



**SINCRONIZAÇÃO DE CIOS E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CABRAS
DAS RAÇAS SERRANA E PRETA DE MONTESINHO.**

*Efeitos da suplementação multivitamínica, tratamento progestagénico
curto + gonadotropina coriónica e método de preservação do sémen.*

Lucas Felipe Francisco

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

Orientado por:

Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim

Professora Doutora Teresa Maria Montenegro de Araújo Almendra Correia

Professor Doutor Vicente de Paulo Macedo

Bragança

2018

**SINCRONIZAÇÃO DE CIOS E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM CABRAS
DAS RAÇAS SERRANA E PRETA DE MONTESINHO.**

*Efeitos da suplementação multivitamínica, tratamento progestagénico
curto + gonadotropina coriónica e método de preservação do sémen.*

Lucas Felipe Francisco

Bragança 2018

Dedico a Deus, a minha mãe Fernanda Ap. Manzato Francisco, ao meu pai Caim de Carvalho Francisco, e a todos meus familiares e amigos que foram tão importantes para a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e àqueles que se fazem presente dele, meus pais, que participaram na minha vida e me auxiliaram em princípios únicos, valores e ensinamentos preciosos. Vocês são minha inspiração e meu lar.

Aos meus orientadores Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim, da Escola Superior Agrária, do Instituto Politécnico de Bragança, Professor Doutor Vicente de Paulo Macedo, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Brasil, pela orientação deste trabalho, pela capacidade científica, sanção das dúvidas que surgiram assim como por toda a força e incentivo ao longo da realização deste. Todas essas disposições fazem fortalecer o vosso profissionalismo.

Ao Professor Doutor Raimundo Manuel Álvares Maurício, pois sua colaboração no decorrer do trabalho. Sou eternamente grato pela sua disposição e profissionalismo.

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Mestre Óscar Mateus, Raquel Fornazari e a Dona Céu. Só tenho a agradecer pelo tempo compartilhado, muitas das vezes, para auxiliar com seu conhecimento ou até mesmo em ocasiões de descontração.

Aos meus amigos que fizeram dos meus dias, dias mais claros, muitas das vezes dias de ânimo, dias de sentir saudade, dias de se sentir especial por ter alguém com quem pudéssemos contar. Em especial a Ana Paula Rizzotto, Adriano Freitas Lima, Anderclei Conradi, Rafaela Prata, Palloma Carvalho, Matheus Roman, Marcela Gayer entre muitos outros, que tive a oportunidade e prazer de conviver e levar comigo a partir de agora um pouco de cada um em meu coração.

A toda minha família, vocês me deram sustento, base para esse sonho, sempre me apoiando e dando votos de confiança.

ÍNDICE GERAL

<u>RESUMO</u>	VI
<u>ABSTRACT</u>	VIII
<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	X
<u>ÍNDICE DE QUADROS</u>	XII
<u>I. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	3
<u>1. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÓMICA DA ESPÉCIE CAPRINA</u>	3
<u>1.1. Caprinocultura em Portugal</u>	3
<u>1.2. Importância das Raças Autóctones</u>	5
<u>2. FIOLOGIA E ACTIVIDADE REPRODUTIVA DAS CABRAS</u>	8
<u>2.1. Aspectos da Sazonalidade Reprodutiva</u>	8
<u>2.2. Ciclo Éstrico</u>	9
<u>2.3. Regulação Hormonal</u>	10
<u>3. CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA</u>	14
<u>3.1. Tratamentos Progestagénicos</u>	14
<u>3.2. Prostaglandinas</u>	16
<u>3.3. Gonadotropinas</u>	17
<u>4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL</u>	18
<u>4.1. Técnicas e Métodos Utilizados</u>	20
<u>5. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE SÉMEN</u>	22
<u>5.1. Recolha e Avaliação</u>	22
<u>5.2. Sémen Fresco</u>	25
<u>5.3. Sémen Refrigerado</u>	26
<u>5.4. Sémen Congelado</u>	27
<u>5.5. Diluidores</u>	29
<u>6. SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA</u>	31
<u>6.1. Considerações Sobre a Suplementação Vitamínica</u>	31
<u>6.2. Vitaminas e a Reprodução</u>	33
<u>III. TRABALHO EXPERIMENTAL</u>	36
<u>1. MATERIAL E MÉTODOS</u>	36
<u>1.1. Animais</u>	36
<u>1.2. Actividade ovárica</u>	37
<u>1.2.1. PRÉ-TRATAMENTOS</u>	38

