

**Controlo da Actividade Reprodutiva e Inseminação Artificial  
em Ovelhas da Raça Churra Galega Bragançana**

**Marina Winter Dendena**

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

Orientada por:

**Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim**

**Professora Doutora Teresa Maria Montenegro de Araújo Almendra Correia**

**Bragança**

**2017**

**Controlo da Actividade Reprodutiva e Inseminação Artificial  
em Ovelhas da Raça Churra Galega Bragançana**

**Marina Winter Dendena**

**Bragança  
2017**

*Editado por*

INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA – ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE BRAGANÇA

Campos de Santa Apolónia Apartado - 1172

5301-855 BRAGANÇA

Portugal

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

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

🌐 <http://www.esa.ipb.pt>

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

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

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

Neste espaço tentarei demonstrar meu eterno agradecimento a todas as pessoas que estiveram ao meu lado nesta caminhada.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, seu fôlego de vida me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Ramiro Valentim pelo enorme apoio, compreensão, amizade, paciência, pelos seus ensinamentos, por me tranquilizar quando as dificuldades surgiam e por contribuir grandiosamente em minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço de todo meu coração aos meus pais, pelas palavras acalentadoras, por serem meu refúgio nas horas de tempestade, pelo exemplo de vida, por me ensinarem a ter coragem, a ter fé e acreditar que tudo é possível quando temos força de vontade, a não desanimar nas horas difíceis, por terem me ensinado a ser humilde, honesta e saber perdoar.

Agradeço aos irmãos, pelos milhares de sorrisos que me proporcionaram, pela compreensão de que teríamos que passar um tempo longe e apoiarem minha decisão. Meus pequenos, muito obrigada.

Meu agradecimento e reconhecimento ao Professor Raimundo Maurício, pelos conhecimentos e energias positivas transmitidas, pelos sábios conselhos, por ter-me ensinado a ser mais autoconfiante e por acreditar no meu trabalho, sempre estarás em meu coração.

Agradeço a Dona Céu Matos, querida “Ti Céu” pelo exemplo de bondade e por todo o apoio e paz que sempre transmitiu ao laboratório.

Meu enorme e eterno agradecimento ao Óscar Mateus, por todo o auxílio, ânimo, tolerância e firmeza que demonstrou durante o trabalho, pelas palavras de apoio e pela amizade.

Agradeço aos amigos Luis Silva e Luiza Corrêa pela colaboração que forneceram durante o trabalho.

Agradeço as colegas de faculdade e casa: Samanta Almeida e Aline Fernandes, obrigada por tudo, pelos momentos de diversão e também de apoio.

Agradeço aos amigos: Bruna Soares, Anderclei Conradi, Ana Rizzotto, Raquel Fornazari e Lucas Francisco por tornarem meus dias mais animados.

Meu MUITO OBRIGADO a todos que, contribuíram directa ou indirectamente para este trabalho.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE QUADROS .....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT .....	XIV
INTRODUÇÃO .....	1
I - REVISÃO BILIOGRÁFICA.....	3
1 - FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA OVELHA.....	3
1.1 - Ciclo Éstrico .....	3
1.2 - Endocrinologia do Ciclo Éstrico.....	4
2 - SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM OVINOS.....	6
2.1 - Regulação Hormonal da Sazonalidade Reprodutiva .....	7
2.2 - Sazonalidade Reprodutiva nos Carneiros .....	9
3 - CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA .....	9
3.1 - Progestagénios.....	10
3.2 - Prostaglandina F <sub>2α</sub> (PGF <sub>2α</sub> ).....	11
3.3 - Gonadotrofina Coriónica equina .....	12
4 - INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS .....	13
4.1 - Técnicas de Inseminação Artificial em Ovinos .....	15
5 - AVALIAÇÃO DO SÉMEN .....	16
5.1 - Características Macroscópicas do Sémén .....	16
5.1.1 - Volume .....	16
5.1.2 - Cor e Cheiro .....	16
5.1.3 - Consistência ou Densidade.....	16
5.2 - Características Microscópicas do Sémén .....	17
5.2.1 - Concentração.....	17
5.2.2 - Motilidade Massal.....	17

5.3 - Motilidade Individual.....	18
5.4 - Morfologia.....	19
<b>6 - CONSERVAÇÃO DO SÉMEN</b> .....	19
6.1 - Sémen Refrigerado.....	21
6.2 - Sémen Fresco.....	22
<b>7 - DILUIDORES</b> .....	22
<b>II-TRABALHO EXPERIMENTAL</b> .....	25
<b>1 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
1.1 – Animais.....	25
1.2 – Avaliação da Actividade Ovária.....	25
1.2.1 – Avaliação da Ciclicidade Pré-tratamentos.....	26
1.2.2 – Avaliação da Resposta Ovária aos Tratamentos.....	26
1.3 – Tratamentos Aplicados.....	26
1.4 – Recolha de Sémen.....	27
1.5 – Análises Seminais.....	27
1.6 – Doses Seminais (Frescas e Refrigeradas).....	28
1.7 – Inseminação Artificial a Tempo Fixo.....	29
1.7.1 – Posição das Fêmeas Durante a Inseminação.....	30
1.8 – Diagnóstico de Gestação.....	31
1.9 – Análise Estatística.....	31
<b>III. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>1 - IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL</b> .....	32
<b>2 - ESTADO FISIOLÓGICO PRÉ-TRATAMENTOS</b> .....	33
<b>3 - RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS CURTOS + ECG</b> .....	34
3.1 – Diagnóstico de gestação por Ultra-sonografia.....	34
<b>4 – CARNEIRO</b> .....	35

<b>5 – DOSE DE GONADOTROPINA .....</b>	<b>35</b>
<b>6 – PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7 - DILUIDORES .....</b>	<b>36</b>
<b>8 - INSEMINADOR.....</b>	<b>37</b>
<b>9 - COR DA MUCOSA VAGINAL.....</b>	<b>37</b>
<b>10 - TIPO DE ENTRADA NO CANAL CERVICAL .....</b>	<b>37</b>
<b>11 - LUBRIFICAÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>12 – LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÉMEN NO TRACTO GENITAL FEMININO .....</b>	<b>39</b>
<b>12.1 - Refluxo.....</b>	<b>39</b>
<b>IV-CONCLUSÕES.....</b>	<b>41</b>
<b>V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Cascata de priorização da utilização de nutrientes .....	1
FIGURA 2 – Esquema representativo da secreção de hormonas ao longo do ciclo éstrico na ovelha e na cabra .....	5
FIGURA 3 – Reprodução estacional da ovelha.....	6
FIGURA 4 – Desenho esquemático dos principais mecanismos envolvidos na síntese de melatonina.. .....	8
FIGURA 5 – Fotografia da cérvix de ovelha .....	13
FIGURA 6 – Classificação da aparência da entrada no os cervical externo da ovelha.	14
FIGURA 7 – Classificação quanto à aparência externa do orifício cervical.....	30
FIGURA 8 – Posição da fêmea para realização da inseminação. ....	31

## ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO I — Estimativa da concentração espermática através das características de densidade .....	17
QUADRO II — Sistema de classificação para motilidade massal do sémen ovino .....	18
QUADRO III — Divisão das ovelhas segundo os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva.....	25
QUADRO IV — Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com Andromed <sup>®</sup> ou com INRA 96 <sup>®</sup> aplicadas ao conjunto das ovelhas tratadas .....	27
QUADRO V — Idade, peso corporal e condição corporal (CC) das ovelhas estudadas, de acordo com os tratamentos hormonais aplicados, com o processo de preservação e o tipo de diluidor .....	31
QUADRO VI — Cor da mucosa vaginal quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade.....	36
QUADRO VII — Configuração anatómica da entrada no canal cervical e sua relação com a taxa de fertilidade.....	36
QUADRO VIII — Local da deposição do sémen e relação com a taxa de fertilidade ...	38
QUADRO IX — Refluxo seminal e sua relação com a taxa de fertilidade .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

CL – Corpo lúteo

CC – Condição corporal

CASA – Computer-assisted semen analysis

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

FGA – Acetato de fluorgestona

FSH – Hormona Folículo-Estimulante

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

hCG – Gonadotrofina Coriônica humana

IA – Inseminação artificial

LH – Hormona Luteinizante

LED – Light Emitting Diode

MAP – Acetato de medroxiprogesterona

ng/ml – nanogramas/mililitros

PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina

P<sub>4</sub> – Progesterona

RIA – Radioimunoensaio

r.p.m – Rotação por minuto

TRIS – Hidroximetil aminometano

UI – Unidades internacionais

µg – Microgramas

## RESUMO

O manejo reprodutivo é extremamente importante, pois é a principal fonte de ingressos económicos. O controlo da actividade reprodutiva é essencial à organização e à gestão adequada de qualquer exploração animal, pois permite adequar os ciclos de nascimentos e de produção às exigências sazonais do mercado de produtos de origem animal e planificar da melhor o manejo alimentar, o manejo sanitário, a mão-de-obra, a ocupação dos espaços, entre outros. A inseminação artificial permite de forma sustentável aumentar rapidamente o valor genético dos animais.

Neste trabalho realizou-se, primeiramente, uma breve revisão bibliográfica sobre a fisiologia da reprodução das ovelhas, os métodos de controlo da actividade reprodutiva, as principais análises seminais efectuadas e a inseminação artificial com sémen fresco e refrigerado e os efeitos de dois diluidores seminais – Andromed<sup>®</sup> e INRA 96<sup>®</sup> – sobre a fertilidade.

Foram utilizadas 67 ovelhas adultas (2-8 anos) da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana. O ciclo éstrico de metade das ovelhas foi sincronizado com um tratamento curto de acetato de fluorgestona (FGA; 20 mg) e eCG (500 UI) e o da outra metade foi-o com um tratamento curto de acetato de acetato de medroxiprogesterona (60 mg) e eCG (500 UI). O sémen foi recolhido por vagina artificial e depois de avaliado foi diluído com Andromed<sup>®</sup> ou INRA 96<sup>®</sup> e preparado para ser inseminado fresco ou refrigerado. Cada dose seminal continha cerca de  $200 \times 10^6$  espermatozóides. A inseminação artificial foi realizada cerca de 55+1 horas pós-administração de eCG. Procurou-se avaliar alguns dos parâmetros que condicionam o sucesso da inseminação artificial: inseminador, cor da mucosa da vagina, grau de lubrificação vaginal, tipo do orifício (*Os*) cervical externo, local de deposição do sémen e se houve refluxo cervical. A deposição do sémen foi feita sempre o mais profunda possível, com o auxílio de fórceps vaginais, luzes LED, pistoletes Quicklock com bainhas (Minitüb). O diagnóstico de gestação foi feito 40 dias pós inseminação artificial.

Quando estudo teve início, a maioria das fêmeas estavam cíclicas. Os tratamentos progestagénicos curtos + eCG foram igualmente máximos. A IA às 55+1 horas produziu excelentes resultados. Quarenta dias pós-inseminação 85,1% das ovelhas estavam gestantes. Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre inseminadores, na forma de conservação do sémen, no local de deposição do sémen, entre a forma de

Os cervical e a corrência ou não de refluxo cervical. Os diluidores usados não afectaram a taxa de fertilidade.

**Palavras-passe:** Ovinos, Churra Galega Bragançana, controlo reprodutivo e inseminação artificial.

## ABSTRACT

Reproduction management is highly important since it is the main source of money income. Reproduction control is essential to organize and manage every animal production, since it turns possible the adjustment between production and market demands and the best feed, health, labor and space use planning. Artificial insemination allows a fast and sustainable increase of animal genetic value.

This thesis starts with a brief monography in ewes reproduction physiology, reproduction control methods, main semen analysis used, artificial insemination with fresh and cooled semen and the effects of two commercial extenders (Andromed<sup>®</sup> and INRA 96<sup>®</sup>) in fertility.

Sixty-seven adult (2-8 years old) Portuguese Churra Galega Bragançana ewes were used in this study. Ovarian activity of half ewes was synchronized with a short-term treatment FGA (20 mg) + eCG (500 UI) and the other half with a short-term MAP (60 mg) + eCG (500 UI). Semen was collected with artificial vaginas. After been analyzed semen was diluted with Andromed<sup>®</sup> or INRA 96<sup>®</sup> and prepared to be inseminated fresh or cooled. Each seminal dose had  $200 \times 10^6$  sperm cells. Artificial insemination was performed 55+1 hours after eCG administration. Different parameters effects (inseminator, vagina mucosa color, degree of vagina lubrication, external cervix *Os* form, sperm deposition local and cervical possible semen reflux) in fertility. Semen was deposited as deeper as possible in the cervix without damaging the mucosa wall, using vaginal forceps, LED lights, Quicklock guns and Minitüb sheaths. Pregnancy diagnosis was performed 40 days after artificial insemination.

At the start of this study the majority of ewes were cycling. Both short-term progestogens and eCG treatments were absolute efficient. AI at 55+1 hours resulted in excellent fertility. Forty days after insemination, 85.1% of all ewes were pregnant. Significant statistical differences were found between inseminators, semen preservation, local of semen deposition, *Os* cervix form and cervical reflux in fertility. Extenders had no effect on fertility.

**Pass-words:** Sheep, Churra Galega Bragançana, reproduction control and artificial insemination

## INTRODUÇÃO

Os ovinos originários das regiões temperadas continuam a apresentar sazonalidade reprodutiva, característica adaptativa que se desenvolveu ao longo de milhões de anos (Ortavant *et al.*, 1988, Vijil, 1989, Martin *et al.*, 1990, O'Callaghan *et al.*, 1993, Malpaux *et al.*, 1996, Sirotkin e Schaeffer, 1997, Goldman, 2001 e Thiéry *et al.*, 2002).

Na natureza, a maioria dos mamíferos reproduz-se numa época específica do ano, para que os partos coincidam com a estação em que as condições climatéricas e alimentares são mais favoráveis ao crescimento fetal final e à lactação (Sebastian Lopez, 1989, Martin *et al.*, 1990, Lincoln, 1992, Malpaux *et al.*, 1996, Thimonier, 1996, Martin *et al.*, 2002, Thiéry *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003) (Figura 1). As crias nascem numa época do ano, geralmente na Primavera, em que as condições alimentares e de temperatura do ar (termorregulação) são mais favoráveis ao começo do seu crescimento pós-natal (Vijil, 1989, Martin *et al.*, 2002, Thiéry *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003). Por outro lado, este mecanismo adaptativo permite que nas épocas em que as condições climatéricas são mais desfavoráveis, os nutrientes sejam direccionados preferencialmente para as funções fisiológicas essenciais à sobrevivência (Figura 1) (Álvaro, 2014).

