, M.L.W.J., Feitsma, H. e Gadella, B.M., 2012. Artificial insemination in pigs: predicting male fertility. *Veterinary Quarterly*, **32**, 151-157.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., Varisli, O., Yuce, A., Tekin, N. e Akcay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, **67**, 1060-1067.
- Bucak, M.N., Sariozkan, S., Tuncer, P.B., Ulutaş, P.A. e Akçadağ, 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research*, **81**, 90-95.
- 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.
- 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.

- CECIERJ, 2023. Membrana e organelas celulares. Fascículo 3, Unidade 8, Consórcio CECIERJ, Fundação CECIERJ, Rio de Janeiro, Brasil 78-112 p. In: <https://canal.cecierj.edu.br/122016/e0b38ca320bb75f3614c6b1108d558ab.pdf> (Consultado a 01/03/2023)
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkison, R.W., Memon, M.A. e Hoyt, P.G., 1988. Semen quality characteristics of daily goats. *Journal of Dairy Science*, **71**, 1638-1646.
- Choong, C.H. e Wales, R.G., 1963. The use of various diluents for deep-freezing bull spermatozoa. *Australian Journal of Biology Science*, **16**, 896-904.
- Conradi, A., 2018. Sincronização da actividade ovárica e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Efeitos da administração de melatonina exógena, de um tratamento progestagénico curto + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação do sémen. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 78 pp. *Mestrado em Tecnologias da Ciência Animal*
- 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.
- Correia, T., Azevedo, J., Simões, J., Galvão, L., Fontes, P., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Maurício, R., Cardoso, M. e Valentim, R., 2009. Aplicación de tratamientos con diferentes duraciones en el control de la actividad ovárica de cabras de raza Serrana. In: 34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 383-386.
- Correia, T., Azevedo, J., Valentim, R., Almeida, J., Galvão, L., Simões, J., Maurício, R., Fontes, P., Mendonça, A. e Medeiros, S., 2006. Administração de diferentes doses de eCG na sincronização de cios de cabras da raça Serrana no início da estação reprodutiva. In: Comunicações da I Reunião Nacional de Caprinocultura, 66-69.
- Corteel, J.-M., 1973. L'insémination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. *World Review of Animal Production*, **9**, 73-99.
- Corteel, J.M., 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma seminal: effet du glucose. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, **14** (4-B), 741-745.
- Corteel, J.M., 1975a. Effet du 'lavage' sur la conservation des spermatozoïdes de bouc a basse température. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, **15**, 525-528.
- Corteel, J.M., 1975b. The use of progestagens to control the oestrus cycles of the dairy goat. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, **15** (2), 353-363.

- Corteel, J.M., 1990. Maitrise de la reproduction chez les caprins à vocation laitière. *In*: 5^{as} Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Saragoça, Espanha, 188-274 p.
- Corteel, J.M., Leboeuf, B. e Baril, G., 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Research*, **1** (1), 19-35.
- 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.
- Cseh, S., Faigl, V. e Amiridis, G.S., 2012. Semen processing and artificial insemination health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**, 187-192.
- Daramola, J.O., 2017. Effect of centrifugation on motility, sperm concentration and acrosome reaction in soy bean and avocado seed milk extenders of cryopreserved goat spermatozoa. *Agricultura Tropica et Subtropica*, **50** (1), 13-18.
- Daramola, J.O., Adekunle, E.O., Onagbesan, O.M., Iyasere, O.S., Williams, T.J., James, I.J., Oyewusi, I.K. e Oyewusi, J.A., 2015. Effects of pyridoxine supplementation or in combination with other antioxidants on motility, *in vitro* capacitation and acrosome reaction of goat buck spermatozoa during cryopreservation. *Small Ruminants Research*, **131**, 113-117.
- 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*)
- 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*)
- Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Schroeder-Printzen, I., Michelmann, H.W., Schiefer, H.G. e Weidner, W., 2003. Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters *in vitro*. *Andrologia*, **35**, 100-105.
- Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H.W., Schiefer, H.G., Rován, E. e Mayer, F., 1996. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *International Journal of Andrology*, **19**, 271-277.