<u>1.2.2. PÓS-TRATAMENTOS</u>	39
<u>1.3. Tratamentos Aplicados</u>	39
<u>1.4. Recolha de Sêmen e Análises Seminais</u>	41
<u>1.5. Doses Seminais</u>	42
<u>1.6. Inseminação Artificial a Tempo Fixo</u>	42
<u>1.7. Diagnóstico de Gestação</u>	43
<u>1.8. Análise Estatística</u>	44
<u>2. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	44
<u>2.1. Estado Fisiológico Pré-Tratamento Progestagénico</u>	45
<u>2.2. Resposta Ovária ao Tratamento Progestagénico Curto+eCG ou hCG</u>	45
<u>2.3. Resposta à Inseminação Artificial</u>	46
<u>2.3.1. RAÇA</u>	47
<u>2.3.2. IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL</u>	47
<u>2.3.3. NÚMERO DE PARTOS</u>	47
<u>2.3.4. SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA</u>	47
<u>2.3.5. TRATAMENTOS HORMONAIS</u>	48
<u>2.3.6. BODE</u>	49
<u>2.3.7. TÉCNICA DE PRESERVAÇÃO DO SÊMEN</u>	49
<u>2.3.8. OS EXTERNO</u>	49
<u>2.3.9. COR DA MUCOSA VAGINAL</u>	50
<u>2.3.10. LUBRIFICAÇÃO VAGINAL</u>	50
<u>2.3.11. VISCOSIDADE DAS SECREÇÕES CERVICAIS</u>	51
<u>2.3.12. LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÊMEN</u>	52
<u>2.3.13. REFLUXO CERVICAL</u>	53
<u>2.3.14. INSEMINADOR</u>	54
<u>3. CONCLUSÕES</u>	55
<u>IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	57

RESUMO

A utilização de técnicas de inseminação artificial e sincronização de cios na produção de caprinos se torna uma estratégia capaz de assegurar um maior controlo reprodutivo, possibilitando a produtores transporem a barreira da sazonalidade reprodutiva em seu efectivo. O presente trabalho foi executado nas Quintas do Pinheiro Manso e de Santa Apolónia, do IPB-ESA (Bragança), sendo utilizadas 55 cabras da raça Serrana, ecótipo Transmontano e 10 cabras da raça Preta de Montesinho. O ensaio experimental consistiu na aplicação de suplementação vitamínica, tratamentos progestagénicos curtos+gonadotropinas coriónicas, processos de preservação de sémen, e avaliação de alguns parâmetros no momento da IA – tipos de *Os* externos, cor e lubrificação da mucosa da vagina, viscosidade do muco cervical, local de deposição do sémen, refluxo cervical e inseminador. Estes factores então foram analisados quanto os seus efeitos sobre a taxa de fertilidade das cabras. O diagnóstico de gestação decorreu aos 41 dias pós-IA. Os tratamentos progestagénicos curtos + gonadotropinas coriónicas aplicados obtiveram respostas ováricas de 98,2% das Serranas e 100% das Pretas de Montesinho. O diagnóstico de gestação constatou que 60% das Pretas de Montesinho e 69,1% das Serranas estavam gestantes. A taxa de fertilidade das cabras Serranas foi influenciada pela suplementação vitamínica, pelo bode doador de sémen, pelo tipo de *Os* externo, pela cor e lubrificação da mucosa vaginal, pelo local de deposição do sémen e pelo refluxo cervical. Nas cabras Pretas de Montesinho, o local de deposição do sémen, o refluxo cervical e, particularmente, as competências técnicas do inseminador foram os factores que condicionaram significativamente a taxa de fertilidade.

Palavras-chave: raças autóctones; tratamentos progestagénicos; inseminação artificial; cabras; taxa de fertilidade.