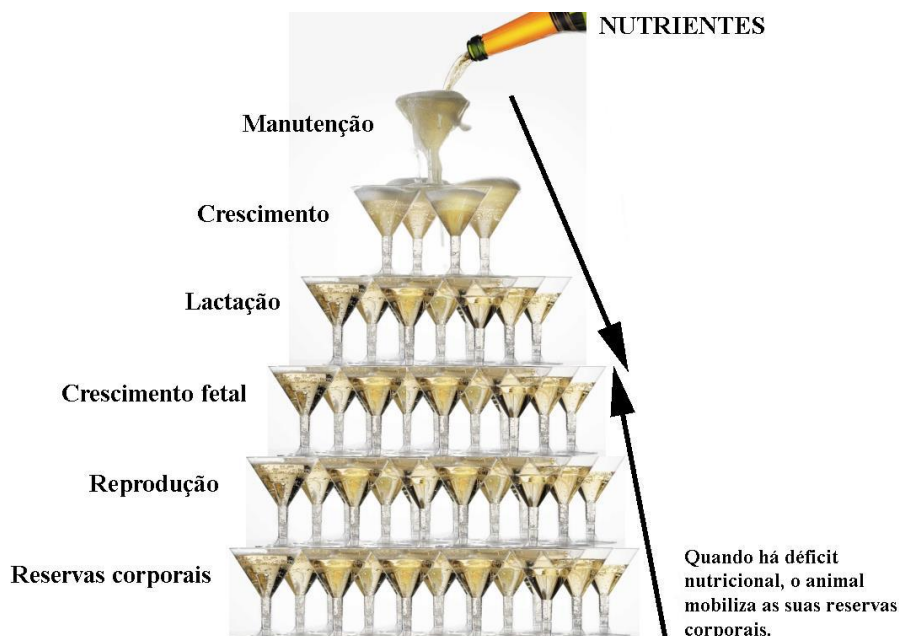


FIGURA 1 – Cascata de priorização da utilização de nutrientes (Álvaro, 2014).

Nos ovinos, a sazonalidade reprodutiva constitui frequentemente uma importante barreira ao seu manejo flexível (Vijil, 1989, Haresign, 1993 e Vincent *et al.*, 2000) e diminui a eficiência reprodutiva dos rebanhos comerciais (Vijil, 1989, Gates *et al.*, 1998, Vincent *et al.*, 2000 e El-Alamy *et al.*, 2001). Ainda que, geralmente, a sazonalidade reprodutiva se coadune perfeitamente às disponibilidades naturais de alimentos, os mercados têm normalmente muita dificuldade em absorver, em poucos meses, a produção total anual de carne fresca de borrego (Vijil, 1989 e Gates *et al.*, 1998).

O controlo da actividade reprodutiva é uma excelente ferramenta, uma vez que permite induzir a actividade ovárica durante a estação de anestro sazonal ou sincronizar os ciclos éstricos das várias ovelhas durante a estação reprodutiva. Por outro lado, possibilita um manejo reprodutivo mais eficiente, reduzindo os períodos improdutivo e criando lotes de borregos mais uniformes para venda. Na espécie ovina, este controlo pode ser realizado através de métodos naturais (*flushing*, “efeito macho” e tratamentos luminosos (Valentim *et al.*, 2015a, 2016a), e hormonais [melatonina, progesterona/progestagénios, prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) ou seus análogos sintéticos e/ou gonadotropinas]) que promovem uma modificação na cadeia fisiológica dos eventos envolvidos no ciclo sexual (Valentim *et al.*, 2015b).

Aliado ao controlo da actividade reprodutiva, a inseminação artificial (IA) incrementa o progresso genético dos efectivos, difundindo fácil e rapidamente o material genético de carneiros melhoradores (Valentim *et al.*, 2016b). A difusão desta técnica tem contado com alguns obstáculos como a composição das membranas espermáticas, as suas dificuldades de preservação e a anatomia do canal cervical das ovelhas (Valentim *et al.*, 2016b).

A associação do controlo da actividade reprodutiva e da IA oferece um grande potencial em termos de progresso genético e motiva a realização de estudos adicionais para melhorar ainda mais a sua eficiência e permitir o desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas.

O objetivo deste trabalho foi estudar a eficácia de dois tratamentos progestagénios curtos (FGA e MAP) + eCG sobre o controlo da actividade reprodutiva de ovelhas da raça portuguesa Churra Galega Bragançana. Simultaneamente procurou-se avaliar a eficácia da técnica de IA, utilizando sémen fresco ou refrigerado, diferentes diluidores – Andromed e INRA 96 – sobre a taxa de fertilidade.

# **I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1 - FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA OVELHA**

### **1.1 - Ciclo Éstrico**

Nas ovelhas, após o estabelecimento da puberdade, desenvolve-se um padrão rítmico de eventos fisiológicos que promovem alterações anátomo-morfológicas no tracto genital e comportamentais (Bearden e Fuquay, 1984; citados por Bettencourt, 1999). Este ciclo de mudanças é denominado de ciclo éstrico. Estas variações cíclicas são interrompidas apenas pela gestação ou por condições ambientais (anestro sazonal) e patológicas (Bearden e Fuquay, 1984; citados por Bettencourt, 1999).

As ovelhas apresentam um ciclo éstrico normal de 16-17 dias, com uma duração de 24-36 horas de cio e a ovulação ocorre perto do fim, entre 30 a 36 horas (Costa, 2007). Por diferentes motivos (sazonalidade, alimentação, saúde, entre outros), a duração da fase lútea nas ovelhas pode alterar-se, dando origem à regressão prematura do corpo lúteo (CL) – ciclos curtos – ou à anovulação levando, por consequência, à diminuição do ciclo éstrico (Hafez e Hafez, 2004). Os ciclos éstricos curtos são mais comuns nas estações de transição entre a estação de anestro e a estação reprodutiva (Fonseca, 2005). Já os ciclos longos são mais comuns na transição entre a estação de reprodutiva e a de anestro (Fonseca, 2005).

Nos períodos de transição entre estações reprodutivas e de anestro e durante o anestro são mais frequentes as ovulações silenciosas e os subestros (Valentim *et al.*, 2006).

O ciclo éstrico apresenta várias fases: pró-estro, estro, metaestro, diestro e anestro (Sebastian Lopez, 1989 e Hafez e Hafez, 2004). Porém, se consideradas as estruturas presentes no ovário, observam-se duas fases: fase folicular (2 a 3 dias), caracterizada pela presença de um ou mais folículos funcionais que produz estrogénios e uma fase luteínica (13 a 14 dias), definida pela formação de, pelo menos, um CL, responsável pela secreção de progesterona (Sebastian Lopez, 1989 e Hafez e Hafez, 2004).

A duração do ciclo éstrico, do cio e a ocorrência da ovulação, são variáveis, devido à influencia de factores como: a raça, a idade, o peso, a condição corporal, a alimentação, o estado fisiológico, o estado de saúde, o fotoperíodo, as condições climáticas, as relações sociais, entre outros (Padilha, 2007).

## 1.2 - Endocrinologia do Ciclo Éstrico

O controlo exercido pelo hipotálamo sobre a secreção de gonadotrofinas – FSH (Hormona Folículo-Estimulante) e LH (Hormona Luteinizante) –, feita pela hipófise anterior, é mediado pela Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH). Esta hormona é produzida e secretada por neurónios hipotalâmicos que alcançam a hipófise anterior através do sistema porta-hipotálamo-hipofisário (Eminência Mediana) (Bettencourt, 1999).

As secreções de GnRH são desencadeadas por estímulos externos (fotoperíodo, alimentação, condições climatéricas, factores sociais, entre outros) e internos (condição corporal, estado de saúde, produção hormonal, entre outros) (Haresign, 1993).

A secreção pulsátil de FSH é mais frequente do que a secreção pulsátil de LH. Porém, a secreção de LH está mais relacionada com a secreção de GnRH, a qual varia em função da fase do ciclo éstrico (ou do anestro) em que a fêmea se encontra (Perry, 1991). Uma descarga de FSH, não acompanhada de LH, estimula a mitose das células da granulosa, acarretando o crescimento do folículo, e a secreção folicular, com o concomitante aumento dos níveis circulantes de estrogénios (Raju *et al.*, 2013). A acção combinada da FSH e do estradiol é responsável pelo crescimento uniforme do folículo. À medida que a concentração de FSH se eleva, aumenta também o estímulo ao aparecimento de receptores de LH (Levi-Setti *et al.*, 2004).

No final da fase folicular, a secreção de FSH é afetada negativamente, devido à retroação negativa exercida pelos estrogénios e pela inibina, glicoproteína secretada a nível folicular (Abecia e Forcada, 2010). Nesse momento, os níveis de FSH descem progressivamente até atingirem um mínimo. A fase folicular, a acumulação de fluido folicular é um componente essencial ao desenvolvimento final do folículo, pois as células da granulosa segregam as quantidades de FSH necessárias à manutenção do crescimento e à maturação do folículo, quando a concentração plasmática de FSH já diminuiu (Levi-Setti *et al.*, 2004).

No final da fase folicular, o aumento dos níveis de estrogénios, associado a níveis basais de progesterona, promovem um efeito de retroacção positiva sobre o eixo hipotálamo-hipofisário, induzindo o pico pré-ovulatório de LH e um novo pico de FSH (Figura 2) (Downey, 1980; citado por Fernandes, 2008). A elevada concentração da LH provoca mudanças estruturais no folículo que culmina com a expulsão do oócito I (Perry, 1991) e com a luteanização das células da granulosa.

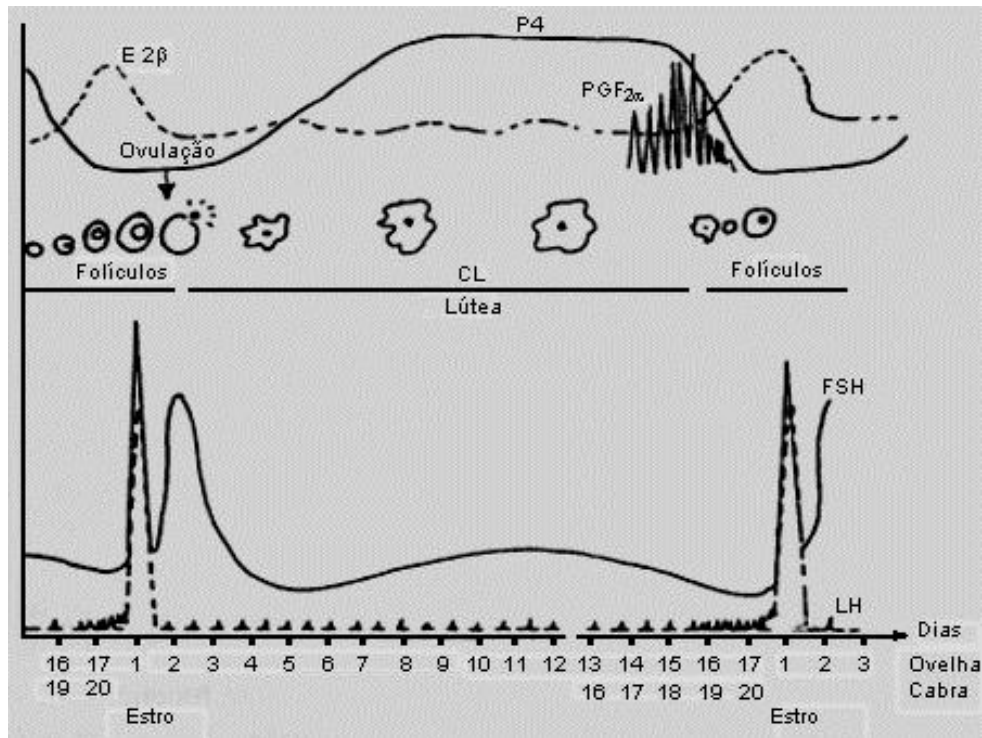


FIGURA 2 - Esquema representativo da secreção de hormônios ao longo do ciclo estrico na ovelha e na cabra (Chemineau *et al.*, 1993).

A formação do CL caracteriza a fase luteínica. Nesta fase, os níveis de progesterona elevam-se e actuam a nível do hipotálamo induzindo uma baixa frequência na libertação de GnRH e consequentemente de LH. Os níveis basais de estrogénios actuam na hipófise anterior diminuindo a sua capacidade de resposta à GnRH e, consequentemente, à síntese de gonadotrofinas. Este efeito de retroacção negativo dos estrogénios é potencializado pela progesterona (Hafez e Hafez, 2004).

Nas fêmeas dos ruminantes, a regressão do CL, caso não ocorra a gestação, leva os folículos em crescimento a segregar oxitocina que, por sua vez, estimula a libertação pulsátil de  $PGF_{2\alpha}$ , a partir do endométrio uterino (Bettencourt, 1999, Wathes e Lamming, 1995). A ligação da oxitocina aos receptores do endométrio estimula a produção de  $PGF_{2\alpha}$ , estabelecendo-se uma retroacção positiva entre a síntese de oxitocina e a síntese de  $PGF_{2\alpha}$ , de modo a assegurar a luteólise (Silvia e Raw, 1993).

Após a luteólise, diminuem os níveis de progesterona, o estradiol actua a nível hipotalâmico determinando um aumento da frequência pulsátil de GnRH que irá estimular a hipófise anterior a sintetizar gonadotrofinas, ditando o início de um novo ciclo estrico (Hafez e Hafez, 2004).

## 2 - SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM OVINOS

As ovelhas são fêmeas poliéstricas sazonais. Essa sazonalidade reprodutiva caracteriza-se por alterações comportamentais e endócrinas, que dão origem a uma alternância anual entre dois períodos distintos (Rosa e Bryant, 2003). Uma estação de reprodução, caracterizada pela sucessão de ciclos éstricos, caso não se desenvolva uma gestação e uma estação caracterizada pela cessação da atividade sexual (anestro) (Rosa e Bryant, 2003).

Nas regiões temperadas do globo terrestre, o fotoperíodo é o principal factor ambiental que afecta a sazonalidade reprodutiva. Nos ovinos o estímulo para a manifestação e/ou intensificação dos fenómenos reprodutivos ocorre quando há decréscimo no número de horas diárias de luz (fotoperíodo decrescente), pelo que são considerados poliéstricos sazonais de “dias decrescentes” (menores latitudes) ou de “dias curtos” (maiores latitudes) (Rosa e Bryant, 2003; Valentim, 2004). Desta forma, a atividade reprodutiva das fêmeas começa por volta do solstício de Verão e termina por volta do solstício de Inverno. Nos machos, o começo e o fim da maior ou menor produção (quantitativa e qualitativa) de sémen estão mais relacionados com os equinócios de Primavera e de Outono (Figura 3) (Valentim, 2004).

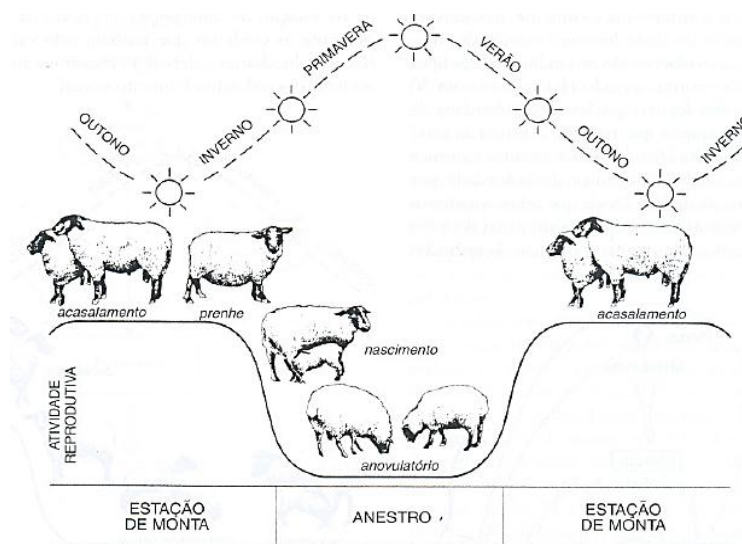


FIGURA 3 - Reprodução estacional da ovelha (Hafez e Hafez, 2004).

Tal como já foi anteriormente referido, o fotoperíodo é um dos principais factores condicionadores da sazonalidade nos ovinos. Contudo, a genética, a idade, o sexo, a alimentação, o estado nutricional, as condições climáticas e os factores sociais desempenham igualmente um papel relevante na regulação da atividade reprodutiva e

na profundidade do anestro sazonal (Sadler, 1969, Chemineau *et al.*, 1993, Pérez *et al.*, 1998; citados por Valentim, 2004).