- Donovan, A., Hanrahan, J., Kummen, E., Duffy, P. e Boland, M., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus. *Animal Reproduction Science*, **84**, 359-368.
- Dorado, J., Rodríguez, I. e Hidalgo, M., 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, **68**, 168-177.
- Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchordoguy, T.J., Overstreet, J.W. e Crowe, J.H., 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, **265**, 432-437.
- Dunn, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**, 52-64.
- Eddy, E.M., 2006. The spermatozoon. In: Knobil and Neill's Physiology of reproduction, J.D. Neill (Ed.), Volume 1, 3ª edição, Elsevier, Academic Press, St. Louis, EUA, 3270 p.
- El-Battawy, K.A., 2019. Preservation of goat semen at 5°C with emphasis on its freezability and the impact of melatonin. *International Journal of Veterinary Science and Research*, **5** (2), 035-038.
- Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M. e Akbari-Sharif, A., 2013. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reproduction in Domestic Animals*, **48** (6), 899-904.
- 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 p.
- Erasmus, J.A., Fourie, A.J. e Venter, J.J., 1985. Influence of age on reproductive performance of the improved Boer goat doe. *South African Journal of Animal Science*, **15**, 5-7.
- Eşki, F., Kurt, S. e Demir, P.A., 2021. Effect of different estrus synchronization protocols on estrus and pregnancy rates, oxidative stress and some biochemical parameters in hair goats. *Small Ruminant Research*, **198**, 106348.
- Fahmy M.H., 1996. Feeding and management of prolific sheep: Under intensive management: the total confinement experiment in Canada, In: Prolific sheep, M.H. Fahmy (Ed.), CAB International, Wallingford, Reino Unido, 414-428 pp.
- Faigl, V. Vass, N., Jávora, A., Kulcsár, M., Solti, L., Amiridis, G. e Cseh, S., 2012. Artificial insemination of small ruminants – A review. *Acta Veterinária Hungarica*, **60** (1), 115-129.

- Fang, Y., Zhong, R., Chen, L., Feng, C., Sun, H. e Zhou, D., 2015. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. *Small Ruminant Research*, **130**, 178-182.
- Ferrer, M., Xu, W. e Oko, R., 2012. The composition, protein genesis and significance of inner acrosomal membrane of eutherian sperm. *Cell Tissue Research*, **349** (39), 733-748.
- Fleisch, A., Werne, S., Heckendorn, F., Hartnack, S., Piechotta, M., Bollwein, H., Thun, R. e Janett, F., 2012. Comparison of 6-day progestagen treatment with Chronogest® CR and Eazi-breed™ CIDR® G intravaginal inserts for estrus synchronization in cyclic ewes. *Small Ruminant Research*, **107**, 141-146.
- Flesch, F.M., Brouwers, J.F.H.M., Nievelstein, P., Verkleij, A.J., van Golde, L.M.G., Colenbrander, B. e Gadella, B.M., 2001. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *Journal of Cell Science*, **114**, 3543-3555.
- Fornazari, R.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 dois tratamentos progestagénicos curtos + eCG, de dois diluidores seminais e de duas técnicas de preservação de sémen. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 90 pp. *Mestrado em Tecnologias da Ciência Animal*
- Francisco, L.F., 2018. Sincronização deaios e inseminação artificial em cabras das raças Serrana e Preta de Montesinho. Efeitos da suplementação multivitamínica, tratamento progestagénico curto + gonadotropina coriónica e método de preservação do sémen. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 76 pp. *(Tese de Mestrado)*
- Freitas, V.J.F., Baril, G., Martin, G.B. e Saumande, J., 1997. Physiological limits to further improvement in the efficiency of oestrous synchronization in goats. *Reproduction and Fertility*, **9**, 551-556.
- Furstoss, V., David, I., Leboeuf, B., Guillouet, P., Boué, P. e Bodin, L., 2008. Genetic and non-genetic parameters of several characteristics of production and semen quality in young bucks. *Animal Reproduction Science*, **110**, 25-36.
- Gangwar, C., Kharche, S.D., Ranjan, R., Kumar, S., Goel, A.K., Jindal, S.K. e Agarwal, S.K., 2015. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. *Small Ruminant Research*, **129**, 104-107.
- Gillan, L., Maxwell, W.M.C. e Evans, G., 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction Fertility and Development*, **16**, 447-454.