ABSTRACT

The use of artificial insemination and synchronization of estrus techniques in caprine production becomes a strategy capable of ensuring greater reproductive control, allowing producers to transpose the reproductive seasonality barrier into their herds. The present work was carried out in the Quintas do Pinheiro Manso and Santa Apolónia, IPB-ESA (Bragança), using 55 Serrana goats, Transmontano ecotype and 10 goats of the Preta de Montesinho breed. The experimental trial consisted in the application of vitamin supplementation, short progestogen treatments + chorionic gonadotrophins, semen preservation processes, and evaluation of some parameters at the time of AI - external types of *Os*, color and lubrication of the mucosa of the vagina, viscosity of the cervical mucus, place of semen deposition, cervical reflux and inseminator. These factors were then analyzed for their effects on the fertility rate of goats. The diagnosis of gestation occurred at 41 days post-AI. The short progestogen treatments + applied chorionic gonadotrophins obtained ovarian responses of 98.2% of the Serranas and 100% of the Pretas de Montesinho. The diagnosis of gestation found that 60% of the Preta de Montesinho and 69.1% of the Serranas were pregnant. The fertility rate of the Serranas goats was influenced by the vitamin supplementation, by the semen donor goat, by the external type of *Os*, by the color and lubrication of the vaginal mucosa, by the place of deposition of the semen and by the cervical reflux. In the Preta de Montesinho, the place of deposition of the semen, the cervical reflux, and particularly the technical skills of the inseminator were the factors that significantly conditioned the fertility rate.

Keywords: autochthonous breeds; progestogen treatments; artificial insemination; goats; fertility rate.

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA 1 – Raças caprinas autóctones e distribuição geográfica por Carolino <i>et al.</i>, (2017).</u>	6
<u>FIGURA 2 – Esquema representativo das alterações fisiológicas no ovário que ocorrem durante o ciclo éstrico da cabra: padrão do desenvolvimento folicular e o ciclo ovário. (Adaptado de Fatet <i>et al.</i>, 2011).</u>	10
<u>FIGURA 3 - Neurobiologia do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HHG). Apresentação esquemática dos principais elementos do eixo neuroendócrino controlando a reprodução (Adaptado de Roa e Tena-Sempere, 2010 por Pinilla <i>et al.</i>, 2012)</u>	11
<u>FIGURA 4 - Representação esquemática das alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo éstrico da cabra: padrão da regulação endócrina..</u>	13
<u>FIGURA 5 - Exemplares de caprinos da raça Serrana, écotipo Transmontano..</u>	37
<u>FIGURA 6 - Exemplares de caprinos da raça Preta de Montesinho.</u>	37
<u>FIGURA 7- Colheita de sangue das Cabras Serranas écotipo Transmontano.</u>	38
<u>FIGURA 8 – Colheita de sangue das Cabras Pretas de Montesinho.</u>	38
<u>FIGURA 9 - Equipamentos que compõem o eletroejaculador..</u>	41
<u>FIGURA 10 - Preparação e limpeza do bode. Momento da eletroejaculação e colheita</u>	41
<u>FIGURA 11 - Inseminação artificial das cabras Serranas. Inserção do pistolete no momento da inseminação .</u>	43
<u>FIGURA 12 – Classificação da aparência da entrada de Os cervical externo em cabras Angorá (Dayan <i>et al.</i>, 2010).</u>	43
<u>FIGURA 13 - Diagnóstico de Gestação 41 dias após a Inseminação Artificial.</u>	44