A sazonalidade reprodutiva é uma característica adaptativa, pois ajusta os nascimentos ao período do ano em que as disponibilidades naturais de alimentos e as condições climáticas são mais adequadas ao início da lactação e ao desenvolvimento pré-natal final e pós-natal (Valentim, 2004). Desta forma, afecta positivamente a taxa de sobrevivência e o crescimento das crias (Valentim, 2004).

A sazonalidade é mais marcada nas raças ovinas originárias do Norte da Europa, onde as variações anuais do fotoperíodo são maiores, do que nas raças do Sul da Europa (Bodin *et al.*, 1999; citados por Romão, 2002). Nas regiões temperadas de maior latitude ( $> 45^\circ$ ) a sazonalidade é marcada fundamentalmente pelo fotoperíodo. Em regiões temperadas de menor latitude, a sazonalidade tende a ser cada vez menos marcada pelo fotoperíodo e mais pela alimentação (preditiva) e pela termorregulação. Já nas regiões tropicais ou subtropicais, a sazonalidade reprodutiva é pouco marcada e resulta essencialmente das disponibilidades presentes de alimentos (oportunistas), particularmente dependentes da pluviosidade (Hafez e Hafez, 2004 e Valentim *et al.*, 2004).

## **2.1 - Regulação Hormonal da Sazonalidade Reprodutiva**

Nos mamíferos, a informação luminosa (fotónica) é apenas captada pela retina e é transmitida, via nervosa, por etapas, até à glândula pineal (Sebastian Lopez, 1989, Malpaux *et al.*, 1996, Wehr, 2001, Forcada *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003).

Em primeiro lugar, a informação luminosa é transmitida directamente da retina aos núcleos supraquiasmáticos (NSC), por intermédio da via monossináptica retino-hipotalâmica (Malpaux *et al.*, 1996, Wehr, 2001, Barrett *et al.*, 2002 e Rosa e Bryant, 2003) ou indirectamente através de sinais emitidos a partir dos núcleos da rafe do mesencéfalo (Prosser, 2000) e do genículo hipotalâmico (Kohler *et al.*, 2000, Prosser, 2000 e Schwartz *et al.*, 2001). Os NSC localizam-se no hipotálamo anterior, mais precisamente na imediação dorsal (logo acima) do quiasma óptico (Hollander, 2001, Dauvilliers, 2002 e Kennaway, 2002). A partir destes núcleos, o sinal é transportado até ao núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN) (Malpaux *et al.*, 1996, Schwartz *et al.*, 2001, Wehr, 2001 e Miklós e Kovács, 2002), cujas células neurosecretoras funcionam como tradutores celulares que integram sinais estimuladores e inibidores (Miklós e

Kovács, 2002). Daí, o sinal segue para uma colónia de células intermédio-laterais situadas na medula torácica e, de seguida, para os gânglios cervicais superiores (Bartness *et al.*, 2001, Hollander, 2001 e Wehr, 2001). O sinal chega finalmente à glândula pineal, através dos neurónios simpáticos pós-ganglionares (Figura 4) (Borjigin *et al.*, 1999 Bartness *et al.*, 2001 e Kennaway, 2002).

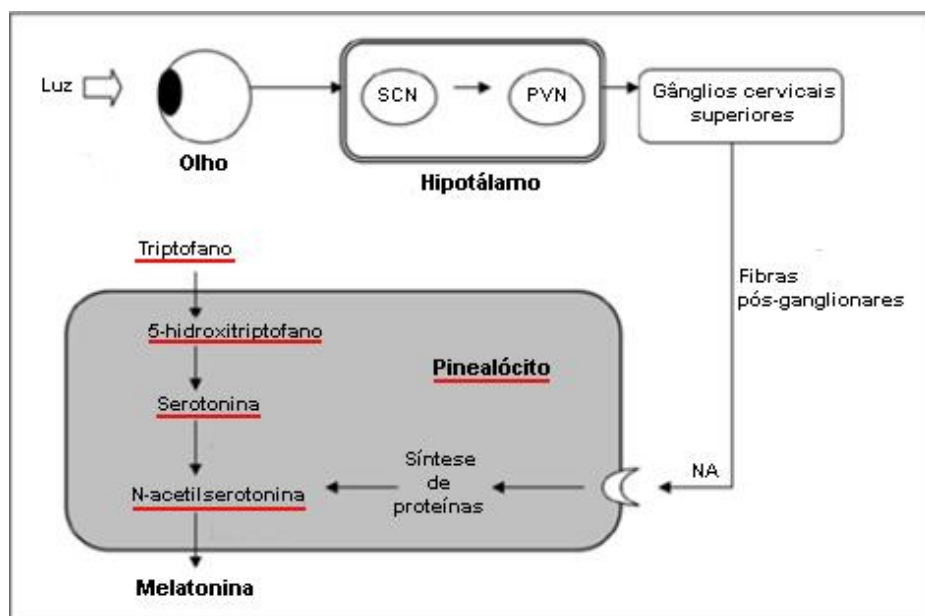


FIGURA 4 – Desenho esquemático dos principais mecanismos envolvidos na síntese de melatonina. A informação luminosa é percebida pela retina e é transmitida aos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ), gerador dos ritmos biológicos. O sinal é então passado para o núcleo hipotalâmico paraventricular (NPV). Sai do sistema nervoso central e segue para os gânglios cervicais superiores, antes de alcançar os receptores adrenérgicos (NA) pineais. AA-NAT: arilalkilamina-N-acetiltransferase e HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase (Adaptado de Arrent, 1998).

A secreção de melatonina processa-se durante a noite, ocorrendo a duração de maior produção quando o fotoperíodo é reduzido. A acção da melatonina é exercida através da duração do período de libertação de melatonina e pela fase de fotossensibilidade e não pela sua amplitude (Rosa e Bryant, 2003).

A melatonina afeta a reprodução quase exclusivamente via hipotálamo (GnRH) e hipófise (FSH e LH) (Souza *et al.*, 2008). Contudo, também tem efeitos directos sobre as gónadas (Valentim, 2004).

## **2.2 - Sazonalidade Reprodutiva nos Carneiros**

A sensibilidade dos machos ao fotoperíodo é diferente das ovelhas. Nas fêmeas, a ovulação cessa. Nos machos, a espermatogénese e a libido do carneiro não desaparecem, reduzem-se. Embora não haja cessação de produção espermática, notam-se alterações em parâmetros quantitativos e qualitativos dos testículos, da produção de testosterona, da produção espermática e da libido (Rosa e Bryant, 2003).

Nos carneiros, a atividade sexual é geralmente estimulada mais cedo do que nas ovelhas, em torno de 1-1,5 meses, permitindo que quando a actividade cíclica começar nestas últimas, os primeiros já atingiram um elevado nível de desempenho sexual. Esta antecipação é importante, pois, enquanto as fêmeas em anestro conseguem ovular em alguns (30-40) dias após a estimulação hormonal, os machos precisam de aproximadamente 49 dias só para completar o ciclo espermático (Rosa e Bryant, 2003).

Os carneiros da raça Churra Galega Bragançana apresentam uma sazonalidade reprodutiva pouco marcada (Valentim, 2004).

## **3 - CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA**

O controlo da actividade reprodutiva traz vantagens para a exploração animal, pois possibilita um maneio mais eficiente dos efectivos, reduz os períodos improdutivos e, quando associado à IA, incrementa o progresso genético (Valentim *et al.*, 2015a).

Nos ovinos, o controlo da actividade reprodutiva pode ser realizado sincronizando ou induzindo a actividade ovárica. Normalmente, a sincronização refere-se à concentração de número de fêmeas em estro num intervalo de tempo restrito (24 a 72 horas) durante a estação reprodutiva. Todavia, fora da estação de reprodutiva, quando as fêmeas estão em anestro sazonal, há necessidade de se induzir o estro (Fonseca, 2005).

Este controlo pode ser efectuado utilizando vários métodos desenvolvidos nas últimas décadas. Alguns deles envolvem a administração de hormonas exógenas, que alteram a cadeia fisiológica de eventos do ciclo sexual (Abecia *et al.*, 2011). Dentre estes está a administração de melatonina exógena, de progesterona ou seus análogos sintéticos – progestagénios – e/ou de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) ou seus análogos sintéticos. A administração de melatonina exógena simula o fotoperíodo de “dias curtos”. Já a progesterona/progestagénios e as  $PGF_{2\alpha}$  (ou seus análogos) alteram a duração da fase lútea do ciclo éstrico, enquanto os primeiros a prolongam, os segundos

reduzem-na. Outros métodos não incluem hormonas, considerados métodos naturais e – *flushing*, “efeito macho” e tratamentos luminosos (Abecia *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2006; e Valentim *et al.*, 2015a).

### 3.1 - Progestagénios

Os progestagénios são fármacos sintéticos análogos da progesterona (P<sub>4</sub>), geralmente mais potentes e que simulam o efeito desta hormona natural produzida pelo CL (Driancourt, 2012). Após a sua aplicação o aumento dos níveis circulantes de progestagénios inibem a secreção de LH, levando a mimetização de uma fase luteínica (Abecia *et al.*, 2012).

Nos pequenos ruminantes, a forma mais comum de administração dos progestagénios é a aplicação de esponjas vaginais impregnadas com análogos sintéticos de P<sub>4</sub>. A nível europeu, os mais utilizados são o acetato de fluorogestona (FGA) – 20 mg/esponja – e o acetato de medroxiprogesterona (MAP) – 60 mg/esponja (Abecia *et al.*, 2011). São utilizados tanto na sincronização como na indução da actividade ovárica de ovelhas em anestro (Koyuncu e Alticekic, 2010). Na estação de anestro, os tratamentos com progestagénios pré-sensibilizam o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas e melhoram o armazenamento e o transporte de espermatozóides no tracto genital feminino, a actividade ovárica, as manifestações de cio e a função lútea (Azevedo *et al.*, 2006).

Quando as esponjas são retiradas ocorre rapidamente uma elevação da secreção pulsátil de GnRH/LH, que estimula o crescimento folicular, o cio e a ovulação. Em cerca de 24-48 horas as ovelhas apresentam cio. A ovulação surge, normalmente, 48-72 horas pós-tratamento. Esse regresso rápido à actividade ovárica ocorre em resultado dos progestagénios possuírem uma semivida muito curta, por serem rapidamente metabolizados (Azevedo *et al.*, 2006 e Abecia *et al.*, 2012).

Comparativamente, alguns autores afirmam que o FGA tem uma semivida mais curta do que o MAP, permitindo um controlo mais preciso da actividade ovárica, particularmente importante quando há utilização da IA. Porém, outros autores demonstram que ambos produzem resultados indênticos (Dogan *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2006).

A duração do tratamento progestagénico é equivalente à duração natural da fase lútea. Os tratamentos com FGA devem estender-se por cerca de 12-15 dias e os com MAP por 10-16 dias, considerados tratamentos longos (Valentim *et al.*, 2006). Contudo,

durante a estação reprodutiva, a administração prolongada de progestagénios pode afetar negativamente o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, condicionando a secreção de GnRH/LH e os mecanismos foliculares e ovulatórios, diminuem as manifestações detectáveis de cio, prejudicam a formação de depósitos de espermatozóides no canal cervical e o transporte destes ao longo do tracto genital feminino, levando a uma diminuição da taxa de fertilidade (Azevedo *et al.*, 2006).

Uma forma de evitar esses efeitos negativos causados pelo tratamento longo é diminuir o tempo de permanência das esponjas vaginais, durante a estação reprodutiva – tratamento progestagénico curto (duração de 5-7 dias) (Abecia *et al.*, 2012). Esse período é inferior ao tempo normal de duração da fase lútea, tornando necessário a administração de prostaglandina (PGF<sub>2α</sub>) ou seus análogos sintéticos para induzir a luteólise no início do tratamento progestagénico (Letelier *et al.*, 2009 e Abecia *et al.*, 2012).

### **3.2 - Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>)**

Nos ruminantes, o factor luteolítico primário é a PGF<sub>2α</sub>. Quando administrada a ruminantes, esta hormona provoca a luteólise do CL e induz uma nova fase folicular (Abecia *et al.*, 2011).

A forma de administração da PGF<sub>2α</sub> é por injeção intramuscular ou subcutânea, com menores efeitos sobre o bem-estar dos animais, quando comparado com a colocação dos dispositivos intravaginais. A eliminação de resíduos químicos é reduzida ou nula, uma vez que são rapidamente e quase totalmente metabolizadas (Abecia *et al.*, 2011).

Para que a PGF<sub>2α</sub> e seus análogos sintéticos sejam eficazes é necessário existir um CL funcional, ou seja, com receptores para esta hormona. Nos ovinos, eles tendem a surgir a partir do terceiro dia do ciclo éstrico, embora a sua plenitude funcional só ocorra no quinto dia (Moraes *et al.*, 2008). Portanto a aplicação deste tratamento em fêmeas na fase folicular ou lútea precoce ou tardia ou em fase de anestro é totalmente ineficaz (Abecia *et al.*, 2012).

Num grupo de ovelhas existem, seguramente, fêmeas em fases distintas do ciclo éstrico. Logo, a administração de apenas uma injeção de PGF<sub>2α</sub> não é suficiente para sincronizar a actividade ovárica de todas elas. Por conseguinte, é necessária a administração de duas injeções com intervalos de 9-10 dias, pois todos os animais terão CL funcionais quando da segunda administração, respondendo ao tratamento, e

desta maneira estarão todas na fase inicial do ciclo éstrico (Abecia *et al.*, 2012). O uso de PGF<sub>2α</sub> é obrigatória em tratamentos progestagénios curtos (5-7 dias) (Azevedo *et al.*, 2006).

### 3.3 - Gonadotrofina Coriónica equina

A gonadotrofina coriónica equina (eCG) é produzida pelas células trofoblásticas do embrião com 40-130 da gestação. Possui acção semelhante, simultaneamente, às gonadotropinas – FSH (80%) e LH (20%) (Barret *et al.*, 2004).

Na ovelha, a eCG eleva a taxa de ovulação pelo recrutamento de folículos antrais pequenos e eleva a sua taxa de crescimento (Driancourt e Frick, 1992; citado por Uribe-Velásquez *et al.*, 2010).

A eCG por si não permite o controlo da actividade reprodutiva, mas quando associada a tratamentos com progestagénios ou com PGF<sub>2α</sub> melhora a resposta ovárica, aumentando as taxas de fertilidade e de prolificidade e ainda diminuindo os efeitos negativos causados pelos tratamentos progestagénicos longos (Evans e Robinson 1980).

Possui uma semivida longa – até 3 dias (Murphy e Martinuk, 1991), devido à sua elevada concentração de ácido siálico (Hafez e Hafez, 2004). Alguns autores sugerem que a aplicação da eCG deve ser feita quando da retirada das esponjas vaginais. Outros recomendam que esta seja administrada 24-48 horas antes do fim do tratamento progestagénico (Azevedo *et al.*, 2006 e Abecia *et al.*, 2012), particularmente no caso das malatas (Valentim, informação pessoal 2017).

Nos ovinos, existem duas vias de administração da eCG (intramuscular e submucosa vulvar). Estas vias foram comparadas por Antunes-Melo *et al.* (2015), não tendo estes autores encontrado qualquer diferença estatisticamente significativa quanto à manifestação e à duração do cio.