- Gordon, I., 1997. Controlled reproduction in sheep & goats. Controlled Reproduction in Farm Animals Series, Vol. 2, CAB International, Cambridge, Reino Unido, 450 pp.
- Gororo, E., Zulu, P.T., Chatiza, F.P. e Mhuka, C., 2019. Effects of different extenders and storage temperatures on longevity of small East African goat (*Capra hircus*) semen. *Small Ruminant Research*, **175**, 83-89.
- Graham, J.K. e Mocé, E., 2005. Fertility evaluation of frozen-thawed semen. *Theriogenology*, **64**, 492-504.
- 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.
- Hahn, K., Failing, K. e Wehrend, A., 2019. Effect of temperature and time after collection on buck sperm quality. *BMC Veterinary Research*, **15**, 7 p.
- Hamed, A., 2010. Factors affecting reproductive performance of Zaraibi goats. *Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences*, **5** (2), 35-55.
- Hameed, N., Khan, M.I.U.R., Ahmad, W., Abbas, M., Murtaza, A., Shahzad, M. e Ahmad, N., 2020. Follicular dynamics, estrus response and pregnancy rate following GnRH and progesterone priming with or without eCG during non-breeding season in anestrus Beetal goats. *Small Ruminant Research*, **182**, 73-77.
- Hashemi M. e Safdarian, M., 2017. Efficiency of different methods of estrus synchronization followed by fixed time artificial insemination in Persian downy does. *Animal Reproduction*, **14** (2), 413-417.
- Houdeau, E., Furstoss, V., Forgerit, Y., Bonné, J.L. e Leboeuf, B., 2008. Short-duration insemination with frozen semen increases fertility rate in nulliparous dairy goats. *Animal*, **2** (10), 1496-1500.
- IMV, 2023. INRA 96. *In: <https://www.imv-technologies.com/documents/INRA96-Flyer-A4-GB.pdf>* (Consultado a 07/10/2023)
- Itodo, J.L., Ibrahim, R.P., Rwuaan, J.S., Aluwong, T., Shiradiyi, B.J., Owoicho, A.K., Azubuike, U.S. e Agbi, K.A., 2021. The effects of feeding grade levels of whole cottonseed on semen characteristics and testicular profiles of Red Sokoto bucks. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, **43**, e50990.
- Joshi, A., Kalauni, D. e Bhattarai, N., 2018. Factors affecting productive and reproductive traits of indigenous goats in Nepal. *Archives of Veterinary Science and Medicine*, **1** (1), 19-27.

- Juyena, N.S. e Stelletta, C., 2012. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, **33**, 536-551.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S. e Karatzas, G., 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, **53**, 1285-1293.
- 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.
- Kelly, R., Wilkins, J. e Newnham, J., 1989. Fetal mortality from day 30 of pregnancy in Merino ewes offered different levels of nutrition. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **29**, 339-342.
- Kershaw, L.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G. e Scaramuzzi, Rex J., 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, **64** (5), 1225-1235.
- Kessel, A., Ben-Tal, N. e May, S., 2001. Interactions of cholesterol with lipid bilayers: The preferred configuration and fluctuations. *Biophysical Journal*, **81**, 643-658.
- Khanal, P., 2016. Influence of crossbreeding and non genetic factors on doe fitness traits of Boer F1 and foundation breeds in southeastern United States. Tennessee State University, Nashville, EUA, 82 pp.
- 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.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A. e Parks, J. E., 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. *Animal Reproduction Science*, **172**, 1-9.
- Leão, A.S.M., 2017. Ensaio da atividade reprodutiva e inseminação artificial de cabras de raça Serrana – ecótipo Transmontano – em Maio. Avaliação dos efeitos da dose eCG, do diluidor e do processo de preservação do sêmen. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 50 pp. (*Tese de Mestrado*)
- Leboeuf B., Guillouet P., Batellier F., Bernelas D., Bonné J.L., Forgerit Y., Renaud G. e Magistrini M., 2003b. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. *Theriogenology*, **60** (5), 867-877.