ÍNDICE DE QUADROS

<u>QUADRO I – Divisão das cabras Serranas segundo os tratamentos aplicados.</u>	40
<u>QUADRO II – Divisão das cabras Pretas de Montesinho segundo os tratamentos aplicados</u>	40
<u>QUADRO II – Idade, peso corporal e condição corporal (CC) das cabras em função da raça (Serrana vs. Preta de Montesinho) e do grupo (Controlo vs. Suplementado)</u>	44
<u>QUADRO III – Cor da mucosa vaginal quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho</u>	50
<u>QUADRO IV – Lubrificação vaginal quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho</u>	51
<u>QUADRO V – Viscosidade das secreções cervicais quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho</u>	52
<u>QUADRO VI – Local da deposição do sémen e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho</u>	53
<u>QUADRO VII – Refluxo seminal e sua relação com a taxa de fertilidade</u>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH – Hormona Anti-Mülleriana
ANCABRA – Associação Nacional de Criadores da Cabra Bravia
ANCCRAL - Associação de Criadores de Caprinos de Raça Algarvia
ANCRAS – Associação Nacional de Criadores da Raça Serrana
APCRS - Associação Portuguesa de Caprinocultores da Raça Serpentina
CC – Condição Corporal
CG - Gonadotropinas Coriônicas
CG β – Gene precursor das Gonadotropinas Coriônicas
CL – Corpo lúteo
eCG – Gonadotropina Coriônica equina
FGA – Acetato de Fluorogestona
FSH – Hormona Folículo-Estimulante
GnIH – Hormona Inibidora de Gonadotropinas
GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotropinas
h – Horas
hCG – Gonadotropina Coriônica humana
HHG – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonodas
IA – Inseminação Artificial
Kiss 1 – Gene precursor das kisspeptinas
LH – Hormona Luteinizante
LPO – Peroxidação Lipídica
MAP – Acetato de Medroxiprogesterona
mg – Miligramas
ml – Mililitros
MOET – Ovulação múltipla e transferência de embriões
mOsm – Miliosmol (milésima parte de um Osmol)
ng/ml – nanogramas/mililitros
Os – Orifício
OVIBEIRA - Associação de Produtores de Ovinos do Sul da Beira

P4 – Progesterona

PENPP4 – Níveis Plasmáticos de Progesterona

PGF2 α – Prostaglandinas F2 α

PRL - Prolactina

r.m.p – Rotações por minuto

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TE – Transferência de Embriões

TEJIV – Tecnologia do Embrião Juvenil *In Vitro*

TRA – Tecnologias de Reprodução Assistida

TSH - Hormona Estimuladora da Tireóide

UI – Unidade International

VDR - Vitamina Receptor D

μ g – Microgramas

I. INTRODUÇÃO

Foi há cerca de 10.000 anos atrás, numa zona denominada por muitos autores de “crescente fértil”, que a cabra doméstica (*Capra hircus*) exerceu papel fundamental para a revolução agrícola do período Neolítico e conseqüentemente para a evolução humana (Correia, 2004; Vieira, 2015). Sendo uma das primeiras espécies animais a ser domesticada pelo Homem sua utilização era direcionada para produção de alimentos (carne e leite), e também de vestuário. Estabeleceu-se como uma espécie animal importantíssima, por ser uma fonte de proveito para as populações, principalmente em áreas desfavoráveis para criação de outras espécies animais, onde, os caprinos com suas particularidades, conseguiam adaptar-se facilmente. A domesticação não alterou o seu padrão reprodutivo, uma vez que durante milhares de anos o Homem continuou a criá-los muito dependentes das condições ambientais, particularmente das disponibilidades naturais de alimentos que define as épocas favoráveis a reprodução (sazonalidade reprodutiva) e sobrevivência das crias (El-Maaty e El-Gawad, 2014; Valentim *et al.*, 2014; Valentim *et al.*, 2016a).

Atualmente a importância econômica dos caprinos baseia-se nestes animais a fornecer carne, leite, pele e fibras aos pequenos produtores, principalmente em países em desenvolvimento (Correia, 2004). Contudo na produção atual, a sazonalidade reprodutiva constitui um dos maiores obstáculos a maximização da rentabilidade das explorações intensivas e semi-intensivas destes animais (Sacoto, 2012; Valentim *et al.*, 2014; Valentim *et al.*, 2016a). Em sua maioria as ovelhas e as cabras não parem mais de 5 cordeiros/cabritos durante toda a sua vida produtiva, o que é manifestamente reduzido para a capacidade reprodutiva da maioria das raças destas espécies, como constatado por Steyn (2003). Este condicionamento natural em que os caprinos estão sujeitos, torna-se um obstáculo produtivo e comercial.