Nas ovelhas, as doses de eCG variam de 250-750 UI (Boland *et al.*, 1981; citados por Abecia *et al.*, 2012). Abecia *et al.*, (2012) propõem que estas doses mudem com a idade (250-300 UI, em cordeiras e 350-500 UI, em ovelhas adultas) e com a estação reprodutiva (400-500 UI, durante o anestro e 300-350 UI, durante a época de reprodução). Para a indução de superovulações as doses deverão ser próximas das 750 UI. (Azevedo *et al.*, 2006).

Segundo alguns autores, o uso frequente de eCG pode originar o aparecimento de um estado refractário a esta hormona, provavelmente devido à formação de anticorpos

específicos. Este estado promove uma diminuição de fertilidade, ditada pelo atraso nas manifestações de cio e pela inibição da actividade ovárica (Maurel *et al.*, 2003). Outros autores afirmam que se podem aplicar vários tratamentos com eCG sem que ocorra a formação de anticorpos específicos (Maurel *et al.*, 2003 e Azevedo *et al.*, 2006).

Em todos os protocolos anteriormente referidos, a eCG pode ser substituída pela gonadotrofina Coriónica equina (hCG) (com um efeito mais LH do que FSH) para aumentar a taxa de ovulação e a viabilidade do CL (Valentim, 2004).

#### 4 - INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM OVINOS

A inseminação artificial é uma técnica que conduz à melhoria do potencial genético dos efectivos, uma vez que permite acelerar o melhoramento genético através do uso de reprodutores de alto valor genético ou com características desejáveis, sem necessidade de aquisição dos mesmos, em virtude de que um ejaculado permite inseminar várias fêmeas (Hafez e Hafez, 2004). Possibilita também o uso de reprodutores já mortos ou incapacitados fisicamente e reduz o risco de propagação de doenças venéreas (Hafez e Hafez, 2004). Para que estas vantagens sejam alcançadas é necessário que esta técnica seja realizada adequadamente, por meio de grupos de trabalho qualificados (Hafez e Hafez, 2004).

Nos ovinos, a técnica de IA é dificultada pela complexa estrutura interna do cérvix – canal cervical. O canal cervical é um tubo fibroso, cujo lúmen é tortuoso (Figura 5) devido à presença de anéis em número de 3-7, que se encontram desalinhados (Kershaw *et al.*, 2005).



FIGURA 5 – Fotografia da cérvix de ovelha da raça Santa Inês seccionada longitudinalmente evidenciando os anéis cervicais, junto com seu respectivo molde de silicone (Franco *et al.*, 2014).

Em geral, o segundo ou o terceiro anel situam-se fora do alinhamento com o primeiro, formando uma barreira física contra contaminantes externos (Kershaw *et al.*, 2005).

Estas características anatômicas impossibilitam a passagem do “*pistolet*” de inseminação e impedem a deposição profunda do sémen. Quanto maior a profundidade da deposição do sémen, maiores são as taxas de fecundação (Kershaw *et al.*, 2005).

Além desta característica específica, existem importantes variações quanto ao formato do orifício cervical externo entre fêmeas. Kershaw *et al.* (2005) num estudo da anatomia do colo do útero de ovelhas identificaram cinco tipos de orifícios externos (Figura 6).

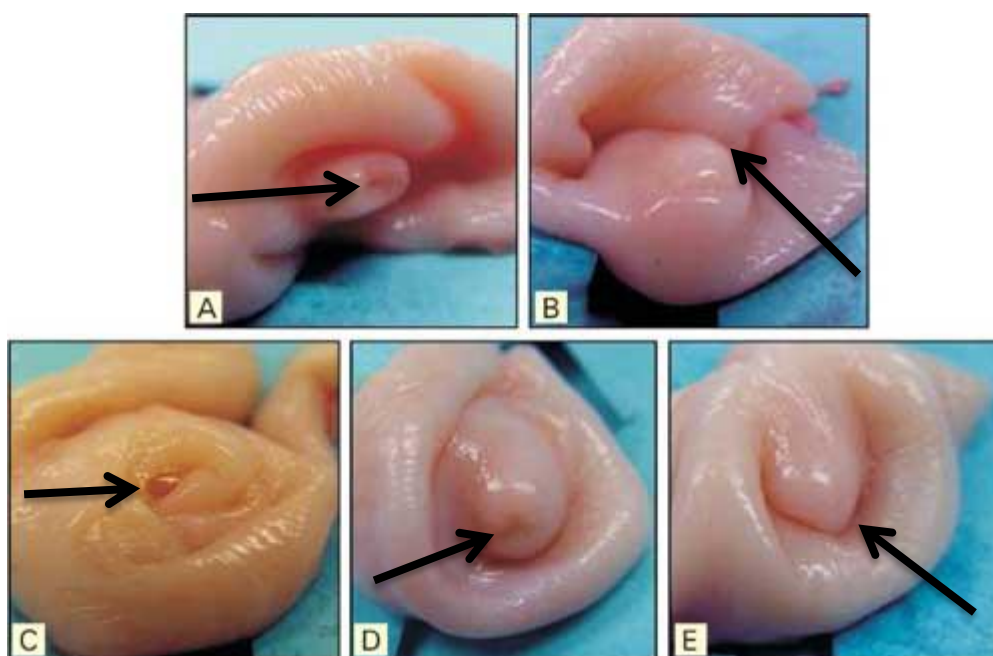


FIGURA 6 - Classificação da aparência da entrada no os cervical externo da ovelha (Kershaw *et al.*, 2005, Aral, Temamoğullar e Aral, 2011).

- A - Bico de pato: duas dobras opostas de tecido cervical com uma fenda horizontal central como orifício externo.
- B - Fenda: sem protruções na vagina anterior com uma fenda como a abertura dando entrada para o canal cervical.
- C - Rosa: um conjunto de dobras cervicais que se projetam na vagina anterior obscurecendo o orifício externo.
- D - Papila: uma papila que sobressai na vagina anterior com o orifício externo em seu ápice.

**E - Aba:** uma dobra do tecido cervical que se projeta na vagina anterior e sobrepõe completamente ou parcialmente o orifício externo criando o aspecto de uma aba.

De acordo com Kershaw *et al.* (2005), o tipo de orifício externo difere com a idade da fêmea. O tipo rosa é mais comum em ovelhas múltíparas, mais velhas. Enquanto o tipo papila é mais comum em ovelhas nulíparas. Estes autores admitem que o tipo do orifício cervical possa mudar com o parto, aumentando de tamanho e de complexidade. Esta alteração anatômica pode ser consequência do prolapso do primeiro anel cervical em ovelhas múltíparas. Os tipos mais apertados, tais como a papila, tornam-se mais esticados durante o parto e subsequentemente a sua conformação é alterada durante o processo de involução.

#### **4.1 - Técnicas de Inseminação Artificial em Ovinos**

As técnicas de IA variam de acordo com o local de deposição do sémen (Chemineau *et al.*, 1993). Na inseminação vaginal, o sémen é depositado no fundo do saco vaginal, sem qualquer tentativa de localização do canal cervical. Na inseminação cervical, o sémen é depositado dentro do canal cervical, o mais profundamente possível. Estas duas técnicas são consideradas simples, empregando-se um fórceps com fonte de luz fria que permita a abertura vaginal e a visualização da entrada no cérvix (Abecia e Forcada, 2010). Nestas duas técnicas, o uso de sémen fresco ou refrigerado resulta em taxas de fertilidade satisfatórias. Porém, as taxas de fertilidade obtidas com sémen congelado tendem a ser não aceitáveis (Bicudo *et al.*, 2005 e Faigl *et al.*, 2012). A inseminação transcervical implica o uso de fármacos e/ou de equipamentos que procuram alargar o canal cervical e facilitar a ultrapassagem das pregas cervicais (Abecia e Forcada, 2010).

Na técnica de inseminação intra-uterina por laparoscopia, o sémen é depositado directamente no lúmen dos cornos uterinos, num ponto próximo do oviducto. Esta necessita de uma intervenção cirúrgica – laparoscopia ou laparotomia –, equipamentos laparoscópicos ou cirúrgicos e de conhecimentos técnicos especializados (Abecia e Forcada, 2010). Contudo, permite obter taxas de fertilidade mais elevadas com o uso de sémen criopreservado e tem potencial para facilitar a disseminação generalizada de génotipos notáveis (Faigl *et al.*, 2012). Permite ainda utilizar um menor número de

espermatozóides por dose seminal. Tem como grande desvantagem a criação de aderências uterinas (Abecia e Forcada, 2010).

## **5 - AVALIAÇÃO DO SÉMEN**

### **5.1 - Características Macroscópicas do Sémen**

#### **5.1.1 - Volume**

O volume do ejaculado é avaliado através de um tubo coletor graduado colocado na extremidade do cone da vagina artificial. O volume de ejaculado no carneiro varia entre 0,5 e 2,0 ml. A leitura é feita sem ter em conta a parte espumosa do ejaculado (Evans e Maxwell, 1987, Artiga *et al.*, 1995, Mylne *et al.*, 1997 e Paulenz *et al.*, 2002; citados por Romão 2002).

#### **5.1.2 - Cor e Cheiro**

O sémen de carneiro tem normalmente uma coloração de branca a pérola, considerando-se existir qualquer anormalidade caso apresente colorações e cheiros anormais (Bettencourt, 1999). A cor rosada indica a presença de sangue. A amarelada (com duas fases de densidade) contaminado por urina, tendo neste último caso um cheiro característico a urina (Evans e Maxwell, 1987; Artiga *et al.*, 1995; Ax *et al.*, 2000 citados por Romão, 2002). Contudo, o sémen pode ter uma cor amarela devido apenas à presença de elevados teores de carotenos (inofensivos para o sémen). Finalmente, a cor amarela pode ser indicativa de uma infecção no tracto genital masculino (Chemineau *et al.*, 1993).

#### **5.1.3 - Consistência ou Densidade**

A avaliação visual da concentração de espermatozóides através da densidade (Quadro I) pode ser uma técnica utilizada, porém, é pouco rigorosa (Chemineau *et al.*, 1993).

QUADRO I – Estimativa da concentração espermática através das características de densidade (Evans e Maxwell, 1987).

<b>Características</b>	<b>Espermatozóides por ml (x 10<sup>9</sup>)</b>
Transparente, Aquoso	Insignificantes
Turvo	0,3-1,0
Leitoso	1,0-2,5
Creoso/líquido	2,5-3,5
Creoso	3,5-4,5
Creoso espesso	4,5-6,0

## **5.2 - Características Microscópicas do Sêmen**

### **5.2.1 - Concentração**

A concentração espermática pode ser estimada num microscópio de contraste de fase, com platina aquecida, e uma câmara de Neubauer ou através de métodos mais precisos como: um hemocitômetro, um espectrofotômetro, que mede a concentração através da absorvância da luz ou de um sistema CASA (computer-assisted sêmen analysis) (Bettencourt, 1999).

No hemocitômetro, a concentração é determinada pela contagem microscópica do número de espermatozóides contidos numa câmara com volume e diluição conhecidos (Chemineau *et al*, 1993).

A contagem por espectrofotômetro por comprimento de onda de 540 a 550 nm é determinada após comparação com uma tabela padrão definida através de contagens em câmaras de Neubauer (Chemineau *et al.*, 1993) ou com o hematocitômetro (Chemineau *et al*, 1993). Como o sêmen de carneiro é muito concentrado, é necessário fazer uma diluição de 1:100 a 1:400 com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% e 0,02% de formalina (Artiga *et al.*, 1995).

O método mais rigoroso de avaliação da concentração é o sistema CASA, que continua a ter custos elevados (Ehlers *et al.*, 2011).

### **5.2.2 - Motilidade Massal**

Esta é uma medição rápida e simples que requer um exame microscópico do ejaculado, logo que recolhido. Uma gota do ejaculado puro é depositado sobre uma

lâmina de vidro (37-38°C) utilizando-se de uma ampliação de 80 X (Chemineau *et al*, 1993).

QUADRO II – Sistema de classificação para motilidade massal do sémen ovino

Escala	Nelson e Lin (1983)	Chemineau <i>et al.</i> , (1993)
	Descrição	Descrição
5	Movimento vigoroso, agitado e em turbilhão. Movimentos podem ser vistos “a olho desarmado”	Muito bom
4	Movimentos de massa activos, sem o vigor de 5).	Bom
3	Movimentos massivos lentos, sem turbilhão.	Normal
2	Movimento individual, pouco movimento de massa.	Pobre
1	Muito sémen, mas essencialmente não há movimento.	Muito pobre
0	Sem movimento	Morto

Quando observado ao microscópio, o ejaculado apresenta um movimento em turbilhão, denominado correntemente de movimento de onda. A avaliação é feita com base no vigor das ondas. Aplica-se uma escala (Quadro II) que varia de 0 (nenhum movimento) a 5 pontos (movimento muito intenso) (Chemineau *et al*, 1993 e Bettencourt, 1999).

### 5.3 - Motilidade Individual

Para estimar a motilidade individual determina-se, por observação microscópica, sobre uma platina aquecida (37°C), de uma gota de sémen diluído em soro fisiológico isotónico, colocada entre uma lâmina de microscópio e uma lamela (Bettencourt, 1999).

Para que a motilidade individual seja avaliada corretamente é necessário que o sémen esteja suficientemente diluído e que a técnica de colheita e de manutenção do ejaculado tenham sido efectuadas corretamente, uma vez que a motilidade é afetada por factores como o choque térmico e a contaminação por urina (Sharkey *et al.*, 2001; citados por Romão, 2002). Considera-se uma motilidade aceitável quando 40% dos espermatozóides apresentam movimento progressivo (Kimberling e Marsh, 1997; citados por Romão, 2002).

Os movimentos de rotação, circulares, oscilantes ou convulsivos não são movimentos considerados normais (Chemineau *et al*, 1993).

#### **5.4 - Morfologia**

Existem várias técnicas de avaliação da morfologia dos espermatozóides. Todavia, a mais utilizada, em trabalhos de campo, consiste na coloração vital de eosina/negrosina (Chemineau *et al*, 1993).

Através da avaliação da morfologia pode ser determinada a percentagem de formas anormais encontradas num ejaculado. A morfologia anormal dos espermatozóides pode ser classificada em: cabeças anormais e soltas, gotas citoplasmáticas unidas à parte anterior, média ou distal da peça intermédia, caudas enroladas ou dobradas, entre muitas outras anormalidades (Chemineau *et al*, 1993).

Uma percentagem de espermatozóides anormais superior a 20% influencia a fertilidade e não devem ser utilizadas em inseminação artificial (Hafez e Hafez, 2004).

### **6 - CONSERVAÇÃO DO SÉMEN**

Não há como desvincular o avanço da IA com a necessidade de evoluir das técnicas de colheita, de manipulação e principalmente de conservação do sémen (Maxwell e Watson, 1996).

O principal objetivo é encontrar métodos que ampliem o período de conservação e mantenham a capacidade fecundante dos espermatozóides. Para a correcta fecundação do oócito, o espermatozóide tem de manter atributos básicos como um bom metabolismo energético, uma boa motilidade progressiva, uma boa integridade acrossómica e uma adequada porção proteica e fosfolípida da membrana (Squires *et al.*, 1999; citados por Alberti, 2007).

A preservação do sémen é fundamental à sua conservação por períodos de tempo limitados ou “ilimitados”, facilitando a promoção da difusão de material genético de elevado valor, no tempo e no espaço, eliminando os custos de transporte, de manutenção e de manuseamento dos machos (de Souza Castelo *et al.*, 2008).