- Leboeuf, B., Delgadillo, J.A., Manfredi, E., Piacère, A., Clément, V., Martin, P., Pellicer, M., Boué, P. e De Cremoux, R., 2008. Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**, 379-385.
- Leboeuf, B., Manfredi, E., Boue, P., Piacère, A., Brice, G., Baril, G., Broqua, C., Humblot, P. e Terqui M., 1998. L'insemination artificielle et l'amélioration génétique chez le chevre laitier en France. *Productions Animales*, **11** (3), 171-181.
- Leboeuf, B., Restall, B. e Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Production Science*, **62**, 113-141.
- Leboeuf, B., Restall, B. e Salamon, S., 2003a. Production et conservation de la semence de bouc pour l'insémination artificielle. *INRA Productions Animales*, **16** (2), 91-99.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F. e Cesari, A., 2016. Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Animal Reproduction Science*, **173**, 35-41.
- Leethongdee, S., Thuangsanthia, A. e Khalid, M., 2021. Topical application of cervix with hyaluronan improves fertility in goats inseminated with frozen-thawed semen. *Animal Bioscience*, **34** (6), 985-992.
- Liang, J., Larbi, A., Lv, C., Ali, S., Wu, G. e Quan, G., 2022. Fertility results after exocervical insemination using goat semen cryopreserved with extenders based on egg yolk, skim milk, or soybean lecithin. *Reproduction in Domestic Animals*, **58**, 431-442.
- López-Sebastian, A., González-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Díaz-Delfa, C., Santiago-Moreno, J. e Gómez-Brunet, A., 2007. New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology*, **68**, 1081-1087.
- Luo, J., Wang, W. e Sun, S., 2019. Research advances in reproduction for dairy goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **32**, 1284-1295.
- Macías, A., Martín, E., Laviña, A., Ferrer, L.M., Lidón, I., Rebollar, R. e Tejedor, M.T., 2020. Cervical artificial insemination in sheep: Sperm volume and concentration using an antiretrograde flow device. *Animal Reproduction Science*, **221**, 106551.
- Maher, G., 2012. Comparaison des techniques de cryoconservation de la semence chez le bouc et d'insemination artificielle chez le chèvre. Université Laval, Québec, Canada, 115 p. (*Tese de Mestrado*)

- Manfredi, E., Leboeuf, B., Bodin, L., Boué, P. e Humblot, P., 1998. Sources de variation génétiques et non génétiques des caractéristiques de production de semence chez le bouc. *Rencontres Recherches Ruminants*, **5**, 37-44.
- Mao, H.-T. e Yang, W.-S., 2013. Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene*, **526** (2), 75-79.
- Mascarenhas, R., 2006. Melhoramento da eficiência reprodutiva em caprinos de raças nacionais. *In: I Jornadas Nacionais de Caprinicultura, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança*, 51-65.
- Maxwell, W.M.C. e Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **42** (1), 55-65.
- Maxwell, W.M.C., de Graaf, S.P., Ghaoui, R.E.H. e Evans, G., 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility*, **64** (Supl), 13-38.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D. e Rodrigues, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, **57** (1), 327-344.
- Meena, G.S., Raina, V.S., Bhakat, M., Mohanty, T.K., Gupta, A.K. e Abdullah, M., 2017. Effect of long term storage in LN2 on bacterial load and preservability of semen in Murrah bulls. *Indian Journal of Animal Research*, **51** (2), 247-251.
- Mehdipour, M., Daghigh Kia, H., Moghaddam, G. e Hamishehkar, H., 2018. Effect of egg yolk plasma and soybean lecithin on rooster frozen-thawed sperm quality and fertility. *Theriogenology*, **116**, 89-94
- Mellado, M., Valdéz, R., García, J.E., López, R. e Rodríguez, A., 2006. Factors affecting the reproductive performance of goats under intensive conditions in a hot arid environment. *Small Ruminant Research*, **63** (1-2), 110-118.
- Memon, M.A., Bretzlaff, K.N. e Ott, R.S., 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*, **26**, 823-827.
- Mocé, E., Mocé, M.L., Lozano-Palazón, S.A., Bernácer, J., Martínez-Granell, M.M., Esteve, I.C., Bernat, F., Contreras, S.J., Villalba, I. e Gómez E.A., 2022. Fertility prediction in dairy goats from Murciano-Granadina breed: The role of sperm evaluation and female traits. *Animal*, **16** (5), 100525.
- Mocé, M.L., Esteve, I.C., Gómez, E.A., Pérez-Fuentes, S. e Mocé, E., 2023. Microbial composition of goat buck's ejaculate is modified by process of preparing and storing refrigerated semen

doses. *Theriogenology*. (In Press)