Através de procedimentos e técnicas de controlo reprodutivo e de reprodução assistida, tornou-se possível a diminuição dos efeitos da sazonalidade reprodutiva sobre a cadeia comercial, agregando à produção caprina novas formas de tornar os manejos mais rentáveis e eficientes, sem comprometer a sustentabilidade do sistema produtivo. O manejo reprodutivo é então um dos pontos cruciais no desenvolvimento e controlo da produção de caprinos, permitindo aos produtores minimizar as flutuações na oferta e disponibilidade de produtos em decorrência da sazonalidade, possibilitando-os traçar estratégias sobre os períodos de reprodução e as necessidades do mercado.

Este trabalho teve como foco de estudo, a aplicação de uma suplementação vitamínica, de dois métodos de sincronização de cio com administração de progestagénicos, gonadotropinas coriónicas e inseminação artificial, em caprinos da raça Serrana, écotipo Transmontano e na recente raça registada Preta de Montesinho. Com o objetivo de verificar as influências da suplementação vitamínica e dos diferentes métodos designados ao controlo reprodutivo sobre a taxa de fertilidade. Avaliar também as relações entre alguns caracteres observados da inseminação artificial, com a taxa de fertilidade dos animais.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÓMICA DA ESPÉCIE CAPRINA

1.1. Caprinocultura em Portugal

Portugal detém uma extensão territorial limitada a cerca de 91.000 km² entre os arquipélagos do Açores e da Madeira e a área continental do país. Porém, mesmo com as limitações em relação a área territorial, Portugal possui uma grande variabilidade de condições climáticas, hidrográficas, orográficas, de solos e de estruturas fundiárias, resultando em uma vasta diversidade de condições ambientais dentro do país. Estes factores ao longo dos tempos, em conjunto com tradições culturais e religiosas, e uma localização geográfica privilegiada, influenciaram direta e indiretamente a criação e a seleção de espécies pecuárias e agrícolas, sobressaindo como factor determinante a capacidade de adaptação às condições ambientais específicas de cada região (Carolino *et al.*, 2017).

Sob tais aspectos ambientais e culturais, a produção e criação de animais da espécie caprina em Portugal, se estabeleceu maioritariamente em superfícies e pouco produtivas, sendo explorada de forma extensiva num contexto geral das explorações agrícolas, como uma forma de utilizar áreas que não são ideais a agricultura ou para criação de outras espécies animais. Por ser considerado um animal de dupla aptidão, com a produção de carne e leite, e de fácil adaptação a exploração de caprinos mostra-se muitas vezes localizada em zonas pobres e com terrenos inviáveis para produção agrícola, como uma fonte de subsistência para populações nestas condições. (Fonseca, 1988; Carolino *et al.*, 2017).

A Caprinocultura não só contribuí para produção de alimentos mas também como um factor importante para a fixação da população no espaço rural, como também, desempenha papel fundamental nos sistemas de produção ambientalmente sustentáveis e atuando significativamente para a redução de risco de incêndio devido à capacidade natural dos caprinos de atuar no controle e limpeza da vegetação arbustiva, facto já salientado por Miranda do Vale (1949), que destaca a capacidade de aproveitamento alimentar destes animais, “é certo que o caprino devasta as culturas e ataca os mais robustos vegetais, mas nenhum outro animal tira tão frutuoso proveito de substâncias impróprias para a alimentação de qualquer outra espécie”(Miranda do Vale, 1949 citado por Carolino *et al.*, 2017).

Os caprinos alcançaram grande reconhecimento em todo o mundo, tanto por sua conhecida natureza adaptável, como também, por gerar produtos de qualidade e de elevado valor comercial. Os números a nível mundial do efectivo caprino já atingiram

os 1.002.810.368 de cabeças em 2016, enquanto que em 2000 o efectivo era de 751.629.181 cabeças, manifestando um aumento de 25% do efectivo neste período (FAO, 2018). Entretanto, o efectivo caprino em Portugal vem sofrendo decréscimos ano após ano, situação que se arrasta já há mais de 15 anos. Com um efectivo de 630 mil animais no ano 2000, para um efectivo de 347 mil animais no ano de 2016, ou seja, um decréscimo a cerca de 45% (INE, 2017; FAO, 2018). Esta regressão é determinantemente vinculada a grande instabilidade do mercado de produtos caprinos, que se demonstra muitas vezes inconsistente (Carolino *et al.*, 2017).