A criopreservação expõe as células espermáticas a diferentes situações de *stress* (Maxwell e Watson, 1996). As grandes mudanças de temperatura podem induzir danos às membranas celulares, provavelmente causando alterações na disposição dos seus constituintes, ocasionando alterações na seletividade da permeabilidade da membrana

(Maxwell e Watson, 1996). Os espermatozóides têm ainda de enfrentar a formação de cristais de gelo pontiagudos que provocam rupturas nas membranas espermáticas e o *stress* osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor (Medeiros *et al.*, 2002). Os espermatozóides que conseguiram ultrapassar estes problemas têm ainda que ser capazes de superar o *stress* da descongelação (Maxwell e Watson, 1996).

A susceptibilidade aos danos da criopreservação varia entre espécies e está correlacionada com a composição fosfolipídica da membrana espermática. Animais que produzam concentrações reduzidas de esteróides e concentrações elevadas de ácidos gordos polinsaturados são mais predispostos aos danos causados pelo choque térmico (Darin-Bennett *et al.*, 1973; citados por Alberti, 2007).

O sémen de ovino apresenta grande sensibilidade ao choque térmico e calcula-se que 40-50% dos espermatozóides não sobrevivam ao processo de congelação/descongelação, mas aqueles que sobrevivem mantêm a sua capacidade fertilizadora (Maxwell e Watson, 1996 e Watson, 2000).

Depois de ejaculados, os espermatozóides sofrem algumas mudanças estruturais, do material genético, bioquímicas e da estrutura das membranas espermáticas que os tornam capazes de se fundir com o oócito. Elas ocorrem durante os processos de maturação, capacitação e reacção acrossómica (Maxwell e Watson, 1996). O processo de congelação/descongelação antecipam alterações semelhantes à da capacitação, encurtando a vida fértil das células espermáticas (Maxwell e Watson, 1996). Deste modo, quando utilizados na inseminação artificial cervical, eles podem possuir um tempo de vida fértil curto e não alcançar o oócito em condições fertilizantes. Contudo, quando depositados no útero ou no oviducto, resultam em altas taxas (85-93%) de fertilidade (Maxwell e Watson, 1996).

A única maneira de promover a deposição do sémen no útero é por laparoscopia ou laparotomia, aumentando marcadamente os seus custos e o impacto sobre o bem-estar animal. Deste modo, a IA com sémen fresco ou refrigerado, porque requerem menores recursos humanos e materiais, tornam-se numa realidade mais aceitável em explorações que procuram começar a aderir a esta técnica reprodutiva (Bicudo *et al.*, 2003).

## 6.1 - Sémen Refrigerado

O sémen refrigerado de ovino é armazenado na forma líquida, através da redução da sua temperatura, após a sua correcta diluição. O arrefecimento leva a célula a um estado de quiescência, reduzindo o metabolismo e proporcionando uma diminuição nos gastos energéticos e na formação de resíduos tóxicos, contribuindo para a preservação das células, possibilitando o aumento do tempo de armazenamento e de utilização (Watson, 2000 e Câmara e Guerra, 2011).

A redução da temperatura do sémen diluído deve ser feita de maneira constante e homogénea, uma vez que a queda brusca da sua temperatura provoca o choque térmico, letal para as células espermáticas. A diminuição de temperatura de forma muito lenta também pode resultar na diminuição da viabilidade espermática (Medeiros *et al.*, 2002). A redução da temperatura deve ser progressiva, sendo necessárias, pelo menos, 1 a 1.30 horas para atingir os 15°C e 2 a 3 horas, para alcançar os 5°C (Maxwell e Watson, 1996).

As temperaturas de armazenamento mais frequentes são de 15°C ou 5°C (Abecia e Forcada, 2010). Estas se diferenciam no tempo de conservação. A 15°C, o sémen de ovino possui um curto período de conservação – 6 a 12 horas –, enquanto que o sémen a 5°C pode ser conservado por um período de tempo mais longo – 12 a 24 horas (Fernandez-Abella *et al.*, 2003 citados por Naim *et al.*, 2009). O limite de 24 horas não deve ser ultrapassado, uma vez que é o limite em que os níveis de fertilidade se mantêm aceitáveis na inseminação cervical (Menchaca *et al.*, 2005; Fernandez-Abella *et al.*, 2003 citados por Naim *et al.*, 2009).

O'Hara *et al.* (2010) avaliaram a viabilidade espermática do sémen de carneiros refrigerado a 5°C ou a 15°C e armazenado até 72 horas após a colheita. De acordo com os resultados, o sémen refrigerado da 5°C manteve a viabilidade espermática no período de 24 a 72 horas. Porém, passadas 24 horas, estes autores verificaram uma queda na proporção de espermatozoides vivos observada. Por seu turno, o sémen refrigerado a 15°C apresentou um declínio linear na viabilidade espermática logo após as primeiras 12 horas de armazenamento.

As doses seminais para inseminar com sémen refrigerado devem conter, por dose de inseminação, entre: 320 – 350 x 10<sup>6</sup> ou 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis (Chemineau *et al.*, 1993) ou 200 x 10<sup>6</sup> – 400 x 10<sup>6</sup> espermatozóides viáveis (Cseh *et al.*, 2012). Num estudo realizado por Naim *et al.* (2009), para avaliar a inseminação cervical

com sémen de carneiro refrigerado a 5°C, comparando duas doses seminais (150 ou 300 milhões de espermatozóides), armazenadas pelo período de 12 horas, obtiveram taxas de gestação superiores quando foram usadas as doses de 300 milhões (38%) do que as de 150 milhões (25%).

O armazenamento do sémen a 5°C promove a redução no metabolismo dos espermatozóides, economiza as suas reservas energéticas e garante a conservação da motilidade. A preservação seminal a 15-20°C mantém a actividade celular “elevada”, tornando os espermatozóides mais sensíveis aos metabólicos tóxicos (Decuadro-hansen, 2004).

## **6.2 - Sémen Fresco**

Nos ovinos, o uso do sémen fresco na IA cervical requer pouca sofisticação e gera taxas de gestação muito satisfatórias. Porém deve ser utilizado no menor tempo possível pós-colheita (1 hora), devido ao curto período de vida dos espermatozóides assim conservados. Nestas condições, a motilidade e a viabilidade espermáticas reduzem-se rapidamente (O’Hara *et al.*, 2010). Ocorre a acumulação de catabolitos provenientes da actividade metabólica dos espermatozoides, que acabam por se tornar tóxicos para os mesmos (Rojero *et al.*, 2009).

Na produção de energia, os espermatozóides são capazes de oxidar a frutose presente no plasma seminal (ou até a glicose) produzindo CO<sub>2</sub> sob condições aeróbicas. Também são capazes de metabolizar estes açúcares em ácido láctico, em condições anaeróbicas. Se a concentração de CO<sub>2</sub> for demasiado elevada no meio de diluição, pode ocorrer uma inibição temporária da motilidade do esperma. A produção elevada de elevados níveis de ácido láctico pode afectar irreversivelmente o esperma. Outros substratos podem ser utilizados pelos espermatozóides, tais como o ácido láctico, o pirúvico e o acético, o glicerol e o sorbitol (Chemineau *et al.*, 1993).

## **7 - DILUIDORES**

Nos ovinos, o reduzido volume do ejaculado (0,5-2,0 ml) e a alta concentração espermática ( $2-5 \times 10^9$  espermatozóides/ml), determina o uso de diluidores para aumentar o volume total do ejaculado e assim obter mais doses seminais (Gonçalves *et al.*, 2001). Além de aumentar o volume, os diluidores devem fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático, ter capacidade tampão e osmolaridade

adequadas e devem interagir com o sémen, proporcionando proteção às diferentes estruturas do espermatozóide durante o arrefecimento ou a congelação/descongelação e inibir o crescimento bacteriano e fúngico (Araújo *et al.*, 2016).

Para que as células espermáticas possam sobreviver, quando expostas a temperaturas não fisiológicas (muito baixas), a presença de um composto crioprotetor no diluidor é essencial. Estes agentes podem ser classificados como não penetrantes e penetrantes. Os crioprotectores não penetrantes actuam contra o desequilíbrio osmótico, promovendo a desidratação parcial dos espermatozoides pela acção osmótica do meio hipertónico, ou seja, eles agem no meio extracelular, reduzindo assim a possibilidade da formação de cristais de gelo pontiagudos intracelular (Bittencourt *et al.*, 2013; Maxwell e Salamon, 1993). Os diluidores mais testados são feitos à base de glicina-gema, glicina-gema-leite, água de côco, citrato-açúcar, gema, leite ou leite desnatado, lactose, sacarose, rafinose e os formulados a base de Tris-gema de ovo (Salamon e Maxwell, 2000; citados por Bittencourt *et al.*, 2013).

Os crioprotectores penetrantes são substâncias que têm a capacidade de penetrar no interior da célula espermática. Destes, o mais utilizado é o glicerol. O efeito intracelular do glicerol é exercido através da sua capacidade de ultrapassar a membrana celular, substituir parcialmente a água intracelular, necessária à manutenção do volume celular, e reduzir o seu ponto de congelação evitando a sua cristalização pontiaguda. O glicerol tem sido o crioprotetor mais usado na criopreservação de sémen de ovino, embora muitos autores refiram que ele tem efeitos tóxicos sobre as células espermáticas, dependendo da sua concentração (Bittencourt *et al.*, 2013). Segundo Salamon e Maxwell 2000 citados por Bittencourt *et al.*, 2013 a melhores taxas de sobrevivência espermática são conseguidas quando não se ultrapassa os 2-4% de glicerol no diluidor.

Outro ponto crítico é a taxa de diluição. Esta depende das características do ejaculado (particularmente do volume, da motilidade e da concentração espermática) e do número de espermatozoides viáveis que se quer em cada dose seminal (Bicudo *et al.*, 2003).

As elevadas taxas de diluição resultam em baixa viscosidade devido à baixa concentração espermática, o que facilita a ocorrência de refluxo após a deposição da dose seminal no canal cervical. Uma proporção de diluição desejável para concentrações entre  $300-400 \times 10^6$  é de 1:1, nesta situação metade da dose inseminante será constituída por sémen e a outra metade por diluidor. Contudo, os carneiros com

elevadas concentrações espermáticas possibilitam o uso de proporções de diluição mais altas (1:2 a 1:4) (Bicudo *et al.*, 2003).

Após a diluição é necessário um período de equilíbrio. Este período de tempo a uma temperatura de equilíbrio, que varia de espécie para espécie, é necessária à ocorrência da diminuição do metabolismo espermático e ao início das interações com os componentes do diluidor (Watson, 1979; citado por Alberti, 2007).

## **II-TRABALHO EXPERIMENTAL**

### **1 – MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança, mais precisamente na Quinta do Pinheiro Manso (Latitude 41° 48' 33''N, Longitude 6° 44' 3''W e Altitude 670 metros), pertencente à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA-IPB), entre 4 de Abril e 8 de Julho 2016.

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

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

#### **1.1 – Animais**

Neste trabalho foram utilizadas 68 ovelhas adultas da raça Churra Galega Bragançana pertencentes ao rebanho experimental do Instituto Politécnico de Bragança-Escola Superior Agrária (IPB-ESA), com idades compreendidas entre os 2-8 anos. A última parição tinha ocorrido cerca de 6 meses antes.

#### **1.2 – Avaliação da Actividade Ovária**

A actividade ovária das ovelhas 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, ou seja, do plasma sanguíneo, que foi pipetado para tubos de Eppendorf devidamente identificados, que de seguida foram congelados numa arca ultracongeladora (-70°C) (Thermo Electron Cooperation, Marlotta, EUA).

Posteriormente foram determinados os níveis plasmáticos de  $P_4$  através da técnica de RIA (radioimunoensaio). O teste de RIA foi feito com recurso a um leitor de cintilações DPC® Gamma C12, segundo a técnica indicada pelo fabricante dos *kits* (DiaSource ImmunoAssays, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 5,5 e 12,1%.

### 1.2.1 – Avaliação da Ciclicidade Pré-tratamentos

Nas primeiras duas semanas de ensaio (4 e 18 de Abril), com o objectivo de determinar o estado fisiológico inicial (ciclicas ou anestro) das ovelhas, procederam-se a colheitas de amostras de sangue, com 3-4 dias de intervalo, realizadas sempre no período da manhã. A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.2.

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

### 1.2.2 – Avaliação da Resposta Ovária aos Tratamentos

Com o intuito de identificar a formação do primeiro CL pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG, nos cinco dias pós-administração de eCG procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para posterior determinação dos níveis plasmáticos de progesterona. 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 progesterona ultrapassaram, pela primeira vez, os 0,5 ng/ml.

### 1.3 – Tratamentos Aplicados

No dia 20 de Abril, as ovelhas foram divididas em dois grupos – FGA (n = 34) e MAP (n = 34) (Quadro III).

QUADRO III – Divisão das ovelhas segundo os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva

<b>Total (n = 68)</b>	
<b>FGA + 100 µg de cloprostenol</b> (n = 34)	<b>MAP + 100 µg de cloprostenol</b> (n = 34)
<b>Remoção das esponjas vaginais</b> + <b>500 UI eCG</b>	

As ovelhas do grupo FGA foram tratadas com esponjas vaginais impregnadas com 20 mg de FGA (Acetato de Fluorogestona; Chrono-Gest<sup>®</sup>, Intervet, Portugal) e as ovelhas do grupo MAP com 60 mg de MAP (Acetato de Medroxiprogesterona; Sincro-Gest<sup>®</sup>, Laboratorios Ovejero, Espanha). Nessa altura, todas as ovelhas foram injectadas intramuscularmente com 100 µg de cloprostenol (Estrumate<sup>®</sup>, MSD Animal Health, Portugal) – análogo sintético da prostaglandina.

O tratamento progestagénico teve a duração de 7 dias. Quando da remoção das esponjas vaginais (27 de Abril), as ovelhas receberam uma injeção intra-muscular de 500 UI de eCG/ovelha (Intergonan<sup>®</sup>, Intervet, Portugal).

Durante o período de tratamento, uma das ovelhas tratadas com uma esponja vaginal impregnada com FGA perdeu-a, pelo que ela foi excluída do estudo.

#### **1.4 – Recolha de Sémen**

O sémen foi recolhido com recurso a vaginas artificiais pré-aquecidas a 42°C (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) e ao uso de uma ovelha em cio induzido com 5 ml de uma solução oleosa de 17 β estradiol. Foram recolhidos quatro ejaculados (2 de manhã e 2 de tarde), todos do mesmo macho (3 anos de idade); este já não ejaculava há 3 dias (Ollero *et al.*, 1996; citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011). Depois da colheita, os tubos colectores foram transportados para o laboratório, em menos de 10 minutos (com uma excepção em que este tempo foi duplicado) (Cebrián *et al.*, 2010a), onde foram mantidos a 37°C em um banho-maria (Grant International, Cambridge, Inglaterra). Os dois ejaculados podem ser usados na inseminação artificial, embora, geralmente, o segundo apresente melhor qualidade do que o primeiro (Cebrián *et al.*, 2010a). No mesmo equipamento foram conservados os diluidores seminais devidamente preparados.

#### **1.5 – Análises Seminais**

O volume foi medido através da graduação dos tubos colectores e a motilidade e a concentração espermática foram estimadas com o auxílio do sistema CASA da Minitube (Androvision<sup>®</sup>, Minitüb, Tiefenbach, Alemanha), constituído por um microscópio de contraste de fase Carl Zeiss Axio Lab A1 (Gottngun, Alemanha), com placa aquecida (37°C) e uma câmara de vídeo (Basler camera A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha). Foram tiradas cerca de 30 fotos/0,5 minutos. Foram usadas lâminas não reutilizáveis com 4 câmaras Leja 20 (Leja Products, B.V., Nieuw-Venep,

Holanda). O *software* foi programado para gravar 7 campos (motilidade) e 30 campos (concentração espermática) sob contraste de fase negativo e uma ampliação de X 200. No laboratório existiam duas placas de aquecimento (37°C) que permitiam manter todos os demais materiais (pontas de pipetas, tubos, lâminas com 4 câmaras Leja 20) (Cebrián *et al.*, 2010a).