- Mohamed, R.H., Mohamed, R.S., Abd El-Hamid, I.S., Madkour, F.A., Sallam, A.M., Ali, F. e Hussein, H.A., 2023. Semen quality, testicular characteristic, biochemical profile and histopathology of testes of goat under heat stress conditions. *Assiut Veterinary Medical Journal*, **69** (176), 76-87.
- Morrell, J.M., 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reproduction in Domestic Animals*, **41**, 63-67.
- Morrell, J.M., 2011. Artificial insemination: Current and future trends. *In: Artificial insemination in farm animals*. M. Manafi (Ed.), InTech, Rijeka, Croácia, 312 p.
- Morrell, J.M., Malaluang, P., Ntallaris, T. e Johannisson, A., 2022. Practical method for freezing buck semen. *Animals*, **12**, 352.
- Murphy, C., Holden, S.A., Murphy, E.M., Cromie, A.R., Lonergan, P. e Fair, S., 2016 The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. *Reproduction Fertility Development*, **28**, 1349.
- Notter, D.R., 2012. Genetic improvement of reproductive efficiency of sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, **130** (3-4), 147-151.
- Ntemka, A., Tsakmakidis, I.A., Kiossis, E., Milovanović, A. e Boscós, C.M., 2018. Current status and advances in ram semen cryopreservation. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, **69**, 911-924.
- Nuti, L., 2007. Techniques for artificial insemination of goats. *In: Current therapy in large animal theriogenology*, R.S. Youngquist e W.R. Threlfall (Eds), 2ª edição, Saunders, Elsevier, St. Louis, EUA, 529-534 p.
- 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.
- Ohaneje, U.L., Osuagwuh, U.I., Alvarez-Rodríguez, M., Yáñez-Ortiz, I., Tabarez, A. e Palomo, M.J., 2021. The re-addition of seminal plasma after thawing does not improve buck sperm quality parameters. *Animals*, **11**, 3452.

- Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S. e Shimada, M., 2009. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, **71**, 491-498.
- Olesen, I., 1993. Effects of cervical insemination with frozen semen on fertility and litter size of Norwegian sheep. *Livestock Production Science*, **37**, 169-184.
- Omontese, B.O., Rekwot, P.I., Ate, I.U., Ayo, J.O., Kawu, M.U., Rwuaan, J.S., Nwannenna, A.I., Mustapha, R.A. e Bello, A.A., 2016. An update on oestrus synchronisation of goats in Nigeria. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, **5** (2), 96-101.
- Padilha, R.T., Magalhães, D.M., Maia-Junior, A., Brasil, A.F. e Araújo, A.A., 2011. Efeito de diferentes dispositivos intravaginais na sincronização estral e taxa de gestação em ovelhas deslanadas submetidas a IATF via cervical superficial com sêmen refrigerado. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, **6** (3), 538-543.
- Parkinson, T.J., 2019. Reproductive physiology of male animals. *In: Veterinary reproduction and obstetrics*, D.E. Noakes, T.J. Parkinson e G.C.W. England (Eds), Elsevier, Saunders Ltd., 10ª edição, St. Louis, EUA, 848 p.
- Paulenz, H., Söderquist, L., Adnøy, T., Soltun, K., Sæther, P.A., Fjellsøy e Berg, K.A., 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Animal Reproduction Science*, **86**, 109-117.
- Pierson, J., Baldassarre, H., Keefer, C. e Downey, B., 2001. Seasonal variation in preovulatory events associated with synchronization of estrus in dwarf goats. *Theriogenology*, **56**, 759-769.
- Ponsart, C., Gérard, O. e Caplin, S., 2004. L'insémination: historique, état des lieux chez l'animal. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **32** (10), 880-886.
- Priskas, S., Termatzidou, S.A., Gargani, S. e Arsenos, G., 2019. Evaluation of factors affecting pregnancy rate after cervical insemination of dairy ewes in Greece. *Journal of Veterinary Science & Medicine*, **7** (2), 1-7 p.
- Purdy, P.H., Spiller, S.F., McGuire, E., McGuire, K., Koepke, K., Lake, S. e Blackburn, H.D., 2020. *Small Ruminant Research*, **191**, 106179.
- Quintas, H., Mateus, O., Santos, L., Correia, T., Afonso, P., Silva, D., Álvaro, A. e Valentim, R., 2022a. Tratamentos curtos de sincronização deaios com FGA ou CIDR e eCG e seus efeitos sobre a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial cervical em cabras Serranas. *In: IV Congresso Nacional de Escolas Superiores Agrárias, Escola Superior Agrária de Santarém, Santarém, Portugal, P110, 239 p.*