Esta situação retrógrada foi agravada principalmente, pelo exódo das regiões rurais e o envelhecimento da população do campo, que deixaram de apostar na caprinocultura como uma atividade rentável, tendo como consequência a redução do número de explorações e do efectivo caprino. O surto de febre aftosa na Grã-Bretanha no ano de 2001, também contribuiu de forma indireta, uma vez que abalou o mercado europeu de carne de pequenos ruminantes, exigindo medidas de erradicação da doença baseado em abates sanitários e restrições de circulação de animais, o que impactou na produção, trocas comerciais, consumo e preço dos produtos oriundo destas espécies (MADRP, 2007; Carolino *et al.*, 2017).

A situação vem a mudar nos últimos anos, com o surgimento de algumas explorações de caprinos em localidades do território continental, baseado em um sistema mais produtivo e semi-extensivo, voltado para a produção de leite, trabalhando quase que exclusivamente com raças exóticas provenientes da França, como as raças Saanen e Alpina e também da Espanha, como a Murciana Granadina, assim como os cruzamentos oriundos destes. O predomínio nestes casos é de um efectivo maioritariamente leiteiro, concentrado nas regiões norte (Trás-os-Montes) e interior (Beira Interior), representando cerca de 36% das explorações, com dimensões médias estimadas em cerca de 12 animais por exploração, no ano de 2009 (INE, 2011; Carolino *et al.*, 2017).

Atualmente o efectivo caprino português é constituído por cerca de 293 mil fêmeas reprodutoras de um número total de 347 mil cabeças, considerando todo o território português, englobando a área continental e as ilhas portuguesas. As regiões Centro (27,7%), Norte (24,8%) e Alentejo (24,8%) detêm os maiores efectivos do país (INE, 2017) e apenas 12,5% do efectivo total, são representadas pelas raças autóctones Algarvia, Bravia, Charnequeira, Preta de Montesinho, Serpentina e Serrana, enquanto as raças exóticas apresentam uma proporção inferior a 5%. Concluindo assim, que a maior

parte dos caprinos explorados em Portugal resultam de cruzamentos diversos (Carolino *et al.*, 2017).

1.2. Importância das Raças Autóctones

O processo de intervenção do homem ao longo dos séculos sobre os caprinos condicionaram os animais aos diversos efeitos da interação humana e a sua forma de criação, dando origem a um elevado número de raças diversificadas. Inerente a este facto, alguns outros agentes foram tão determinantes quanto, actuando sob formas distintas sobre os animais, como, as variações de clima de diferentes regiões, disponibilidade de alimentos, doenças, critérios de seleção e deriva genética, entre outros factores, que auxiliaram na expansão genética dentro da espécie, originando raças e variações únicas. Neste sentido, cada raça ou ecótipo constitui um conjunto de genes impossíveis de recuperar uma vez perdido (FAO, 1999; NRC, 1993 citados por Correia, 2004).

As raças autóctones portuguesas possuem sua origem considerada controversa por muitos autores, mas são geralmente apontadas como o resultado de cruzamentos entre animais de diversas regiões, que englobam desde as regiões norte e sul da Península Ibérica, norte da África e até mesmo regiões mais distantes, como consequência do comércio e passagens de outros povos por estas zonas, além das viagens de explorações e descobrimentos (Cardigos, 1981; Fialho, 1996; Rosa, 2013).

Devido a grande heterogeneidade do efectivo caprino português, o seu agrupamento por raças, ecótipos ou variedades sempre foi motivo de divergências. Antigamente as várias populações caprinas de Portugal eram divididas em dois grupos, o da Serra da Estrela ou Serrana e o da Charnequeira, ainda que alguns autores constituíam uma divisão de acordo com as regiões de exploração em vez de classificá-las em grupos étnicos. (Miranda Do Vale, 1949; Cardigos, 1981 citados por Carolino, 2017).

Em Portugal atualmente existem 6 raças caprinas autóctones oficialmente reconhecidas: Bravia, Serrana (com 4 ecótipos - Transmontano, Jarmelista, Serra e Ribatejano), Preta de Montesinho, Charnequeira (com 2 variedades - Beiroa e Alentejana), Serpentina e Algarvia, espalhadas pelo território (Carolino *et al.*, 2017) (Figura 1) e segundo os critérios utilizados pela União Europeia (Regulamento da CE N. 445/2002) para definir o estatuto de risco de uma raça, todas as raças caprinas

autóctones portuguesas são consideradas como ameaçadas de extinção, com exceção da Serrana (Correia, 2004).