Os ejaculados utilizados tinham um volume  $\geq 1,7$  ml, uma motilidade progressiva  $\geq 75\%$  e uma concentração espermática  $\geq 3,0 \times 10^9$  espermatozoides/ml.

### 1.6 – Doses Seminais (Frescas e Refrigeradas)

Depois de realizadas as análises seminais, cada ejaculado foi inicialmente diluído (1:1) com um de dois diluidores comerciais Andromed<sup>®</sup> (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) e INRA 96<sup>®</sup> (IMV Technologies, L'Aigle, França) (Quadro IV). Os diluidores seminais são essenciais à diluição dos elementos tóxicos do plasma seminal, ao fornecimento de nutrientes aos espermatozoides armazenados *in vitro*, conferem um efeito tampão sobre os metabólitos espermáticos e seus sub-produtos e destrói as bactérias que nele se possam desenvolver (Cebrián *et al.*, 2010b e Morrell, 2011).

QUADRO IV – Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com Andromed<sup>®</sup> ou com INRA 96<sup>®</sup> aplicadas ao conjunto das ovelhas tratadas

FGA (n = 33*)				MAP (n = 34)			
Fresco (n = 17)		Refrigerado (n = 16)		Fresco (n = 17)		Refrigerado (n = 17)	
Andromed (n = 8)	INRA96 (n = 9)	Andromed (n = 7)	INRA96 (n = 9)	Andromed (n = 8)	INRA96 (n = 9)	Andromed (n = 8)	INRA96 (n = 9)

\* – Uma ovelha foi excluída por ter perdido a esponja vaginal.

Posteriormente, a taxa de diluição foi acertada com os valores indicados pelo programa Androvision<sup>®</sup> (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). De seguida a temperatura dos ejaculados recolhidos de manhã foi reduzida, durante cerca de 120 minutos, de 37°C para 15°C (Neslab<sup>®</sup> RTE 221, Newington, EUA). Os espermatozoides dos ovinos são especialmente sensíveis ao choque térmico pelo frio devido, particularmente, à

composição da sua membrana plasmática, com uma relação entre colesterol e fosfolípidos muito baixa em comparação com os espermatozóides de espécies mais resistentes ao frio (Cebrián *et al.*, 2010a).

Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, de  $200 \times 10^6$  espermatozóides (Cseh *et al.*, 2012). As palhinhas brancas continham sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> (n = 31) e as vermelhas sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup> (36). As inseminações ocorreram todas no intervalo máximo de 120 minutos pós-refrigeração (15°C).

Os espermatozóides recolhidos de tarde também foram inicialmente diluídos (1:1) – Andromed<sup>®</sup> ou INRA 96<sup>®</sup>. Posteriormente, o volume foi acertado com os valores fornecidos pelo programa Androvision<sup>®</sup> (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, de  $200 \times 10^6$  espermatozóides (Cseh *et al.*, 2012). As palhinhas brancas continham sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> e as vermelhas sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup>.

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

Entre o término do processo de refrigeração e de preparação das doses de sémen refrigerado (n = 33) e de sémen fresco (n = 34) e o começo da IA passaram menos de 30 minutos.

### **1.7 – Inseminação Artificial a Tempo Fixo**

Todas as ovelhas foram inseminadas, independentemente de terem manifestado cio, cerca de 55+1 horas pós-administração de eCG (Baril *et al.*, 1993, Palacios, 2010 e Greyling *et al.*, 1997). Começou-se por inseminar as ovelhas com sémen fresco.

Cerca de metade das ovelhas tratadas com FGA + eCG foram inseminadas com sémen fresco e a outra metade com sémen refrigerado. O mesmo sucedeu com as ovelhas tratadas com MAP + eCG. Em ambos os grupos cerca de metade das ovelhas foram inseminadas com sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> e a outra metade com sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup>.

Registrou-se o inseminador (A e B), a cor da mucosa da vagina (rosa, rosa vivo, rosa hemorrágico), o grau de lubrificação (abundante ou reduzida), o tipo do orifício

cervical externo (Figura 7), o local de deposição do sémen (vaginal, 1<sup>a</sup> prega ou 2<sup>a</sup> prega) e se houve refluxo (sim, ligeiro, não). A deposição do sémen foi feita sempre o mais profunda possível, com o auxílio de fórceps vaginais, luzes LED, pistoletes Quicklock e baínhas (Minitüb, Alemanha).

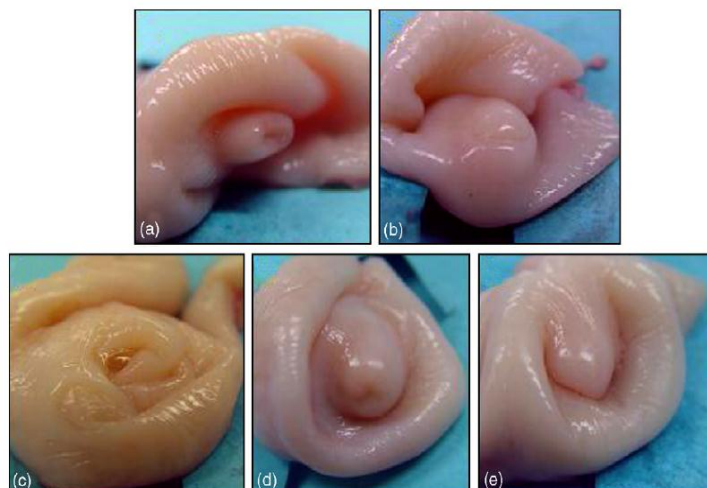


FIGURA 7 – Classificação quanto à aparência externa do orifício cervical: a) bico de pato, b) fenda, c) rosa, d) papila e e) aba (Kershaw *et al.*, 2005).

Terminadas as inseminações e retirado todo o pessoal envolvido no processo de inseminação calmamente, as ovelhas foram libertadas e não foram manipuladas intensamente (vacinações, desparasitações, corte de cascos, alteração de pastagem) e sobre tudo não se diminuiu o aporte energético da dieta (durante, pelo menos 20 dias), com o objectivo do *stress* não prejudicar a fecundação e a implantação (Cebrián *et al.*, 2010b).

### 1.7.1 – Posição das Fêmeas Durante a Inseminação

A contenção das fêmeas a inseminar foi realizada mediante elevação dos membros posteriores (Figura 8), permanecendo com os membros anteriores no solo. Essa posição era assegurada por um dos membros da equipa, no sentido de facilitar a observação da entrada do canal cervical (Baril *et al.*, 1993).



FIGURA 8 – Posição da fêmea para realização da inseminação.

### **1.8 – Diagnóstico de Gestação**

Quarenta dias (08/06/16) após a remoção das esponjas vaginais (29/04/2016), procedeu-se ao diagnóstico de gestação por ultrasonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet (multi-frequência) e de uma sonda rectal de 7,5 MHz (Vázquez *et al.*, 2010).

### **1.9 – Análise Estatística**

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

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1 - IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL

No início deste estudo, a idade média das ovelhas era de  $4,1 \pm 1,8$  anos (c.v. = 44,5%), dentro do indicado por Esmailzadeh *et al.* (2009) (citados por Santolaria, Palacín e Yaniz, 2011). De acordo com estes autores o aumento da idade entre os 2-7 anos eleva a taxa de fertilidade. As diferenças de idade registadas entre as ovelhas tratadas com FGA e com MAP revelaram-se estatisticamente não significativas ( $P > 0,05$ ) (Quadro V). O mesmo sucedeu relativamente às ovelhas que foram inseminadas com sémen fresco e com sémen refrigerado ( $P > 0,05$ ). Pelo contrário, as ovelhas inseminadas com sémen diluído com INRA 96<sup>®</sup> eram mais velhas do que as inseminadas com sémen diluído com Andromed<sup>®</sup> ( $P \leq 0,05$ ).

As ovelhas pesavam, em média,  $52,2 \pm 7,8$  kg (c.v. = 14,9%) e apresentavam uma CC média de  $3,4 \pm 0,5$  (c.v. = 14,0%). Este valor é ligeiramente superior ao aconselhado na bibliografia para a época de cobrição (2,5-3,0) (Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011 e Valentim *et al.*, 2015a). As diferenças de peso corporal e de CC entre ovelhas tratadas com FGA + eCG ou MAP + eCG, inseminadas com sémen fresco ou refrigerado, diluído com Andromed<sup>®</sup> ou com INRA 96<sup>®</sup> foram estatisticamente não significativas ( $P > 0,05$ ).

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

	<b>Idade</b> (anos)	<b>Peso</b> (kg)	<b>CC</b>
<b>FGA</b>	$4,1^a \pm 1,8$	$51,9^a \pm 8,4$	$3,5^a \pm 0,5$
<b>MAP</b>	$4,1^a \pm 1,8$	$52,5^a \pm 7,2$	$3,5^a \pm 0,5$
<b>Fresco</b>	$4,0^a \pm 1,8$	$52,6^a \pm 8,3$	$3,4^a \pm 0,5$
<b>Refrigerado</b>	$4,2^a \pm 1,8$	$51,8^a \pm 7,3$	$3,4^a \pm 0,5$
<b>Andromed<sup>®</sup></b>	$3,7^a \pm 2,0$	$50,5^a \pm 7,3$	$3,4^a \pm 0,5$
<b>INRA 96<sup>®</sup></b>	$4,4^b \pm 1,6$	$53,7^a \pm 7,9$	$3,4^a \pm 0,5$

a=a, para  $P > 0,05$ ; a≠b, para  $P \leq 0,05$  (entre colunas, mesmo tratamento).

De acordo com Esmailzadeh *et al.* (2009) citados por Santolaria, Palacín e Yaniz, (2011) o aumento da idade entre os 2-7 anos eleva a taxa de fertilidade. Santolaria,

Palacín e Yaniz (2011) recomendam que as ovelhas só sejam inseminadas com idades compreendidas entre os 2-5 anos de idade. Por outro lado, as ovelhas apresentavam uma CC superior à exigida quando da inseminação artificial ( $\approx 3$ ).

## 2 - ESTADO FISIOLÓGICO PRÉ-TRATAMENTOS

O estado fisiológico das ovelhas (cíclicas ou em anestro) pré-inseminação artificial condiciona a resposta à mesma (Kukovics *et al.*, 2011). Nas ovelhas da raça Churra Galega Bragançana, a estação de anestro sazonal estende-se de Março a Maio, ou seja, nestes meses mais de 50% das ovelhas não apresenta actividade ovárica completa (Correia, 1996).

Nas duas semanas anteriores à aplicação dos tratamentos progestagénicos curtos + eCG (4-18 de Abril), 74,6% (n = 50) das ovelhas apresentaram em, pelo menos uma das recolhas de sangue, níveis plasmáticos de progesterona superiores a 0,5 ng/ml, ou seja, estavam “cíclicas”. As demais 25,4% (n = 17) estavam em anestro sazonal ( $\chi^2 = 50,0$ ;  $P \leq 0,001$ ). É possível que esta diferença resulte de disparidades anuais nas condições climáticas (Anel *et al.*, 2005; citados por Kukovics *et al.*, 2011) que condicionam o desenvolvimento das pastagens naturais, as condições climáticas e, consequentemente o estado de saúde e os gastos em termorregulação. Por outro lado, no presente trabalho, as ovelhas estavam instaladas em melhores condições (menos perdas de energia em termorregulação, logo maiores disponibilidades de energia para a reprodução).

Nem a idade, nem o peso corporal, nem a CC afectaram significativamente o estado fisiológico pré-tratamentos progestagénicos curtos + eCG ( $P > 0,05$ ). Na verdade, a maioria das ovelhas tinha uma boa idade reprodutiva e um excelente peso e CC (2,5-3,0) (Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011), o que lhes terá permitido melhorar a resposta ovulatória. Nas difíceis condições de semi-árido da região mediterrânica, em que o fornecimento regular de alimentos não é uma garantia, um bom peso ou CC (Gunn e Doney, 1979 e Thomson e Bahhady, 1988; citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011) ou a aplicação da técnica nutricional de *flushing* pode promover melhores respostas ovulatórias (Younis, *et al.*, 1978, Landau e Molle, 1997 e Branca *et al.*, 2000; citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011).

### **3 - RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS CURTOS + ECG**

A eficácia dos dois tratamentos progestagénicos curtos + eCG foi absoluta – 100%. As condições ambientais particularmente favoráveis, a ciclicidade apresentada pela maioria das ovelhas pré-tratamentos, a idade média do rebanho, o seu peso e a CC serão alguns dos factores que contribuíram para este resultado. A primeira elevação dos níveis plasmáticos de progesterona surgiu, em média,  $57,0 \pm 16,1$  horas (c.v. = 28,3%) pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG. A diferença entre progestagénios utilizados foi estatisticamente não significativa (FGA –  $53,1 \pm 15,6$  horas vs. MAP –  $60,7 \pm 15,9$  horas) ( $P > 0,05$ ). Segundo Romano (1996), nos pequenos ruminantes, o FGA tem uma semivida mais curta do que o MAP. Aparentemente, o FGA promove um regresso mais rápido à actividade ovárica cíclica e ao cio (maior precisão e concentração dos cios) do que o MAP, ainda que não altere a duração do cio (Romano, 1996). Contudo, Ungerfeld e Rubianes (2002), Zeleke *et al.* (2005) e Mateus (2014) não encontraram qualquer diferença significativa na resposta reprodutiva de ovelhas tratadas com FGA + eCG e com MAP + eCG. Os dados encontrados no presente estudo também apontam no sentido destes últimos autores.

O tempo da inseminação artificial pós-tratamento de sincronização de cios é muito importante (Kukovics *et al.*, 2011). A melhor altura difere segundo o autor: 46 horas (Fernandez-Abella *et al.*, 2003; citados por Kukovics *et al.*, 2011), 48-72 horas (Karagiannidis *et al.*, 2001; citados por Kukovics *et al.*, 2011), 55 horas (Baril *et al.*, 1993, Valentim *et al.*, 2009) e 58-63 horas (Donovan *et al.*, 2004; e Donovan *et al.*, 2001). A escolha das 55 horas pós-tratamento progestagénico curto e eCG parece ter sido a adequada, tendo em conta os resultados obtidos.

#### **3.1 – Diagnóstico de gestação por Ultra-sonografia**

Aos 40-45 dias de gestação visualizam-se as primeiras imagens correspondentes ao início da ossificação (Vázquez *et al.*, 2010). Os pontos de ossificação podem ser observados como pequenas estruturas hiperecogénicas a nível do crânio da coluna vertebral e membros torácicos e pélvicos (Vázquez *et al.*, 2010). A taxa de acerto é de 100% (Vázquez *et al.*, 2010).

Quarenta dias após a inseminação artificial, 85,1% das ovelhas estavam gestantes. Este valor surpreendeu pela positiva, pois os valores médios indicados para ovinos na

bibliografia rondam os 40-60 (Anel *et al.*, 2005 e Fair *et al.*, 2005; citados por Masoudi *et al.*, 2017), 50-65% (Baril *et al.*, 1993, Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009), 65-75% (Colas e Guérin 1979; citados por Cognié, 1988). Contudo, alguns autores referem valores de 70-82% (Donovan *et al.*, 2001, 2004), de 82,2% (Hill *et al.*, 1998 e Ehling *et al.*, 2003; citados por Kukovics *et al.*, 2011) e de 80-90% (Kukovics *et al.*, 2011). Anel *et al.* (2005) (citados por Kukovics *et al.*, 2011) garantem que os resultados da inseminação artificial variam igualmente de ano para ano.