- Quintas, H., Mateus, O., Santos, L., Correia, T., Afonso, P., Silva, D., Álvaro, A. e Valentim, R., 2022b. Efeito das características seminais de bodes dadores de sémen sobre a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial cervical em cabras Serranas. *In: IV Congresso Nacional de Escolas Superiores Agrárias, Escola Superior Agrária de Santarém, Santarém, Portugal, P5712, 226 p.*
- Rather, H.A., Islam, R., Malik, A.A. e Lone, F.A., 2016. Addition of antioxidants improves quality of ram spermatozoa during preservation at 4°C. *Small Ruminant Research, 141, 24-28.*
- Rauen, U. e de Groot, H., 2002. Mammalian cell injury induced by hypothermia the emerging role for reactive oxygen species. *Biology Chemistry, 383, 477-488.*
- Rekik, M., Ben, O.H., Othmane, H., Lassoued, N. e Sakly, C., 2014. Efficiency of oestrus synchronization by GnRH, prostaglandins and socio-sexual cues in the North African Maure Goats. *Reproduction in Domestic Animals, 49 (3), 499-504.*
- Ritar, A.J. e Ball, P.D., 1993. The effect of freeze thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Animal Reproduction Science, 31, 249-262.*
- Ritar, A.J. e Salamon, S., 1982. Effects of seminal plasma and its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal of Biology Science, 35, 305-312.*
- Ritar, A.J. e Salamon, S., 1983. Fertility and frozen-thawed semen of Angora goat. *Australian Journal of Biology Science, 36, 49-59.*
- Ritar, A.J. e Salamon, S., 1991. Effect of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small Ruminant Research, 4, 29-37.*
- Ritar, A.J., Ball, P.D. e O'May, P.J., 1990. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of female. *Reproduction, Fertility and Development, 2, 377-384.*
- Ritar, A.J., Maxwell, W.M.C. e Salamon, S., 1984. Ovulation and LH secretion in the goat after intravaginal progestogen sponge-PMSG treatment. *Journal of Reproduction & Fertility, 72, 559-563.*
- Rizkallah, N., Chambers, C.G., Graaf, S.P. de e Rickard, J.P., 2022. Factors affecting the survival of ram spermatozoa during liquid storage and options for improvement. *Animals, 12, 244.*

- Robertson, S.M., Atkinson, T., Friend, M.A., Allworth, M.B. e Refshauge, G., 2020. Reproductive performance in goats and causes of perinatal mortality: a review. *Animal Production Science*, **60**, 1669-1680.
- Roca, J., Carrizosa, J.A. Campos, I. Lafuente, A., Vazquez, J.M. e Martinez, E., 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadiana goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research*, **25** (2), 147-153.
- Roof, D.J., Bowley, S., Price, L.L. e Matsas, D.J., 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, **77** (2), 412-420.
- Romano, J.E., 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Ruminant Research*, **55**, 15-19.
- Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H.T., Hodson, H.H., Shurson, G.C. e Crabo, B.G., 2000. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *Journal of Animal Science*, **78**, 443-448.
- Sadeghi, S., Del Gallego, R., García-Colomer, B., Gómez, E.A., Yániz, J.L., Gosálvez, J., López-Fernández, C. e Silvestre, M.A., 2020. Effect of sperm concentration and storage temperature on goat spermatozoa during liquid storage. *Biology*, **9** (9), 300.
- Salamon, S. e Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 77-111.
- 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.
- Salvador, I., Viudes-de-Castro, M.P., Bernacer, J., Gómez, E.A. e Silvestre, M.A., 2005. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats: a field assay. *Reproduction in Domestic Animals*, **40** (6), 526-529.
- Sánchez, F.D., del Bosque, A.S. e Bernal, H.B., 2018. Reproduction in goats. *In: Goat Science*, S. Kukovics (Ed.), IntechOpen, 87-105.
- Sandal, A.I., Şenlikci, H., Yilmazer, M., Kartal, B., Palibiyik, B. e Özdaş, Ö.B., 2021. Determination of oxidative stress parameters and DNA fragmentation on post-thawed buck semen in the presence of ram seminal plasma and fetal calf serum. *Andrologia*, **53**, e.14032.