#### **4 – CARNEIRO**

Segundo Anel *et al.* (2005) citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, (2011), o carneiro dador influência significativamente a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial cervical, particularmente quando esta é feita com sémen refrigerado. Salamon e Maxwell (1995) acreditam que estas diferenças entre carneiros podem ser tanto genéticas como ambientais.

#### **5 – DOSE DE GONADOTROPINA**

De acordo com Hill *et al.* (1998) citados por Kukovics *et al.*, (2011), a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial depende da quantidade de eCG que é administrada por ovelha: 200 UI -62,4%, 250 UI – 72,9%, 300 UI – 79,1% e 375 UI – > 69,4%. A experiência adquirida, embasada nos trabalhos de pesquisa realizados ao longo de 26 anos pela equipa de pesquisadores do laboratório de Reprodução Animal do Instituto Politécnico de Bragança, diz-nos que os melhores resultados surgem com a administração de 500 UI de eCG/ovelha.

#### **6 – PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO**

Durante o processo de refrigeração do sémen ocorrem perdas de motilidade, alterações morfológicas e um declínio da sua capacidade de sobrevivência no tracto genital feminino, reduzindo a taxa de fertilidade e aumentando a taxa de mortalidade embrionária (Paulenz *et al.*, 2002 e O'Hara *et al.*, 2010). No presente trabalho, a melhor taxa de fertilidade foi obtida com sémen refrigerado (90,9%) do que com sémen fresco (79,4%) ( $\chi^2 = 5,6$ ;  $P < 0,05$ ). De um modo geral, as taxas de fertilidade são mais baixas com sémen refrigerado (Aral, Temamoğullar e Aral, 2011) – 56,7% (Fernandez-Abella

*et al.*, 2003; citados por Kukovics *et al.*, 2011) ou 74-76% (Gergátz e Gyökér, 1997; citados por Kukovics *et al.*, 2011).

No presente trabalho esta diferença pode ter resultado do período refractário anormalmente longo ( $\approx 20$  minutos) verificado entre o primeiro e o segundo saltos, o que atrasou a chegada e o processamento do primeiro ao laboratório. Neste caso, o primeiro ejaculado pode ter sido diluído algo tardiamente, alterando a composição do plasma seminal e a estrutura das membranas espermáticas, afectando o seu poder fecundante. Na verdade, o papel do plasma seminal sobre os espermatozóides é controverso (Cebrián *et al.*, 2011b). Se por um lado ditam a sua quiescência no epidídimo (aumentando a sua durabilidade), por outro os espermatozóides vivos e mortos, entre outras coisas, são capazes de produzir substâncias peroxidantes, que oxidam os lípidos das membranas espermáticas (Cebrián *et al.*, 2011b).

De acordo com Neves *et al.* (1983), a elevada concentração espermática determina uma intensa actividade metabólica, com rápido acúmulo de catabólitos no plasma seminal, extremamente prejudicial à célula espermática. Deste modo, os diluidores seminais são essenciais ao fornecimento de nutrientes aos espermatozóides armazenados *in vitro*, à diluição dos elementos tóxicos do plasma seminal, efeito tampão sobre os metabolitos espermáticos e seus sub-produtos e destroem as bactérias e fungos que neles se possam desenvolver (Morrell, 2011).

## 7 - DILUIDORES

O tipo de diluidor seminal não afectou significativamente a taxa de fertilidade (Andromed<sup>®</sup>: 83,9% vs. INRA 96<sup>®</sup>: 83,3%) ( $\chi^2 = 0,0$ ;  $P > 0,05$ ). Ainda que o Andromed<sup>®</sup> [que contém fosfolípidos, TRIS (hidroximetil aminometano;  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ ), ácido cítrico, açúcares, antioxidantes, tampões, antibióticos, glicerol e água ultra pura] tenha sido desenvolvido para criopreservação de sémen de bovinos e o INRA 96<sup>®</sup> [tenha uma composição baseada em fracções purificadas de proteínas micelares de leite, antibióticos e um antifúngico (Gil *et al.*, 2011)] para preservação de sémen de equinos, ambos revelaram o seu valor na preservação de sémen de ovino (Batellier *et al.*, 1998; citados por Gil *et al.*, 2011; e O'Hara *et al.*, 2010).

## 8 - INSEMINADOR

Na inseminação artificial, a taxa de sucesso depende igualmente do trabalho do inseminador (Gordon, 1997, Donovan *et al.*, 2004; e Anel *et al.*, 2005; citados por Kukovics *et al.*, 2011). A ultrapassagem do canal cervical depende muito da aptidão do inseminador (Eppleston e Maxwell, 1993; citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011). Neste trabalho, a taxa de sucesso do inseminador A foi de 75,5% e a do inseminador B foi de 97,1% ( $\chi^2 = 18,8$ ;  $P \leq 0,001$ ). Este resultado está, provavelmente, associado ao facto do Inseminador B sempre que tinha dificuldade na inseminação de uma ovelha a passava para o Inseminador A.

## 9 - COR DA MUCOSA VAGINAL

A cor da mucosa vaginal afectou a taxa de fertilidade (Quadro VI). Neste trabalho a relação entre a cor da mucosa vaginal e a taxa de fertilidade tem de ser vista com especial cuidado. Na verdade, um dos inseminadores usou uma lâmpada de cor branca e outro de cor amarela. Este facto afectou, seguramente, a classificação da cor da mucosa vaginal. É um ponto que terá de ser corrigido no futuro para que a interpretação deste parâmetro possa ser feito correctamente. A ovelha que apresentava uma cor rosa hemorrágica não ficou gestante, indo ao encontro do sugerido por Palacios (2010) da não inseminação de ovelhas com vaginites, com muco sanguinolento, ou com cores ou odores estranhos (Palacios, 2010).

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

<b>Cor da Mucosa Vaginal</b>	<b>Taxa de Fertilidade</b>
Rosa	47/56 (83,9% <sup>a</sup> )
Rosa vivo	11/11 (100% <sup>b</sup> )
Rosa hemorrágico	0/1 (0,0% <sup>c</sup> )

a≠b, para  $P \leq 0,001$ ; a≠c, b≠c, para  $P \leq 0,0001$ .

## 10 - TIPO DE ENTRADA NO CANAL CERVICAL

A entrada no canal cervical condicionou a taxa de fertilidade (Quadro VII).

QUADRO VII — Configuração anatómica da entrada no canal cervical e sua relação com a taxa de fertilidade

<b>Entrada no Canal Cervical</b>	<b>Taxa de Fertilidade</b>
Bico de Pato	17/21 (81,0% <sup>a</sup> )
Ranhura	7/7 (100,0% <sup>b</sup> )
Rosa	17/22 (77,2% <sup>c</sup> )
Papila	6/6 (100,0% <sup>d</sup> )
Prega	8/9 (88,9%)

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

As que produziram melhores resultados foram a Papila (100%) e a Fenda (100%), curiosamente as duas consideradas mais difíceis pelos inseminadores. Neste sentido, é possível que um maior empenho por parte deles nestes casos tenha sido um dos motivos para esta eficácia total.

## 11 - LUBRIFICAÇÃO

A inseminação artificial deve ser feita o mais depressa possível, evitando traumatizar ou inflamar o canal cervical e evitando o *stress* (Palacios, 2010). Quando as ovelhas têm um fluxo abundante ou muito reduzido a fertilidade diminui, pelo que é conveniente eliminar o excesso de muco (Palacios, 2010). A esmagadora maioria das ovelhas inseminadas apresentava uma lubrificação vaginal abundante (Boa: 89,6% vs. Pouca: 10,4%) ( $\chi^2 = 128,0$ ; P<0,0001). Foi frequente ter de deixar escorrer para o exterior da vulva a maioria das secreções presentes no tracto genital feminino, pois estas chegavam a impedir a observação da entrada do canal cervical. Contudo, o estado de lubrificação afectou a taxa de fertilidade (Abundante: 84% vs. Reduzida: 100%) ( $\chi^2 = 17,4$ ; P<0,0001). Na IA cervical, o sémen é depositado na porção anterior do canal cervical e o transporte do esperma é afetado pela qualidade do muco cervical (Santolaria, Palacin e Yáñez, 2011). Aparentemente, o excesso de lubrificação terá promovido uma maior diluição da dose seminal nas secreções do tracto genital feminino (removendo rapidamente os efeitos protectores do plasma seminal) (Morrell, 2011 e Santolaria, Palacin e Yáñez, 2011) e eventualmente um aumento do refluxo vulvar.

## 12 – LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÉMEN NO TRACTO GENITAL FEMININO

Na inseminação cervical, a taxa de fertilidade é maior quanto mais profundamente é depositado o sémen no canal cervical ou no corpo do útero (Kaabi *et al.*, 2006 e Candappa e Bartlewski, 2011). Contudo, devido à conformação do canal cervical das ovelhas (4-7 pregas desalinhas) o sémen é normalmente depositado na vagina ou na entrada do canal cervical (Kaabi *et al.*, 2006). Efectivamente, na maioria das ovelhas, o sémen foi colocado logo após à primeira prega (Quadro VIII). A taxa de fertilidade foi elevada quando o sémen foi depositado tanto no fundo do saco vaginal quanto para lá da 1ª prega. O volume interno do canal cervical dos ovinos é muito reduzido (0,1-0,2 ml) (Gordon, 1997 e Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011), pelo que na inseminação cervical as doses seminais devem ser pequenas e muito concentradas (Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011):  $200 \times 10^6$  –  $400 \times 10^6$  espermatozóides (Marcus, 1982; citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011).

QUADRO VIII — Local da deposição do sémen e sua relação com a taxa de fertilidade

Local deposição do sémen	Taxa de Fertilidade
Vaginal	8/9 (88,9% <sup>a</sup> )
1ª prega	45/51 (88,2% <sup>a</sup> )
2ª prega	4/6 (66,7% <sup>b</sup> )

a=a, para  $P > 0,05$ ; a≠b para  $P \leq 0,0001$ .

A deposição do sémen após a 2ª prega produziu os piores resultados de fertilidade. Segundo alguns autores, a possível inflamação ou lesão que a tentativa de ultrapassar a 2ª prega comporta determina um decréscimo da fertilidade, por afectar o transporte e a viabilidade dos espermatozóides no tracto genital feminino (Candappa e Bartlewski, 2011), originando um maior fluxo de células imunitárias ao lúmen do canal cervical (Troedsson *et al.*, 2001; citados por Morrell, 2011).

### 12.1 - Refluxo

A maioria das ovelhas inseminadas depois de ultrapassar a 1ª ou a 2ª prega não fez refluxo (Quadro IX) e as taxas de fertilidade foram muito elevadas. Pelo contrário, as

ovelhas que apresentaram refluxo seminal apresentaram uma taxa de fertilidade mais baixa (Candappa e Bartlewski, 2011).

QUADRO IX — Refluxo seminal e sua relação com a taxa de fertilidade

<b>Refluxo Seminal</b>	<b>Taxa de Fertilidade</b>
Sem	32/39 (88,9% <sup>a</sup> )
ligeiro	15/16 (93,8% <sup>a</sup> )
Com	3/4 (75,0% <sup>b</sup> )

a=a, para  $P>0,05$ ; a≠b para  $P\leq 0,01$ .

Segundo Marcus (1982) (citados por Santolaria, Palacin e Yaniz, 2011), Cseh *et al.* (2012), a inseminação cervical de uma pequena (0,25 ml), mas concentrada dose de sémen ( $200 \times 10^6$  espermatozóides), é a mais apropriada a uma cérvix difícil de ultrapassar e reduz a ocorrência de refluxo cervical. Esta pode ser a explicação para a não diminuição da taxa de fertilidade quando o refluxo foi ligeiro.

#### IV-CONCLUSÕES

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

- Entre 4 e 18 de Abril, 74,6% das ovelhas Churras Bragançanas estavam cíclicas.
- A eficiência dos tratamentos progestagénicos curtos (FGA ou MAP) + eCG foram igualmente máximos (100%).
- O tempo fixo de inseminação artificial de 55 horas conduziu a excelentes taxas de fertilidade.
- Quarenta dias após a inseminação artificial, 85,1% das ovelhas estavam gestantes.
- As melhores taxas de fertilidade foram obtidas com sémen refrigerado (90,0%) e não com sémen fresco (79,4%).
- Os diluidores utilizados –Andromed<sup>®</sup> (90,9%) e INRA 96<sup>®</sup> (79,4%)– revelaram-se igualmente eficazes.
- Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre inseminadores (A: 75,5% e B: 97,1%).

## V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia Martínez, A., Forcada Miranda, F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Zaragoza: Servet.
- Abecia, J.A., Forcada, F. e González-Bulnes, A., 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **27**(1), 67-79.
- Abecia, J.A., Forcada, F. e González-Bulnes, A., 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**(3), 173-179.
- 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*).
- Álvaro, A. de C.N., 2014. Anestro fisiológico pós-parto em ovelhas Churras Galegas Bragançanas paridas no Outono. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança, Portugal, 45 pp.. (*Tese de Mestrado*).
- Antunes-Melo, K.D., de Oliveira, V.S., Santos, A.D.F., de Oliveira, C.A., Mendonça, L.M., Goveia, J.S.S. e Almeida, T.S., 2015. Use of reduced doses of eCG applied by different routes in the TAI program in Santa Ines sheep. *In. Semina: Ciências Agrárias*, **36**(3), 1347-1354.
- Aral, F., Temamoğullar, F. e Aral, S.S., 2011. Mechanical and pharmacologic applications of artificial insemination in ewes. *In: Veterinary Medicine and Science*, M. Manafi (Ed.), Cap 14, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Araújo, L.R.S., Barros, T.B., Guimarães, D.B., Cantanhêde, L.F., Dias, A.V., Toniolli, R., 2016. Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. *Ciência Animal Brasileira*, **17**(1), 26-35.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of reproduction*, **3**(1), 13-22
- Artiga, C.G., Martinez, E., Perez-Fuentes, J., Vazquez, I. (1995). Determinacion de la

calidad seminal en morueco. *Ovis*, 36: 27-36.

Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B. e Bellin, M.E., 2004. Inseminação artificial. *In: Reprodução Animal*, Hafez, E.S.E. e Hafez, B. (Eds), 7ª edição, Manole Editor, São Paulo, Brasil, 531 pp..

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

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

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

Barrett, P., Messenger, S., Schuster, C., Moar, K.M., Mercer, J.G. e Morgan, P.J., 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts as a paracrine regulator of melatonin-responsive cells of the ovine *pars tuberalis*. *Endocrinology*, 143(6), 2366-2375.

Bartness, T.J., Song, C.K. e Demas, G.E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*, 16(2), 196-204.

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

Bicudo, S.D., Azevedo, H.C., Maia, M.S., Sousa, D.B., e Rodello, L., 2005. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. *Acta Science Veterinária*, 33, 127-130.

Bicudo, S.D., Sousa, D. e Takada, L., 2003. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*,

27(2), 120-127.