- Santiago-Moreno J., Estesó, M.C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Delgadillo, J.A e Lopez-Sebastian, A., 2017. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science*, **181**,141-150.
- Santolaria, P., Yaniz, J., Fantova, E., Vicente-Fiel, S. e Palacin, 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.
- Scaramuzzi, R.J. e Martin, G.B., 2008. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **43** (Suppl 2), 129-36.
- Seifi-Jamadi, A., Masoudi, R., Hosseinzadeh, A., A.R., Kohram, H., Shafari, M., Moein Aladavood, S.D. e Sadeghpanah, A., 2017. Effect of estradiol and oxytocin injection on the efficiency of artificial insemination in Iranian Zel ewes during the breeding season. *Archives of Razi Institute*, **72** (1), 33-41.
- Shamsunddin, M., Amiri, Y. e Bhuiyan, M.M.U., 2000. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reproduction in Domestic Animals*, **35**, 53-57.
- Sieme, H., Oldenhof, H. e Wolkers, W.F., 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*, **169**, 2-5.
- Silva, L., Mateus, Ó., Reyes, L. Correia, T., Quintas, H. e Valentim, R., 2019. Inseminação artificial em ovelhas Churras Bragançanas. Efeitos do tipo de vaginoscópio e do inseminador. In: VI EJI 2019, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 81 p.
- Silva, L.T.V. da, 2023. Controlo reprodutivo e inseminação artificial com sémen fresco e refrigerado em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Efeitos do dispositivo vaginal (esponjas ou CIDR), do vaginoscópio e do inseminador. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 65 pp. (In Press)
- 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.

- Siqueira, A.P., 2006. Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 106 p. (*Tese de Mestrado*)
- Siqueira, A.P., Silva Filho, J.M., Fonseca, J.F., Bruschi, J.H., Palhares, M.S., Borges, A.M., Bruschi, M.C.M., Peixoto, M.P. e Rossi, R., 2009. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. *Medicina Veterinária. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **61** (1), 66-71.
- 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.*
- Tekin, K., 2019. Cervical insemination with frozen thawed semen in goats at different breeding age. *Kocatepe Veterinary journal*, **12** (3), 357-362.
- Tuncer, P.B., Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Özgürtaş, T., Coşkun, E., Eroa, H., Aydin, F.N. e Gürçan, İ.S., 2013. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Research*, **113**, 383-389.
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., y Correia, T., 2009. Anticipación de la estación reproductiva en ovelas de la raza Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial. *In: 34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Barbastro, Espanha, 403-407.*
- Valentim, R., Rodrigues, I., Correia, T.M., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J.M., 2016. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos 7. Inseminação artificial em ovinos e caprinos. *Agrotec.* **20**, 10-13.
- Villaquiran, M., Gipson, T.A. Merkel, R.C., Goetsch, A.L. e Sahlu, T., 2004. Body condition scores in goats. American Institute for Goat Research, Langston University, Langston, EUA, 8 pp.

- Vishwanath, R. e Shannon, P., 2020. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, **62**, 23-53.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60**, 481-492.
- White, I., 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reproduction Fertility and Development*, **5**, 639.
- Yániz, J., Silvestre, M.A., Santolaria, P. e Soler, C., 2018. CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, **30**, 799-809.
- Yata, V.K., 2022. Sperm sexing and its role in livestock production. Springer, Singapura, 112 p.
- Zakaria, M., 2017. L'Insémination artificielle chez les caprins de la race Arbia dans la région de Tiaret. Universidade Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, Mostaganem, Argélia, 94 p. (*Tese de Mestrado*)
- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Nabi, M.M. e Mohammadi-Sangcheshmeh, A., 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semencryopreservation? *Small Ruminant Research*, **114**, 120-125.
- Zou, J., Wei, L., Li, D., Zhang, Y., Wang, G., Zhang, L., Cao, P. e Li, G., 2022. Study on cryopreservation of Guanzhong dairy goat semen with bovine semen seminal plasma. *Theriogenology*, **189**, 113-117.