- Bittencourt, R.F., Oba, E., Ribeiro Filho, A.D.L., Chalhoub, M., Azevedo, H.C., e Bicudo, S.D. (2013). Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciência Animal Brasileira*, 14(4), 522-536.
- Borjigin, J., Li, X. e Snyder, S.H., 1999. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 53-65.
- Câmara, D.R. e Guerra, M.M.P., 2011. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 35(1), 33-40.
- 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 Dilatation and its Implications for Controlled Animal Reproduction and Surgical Techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, 3, 162-175.
- Cebrián Pérez J.A, Blanco M.T.M., Pérez-Pe, R., Gascón, A.C. 2010. Manejo del semen e incriminación artificial. In: Manejo reproductivo en ganado ovino. Zaragoza:Servet.
- Chemineau, P., Cagnié, Y., Guérin, Y., Orgeur, P., Vallet, J-C. (1993). Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper, 83. Editor: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Cognié, Y., 1988. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *INRA Prod Anim*, 1(2), 83-92.
- Correia, T.M.M.A.A., 1996. Contributo para o estudo da sazonalidade reprodutiva das ovelhas da raça autóctone portuguesa Churra Galega Bragançana. Centro Internacional de Altos Estudios Agronomicos Mediterraneos, Instituto Agronomico Mediterraneo de Zaragoza, Saragoça, Espanha, 84 pp.. (*Tese de Mestrado*).
- Costa, R.L.D. da, 2007. Aspectos reprodutivos das ovelhas. *Pesquisa & Tecnologia*, 4(1), 12 pp..
- 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.
- Dauvilliers, Y., 2002. Les gènes de notre horloge. *Science & Vie*, **220**, 34-40.
- de Souza Castelo, T., Frota, T.R. e Silva, A.R., 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, **2**(3), 67-75.
- Decuadro-Hansen, G., 2004. La refrigeration et la congelation du sperme: expérience chez l'animal chilled and frozen semen: the animal experience. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, **32**, 887-893.
- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soyly, M.K. e Sonmez, C., 2004. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. *South African Journal of Animal Science*, **34**(1), 18-22.
- Donovan, A., Hanrahan, J.P., Kummen, E., Duffy, P. e Boland, M.P., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, **84**, 359-368.
- Donovan, A., Hanrahan, J.P., Lally, T., Boland, M.P., Byrne, G.P., Duffy, P., Lonergan, P., O'Neill, D.J. (2001). AI for sheep using frozen-thawed semen. In: End of Project Report (ARMIS 4047), The Department of Agriculture, Food and Rural Development, Ireland.
- Driancourt, M.A., 2012. Chronogest CR and Folligon. [http://www.merck-animal-health.com/binaries/Chronogest\\_and\\_Folligon-tcm50-262063.ppt](http://www.merck-animal-health.com/binaries/Chronogest_and_Folligon-tcm50-262063.ppt)
- Dunn, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**, 52-64.
- Ehlers, J., Behr, M., Bollwein, H., Beyerbach, M., & Waberski, D. (2011). Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology*, **76**(3), 448-454.
- El-Alamy, M.A., Foote, R.H. e Hare, E., 2001. Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long-and short-day lighting. *Theriogenology*, **58**, 839-854.
- Evans, G. e Robinson, T.J., 1980. The control of fertility in sheep: endocrine and

ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season. *The Journal of Agricultural Science*, **94**(1), 69-88.

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

Fernandes, S.M., 2008. Antecipação da Estação Reprodutiva em Ovelhas da Raça Churra Galega Bragançana. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 29 p.. (*Tese de Mestrado*).

Fonseca, J. F., 2005. Estratégias para o controlo do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, **16**, 1-9.

Forcada, F., Zúñiga, O. e Abecia, J.A., 2002. The role of nutrition in the regulation of LH secretion during anestrus by the serotonergic and dopaminergic systems in Mediterranean ewes treated with melatonin. *Theriogenology*, **58**, 1303-1313.

Franco, M.C., dos Santos, J. F., Maciel, T.A., Neto, P.J.D., e Oliveira, D. (2014). Morfologia da cérvice de ovelhas santa inês adultas nas fases luteínica e folicular. *Ciência Animal Brasileira*, **15**(4), 495-501.

Gates, P.J., Hemningsson, T., e Forsberg, M.T., 1998. Effects of melatonin, progestagens, and the ram on out-of-season reproduction in Swedish Landrace Finewool sheep. *Acta Veterinaria Scandinavia*, **39**, 499-510.

Gil, J., Fierro, S., Bentancur, O. e Olivera-Muzante, J., 2011. Chilled storage of ram semen improves with the addition of egg yolk and glycerol to milk-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, **46**, 503-507.

Goldman, B.D., 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biology Rhythms*, **16**(4), 283-301.

Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R. e Freitas, V.J.F., 2001. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Livraria Varela, São Paulo, Brasil, 340 pp..

Gordon, I., 1997. Controlled reproduction in sheep and goats. Vol 2, Cab International, Wallingford, Reino Unido, 272 pp..

Greyling, J.P., Erasmus, J.A., Taylor, G.J. e van der Merwe, S., 1997. Synchronization

of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Ruminant Research*, **26**, 137-143.

Hafez, B. e Hafez, E.S.E., 2004. Reprodução Animal. 7ª Edição, Barueri:Manole, São Paulo, Brasil, 514 pp..

Haresign, W., 1993. New techniques for reducing seasonal breeding in males and females. *In*: 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Aarhus, Dinamarca.

Hollander, A.B., 2001. Circadian rhythms. <http://serendip.brynmawr.edu/bb/neuro/neuro00/web3/Hollander.htm>

Kaabi, M., Alvarez, M., Anel, E., Chamorro, C.A., Boixo, J.C., de Paz, P. e Anel, L., 2006. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: a postmortem study. *Theriogenology*, **66**, 1876-1883.

Kennaway, D.J., 2002. Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, **13** (9), 398-402.

Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G. e Scaramuzzi, R.J., 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, **64**(5), 1225-1235.

Kohler, M., Kalkowski, A. e Wollnik, F., 2000. Species differences between hamsters and rats with regard to the putative role of serotonin in the circadian system. *Biological Rhythm Research*, **31** (3), 340-354.

Koyuncu, M. e Alticekic, S.O., 2010. Effects of progestagen and PMSG on estrous synchronization and fertility in Kivircik ewes during natural breeding season. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, **23**, 308-311.

Kukovics, S., Gyökér, S., Németh, T. e Gergátz, E., 2011. Artificial insemination of sheep – possibilities, realities and techniques at the farm level. *In*: Veterinary Medicine and Science, M. Manafi (Ed.), Cap 3, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..

Letelier, C.A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R.A., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Flores, J.M., e Gonzalez-Bulnes, A., 2009. Ovarian follicular

dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*, **71**(4), 676-682.

Levi-Setti, P. E., Cavagna, M., Baggiani, A., Zannoni, E., Colombo, G. V., & Liprandi, V. (2004). FSH and LH together in ovarian stimulation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **115**, S34-S39.

Lincoln, G.A., 1992. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Animal Reproduction Science*, **28**, 203-217.

Malpaux, B., Viguié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Pelletier, J. e Chemineau, P., 1996. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science*, **42**, 109-117.

Martin, G.B., Ford, J.R. e Purvis, I.W., 1990. Environmental and genetic factors affecting reproductive activity in the Merino ram. *In: Reproductive physiology of Merino sheep – concepts and consequences* C.M.Oldham, G.B. Martin e I.W. Purvis, (Eds), University of Western Australia, Nedlands, Austrália, 109-129.

Martin, G.B., Hötzel, M.J., Blache, D., Walkden-Brown, S.W., Blackberry, M.A., Boukhliq, R., Fischer, J.S. e Miller, D.W., 2002. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reproduction Fertility and Development*, **14**, 165-175.

Masoudi, R., Shahneh, A.Z., Towhidi, A., Kohram, H., Akbarisharif, A. e Sharafi, M., 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*, **74**, 77-80.

Mateus, O.J.P., 2014. Controlo reprodutivo em ovelhas Awassi x Sarda. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. (*Tese de Mestrado*).

Maurel, M.C., Roy, F., Hervé, V., Bertin, J., Vaiman, D., Crihiu, E. e Guillou, F., 2003. Immune response to equine chorionic gonadotropin used for the induction of ovulation in goats and ewes. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, **31**(9), 766-769.

Maxwell, W. M., & Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, **5**(6), 613-638.

- Maxwell, W.M.C., e Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **42**(1), 55-65.
- 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.
- Menchaca, A., Pinczak, A. e Queirolo, D., 2005. Storage of ram semen at 5 C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Animal Reproduction*, **2**, 195-198.
- Miklós, I.H. e Kovács, K.J., 2002. GABAergic innervation of corticotropin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neuroscience*, **113** (3), 581-592.
- Moraes, J.C.F., Souza, C.J.H. e Gonçalves, P.B.D., 2008. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. *In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Cap.3, Varela Editora, São Paulo, Brasil, 33-54.
- Morrell, J.M., 2011. Artificial insemination: current and future trends. *In: Veterinary Medicine and Science*, M. Manafi (Ed.), Cap 1, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Murphy, B.D., e Martinuk, S.D., 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews*, **12**(1), 27-44.
- Naim, P., Cueto, M., e Gibbons, A., 2009. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Archivos de Zootecnia*, **58**(223), 435-440.
- Nelson, E.A., Lin, T.Y. (1983). Collecting, evaluation, processing, and storage of goat and sheep semen. *In: Reproduction and Genetics*, presented by the International Sheep and Goat Institut, UTAH, USA, 229-252 pp..
- Neves, J.P., Blaya, M.C.R. e Teixeira, P.R., 1983. Efeitos da concentração espermática na dose de sêmen ovino congelado em minitubos. *A Hora Veterinária*, **14**, 11-14.
- O'callaghan, D., Crosby, T.F. e Boland, M.P., 1993. Endocrine regulation of seasonal breeding in sheep. *In: 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Aarutus, Dinamarca, 6 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.

- Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J. e Volland-Nail, P., 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Australian Journal of Biology Science*, **41**, 69-85.
- Padilha, R.T., 2007. Indução do estro/ovulação e fertilidade em ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com diferentes dispositivos intravaginais. Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil, 76 pp.. (*Tese de Mestrado*).
- Palacios, e., Palacín, I., Asecla, j.A., Forcada, E, Martín, S., Martino, A. Utilización práctica de los implantes de melatonina para la cubrición de corderas de 4 razas ovinas. Actas de las XXXI jornadas de la SEOC, Zamora, 2006, 352-354 pp..
- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. e Berger, K.A., 2002. Effect of different extenders and storage temperature on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, **57**, 823-836.
- Perry, R.C., Corah, L.R., Cochran, R.C., Beal, W.E., Stevenson, J.S., Minton, J.E. e Brethour, J.R., 1991. Influence of dietary energy on follicular development, serum gonadotropins, and first postpartum ovulation in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, **69**(9), 3762-3773.
- Prosser, R.A., 2000. Serotonergic actions and interactions on the SCN circadian pacemaker: in vitro investigations. *Biological Rhythm Research*, **31** (3), 315-339.
- Raju, G.A.R., Chavan, R., Deenadayal, M., Gunasheela, D., Gutgutia, R., Haripriya, G., Govindarajan, M., Patel, N., Patki, A. S. (2013). Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *Journal of human reproductive sciences*, **6**(4), 227.
- Rojero, R.D.M., Reyna-Santamaria, L., Michel-Aceves, A.C., Mastache-Lagunas, A.A., Hernandez-Ignacio, J. e Rojas-Maya, S., 2009. Cervical or intrauterine artificial insemination in Pelibuey ewes, with chilled semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8**(12), 2621-2625.
- Romano, J.E., 1996. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal pessaries for estrus synchronization in dairy goats. *Small Ruminant Research*, **22** (3), 219-223.
- Romão, R., 2002. Efeito da melatonina em caracteres reprodutivos de carneiros das raças merina preta e campaniça. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de

- Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal, 134 pp.. (*Tese de Mestrado*).
- Rosa, H.J.D. e Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, **48**(3), 155-171.
- Russel, A.J.F., Doney, J.M. e Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of fat in live sheep. *Journal of Agricultural Science*, **72**, 451-454.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, **38**(1-2), 1-36.
- Santolària, P., Palacin, I. e Yaniz, J., 2011. Management factors affecting fertility in sheep. Cap 11, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Schwartz, W.J., De la Iglesia, H.O., Zlomanczuk, P. e Illnerová, H., 2001. Encoding *le quattro stagioni* within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biology Rhythms*, **16**(4), 302-311.
- Sebastian Lopez, A., 1989. Estacionalidad de la reproducción. *Ovis*, **1**, 59-73.
- Silvia, W. J., & Raw, R. E. (1993). Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F<sub>2α</sub> from the ovine uterus by ovarian steroids. *Journal of reproduction and fertility*, **98**(2), 341-347.
- Sirotkin, A.V. e Schaeffer, H-J., 1997. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin: review. *Journal of Endocrinology*, **154**, 1-5.
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- Sousa, C.E.C., da Silveira Cruz-Machado, S. e Tamura, E.K., 2008. Os ritmos circadianos e a reprodução em mamíferos. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução. Juiz de Fora, **27**(1/2), 15-20.
- Steel, R.G.D. e Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. 2ª Edição, McGraw-Hill Company, Nova Iorque, EUA, 633 pp..
- Thiéry, J.-C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M. e Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domestic Animal Endocrinology*, **23**, 87-100.
- Thimonier, J., 1996. Photopériode et reproduction. *INRA Prod Anim*, **9** (1), 3-8.

- Ungerfeld, R. e Rubianes, E., 2002. Short-term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research*, **46**(1), 63-66.
- Uribe-Velázquez, L.F., Souza, M.I.L., e Osorio, J.H., 2010. Resposta ovariana de cabras submetidas a implantes de progesterona seguidos de aplicações de gonadotrofina coriônica equina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **39**(6), 1214-1222.
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., e Correia, T., 2009. Anticipación de la estación reproductiva en ovejás de la raza Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial. *In: 34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Barbastro, Espanha, 403-407.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., 2015a. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 4. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos naturais. *Agrotec*, **17**, 19-23.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., 2015b. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 5. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos hormonais. *Agrotec*, **18**, 25-28.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., 2016a. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 6. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – *flushing* alimentar. *Agrotec*, **20**, 12-15.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., 2016b. Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 7. Inseminação artificial em ovinos e caprinos. *Agrotec*, **21**, 10-13.
- Valentim, R.C., 2004. Estudo da sazonalidade sexual em carneiros da Raça Churra Galega Bragançana. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 179 pp.. (*Tese de Doutoramento*).
- Valentim, R.C., Correia, T.M. e Azevedo, J.M. 2006. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, **2**(6), 18-22.

- Vázquez, M.I., Forcada, F., Casao, A., Sosa, C., Palacín, I., Abecia J.A. 2010. Effect of melatonin and undernutrition on viability of ovine embryos during anestrus and the breeding season. *Anim. Reproduction. Science.*, nº112, pp. 83-94.
- Vijil, E., 1989. Dependencia ambiental de la calidad seminal en el ganado ovino. *In: IV Simposium Internacional de Reprodução Animal, Volume II, Lisboa, Portugal, 159-197.*
- Vincent, J.N., McQuown, E.C. e Notter, D.R., 2000. Duration of the seasonal anestrus in sheep selected for fertility in a fall-lambing system, *Journal of Animal Science*, **78**, 1149-1154.
- Wathes, D. C., & Lamming, G. E. (1994). The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, *49*, 53-67.
- Watson, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, **60**, 481-492.
- Wehr, T.A., 2001. Photoperiodism in humans and other primates: evidence and implications. *Journal of Biology Rhythms*, **16**(4), 348-364.
- Zelege, M., Greyling, J.P.C., Schwabach, L.M.J., Müller, T. e Erasmus, J.A., 2005. Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. *Small Ruminant Research*, **56**(1-3), 47-53.