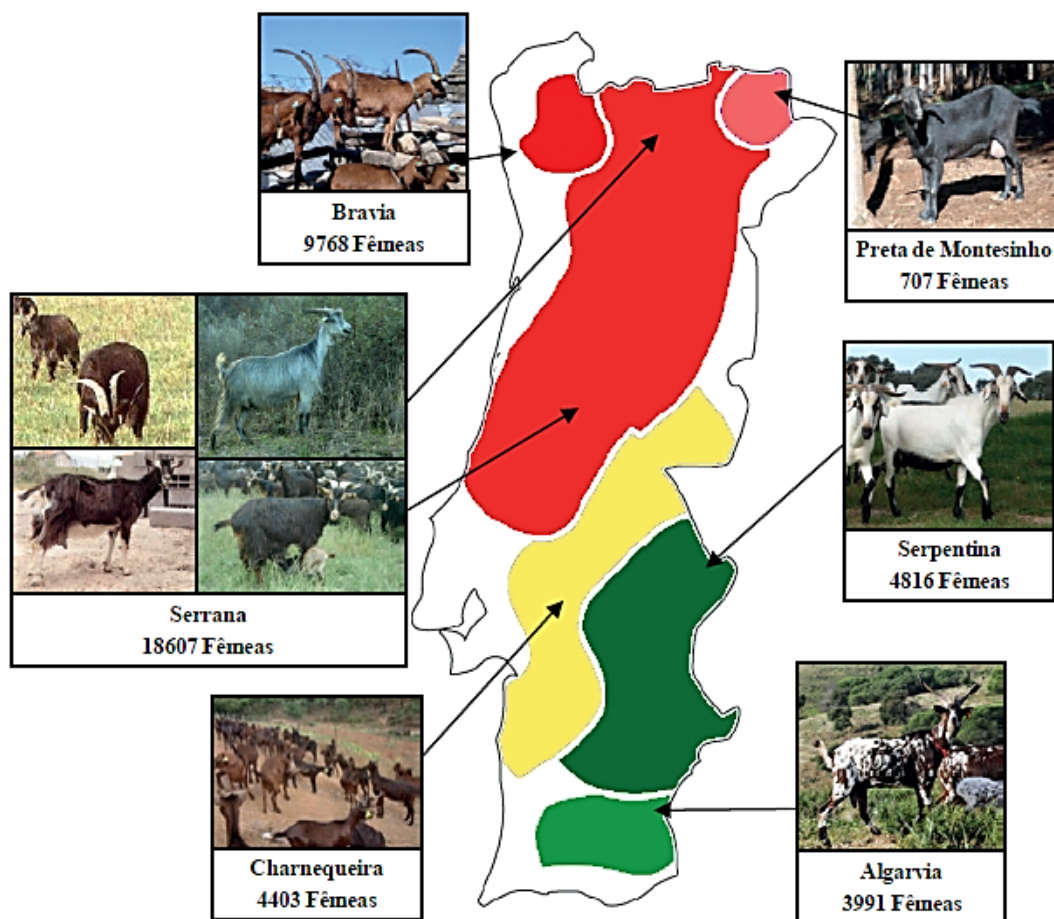


FIGURA 1 – Raças caprinas autóctones e distribuição geográfica por Carolino *et al.*, (2017).

Dentre as raças portuguesas, as cabras Pretas de Montesinho foram reconhecidas definitivamente como uma raça oficial apenas em 2009 e o nome da raça está associado à sua cor e a seu solar (Parque Natural de Montesinho), onde é conhecida desde antigamente como Cabra Antiga, Galega, Bragançana ou Preta devido suas características morfológicas que divergia das outras raças autóctones conhecidas. A raça atualmente possui um efectivo muito reduzido, com cerca de 800 animais, distribuídos por 55 rebanhos. E estes efectivos encontram-se exclusivamente na zona Nordeste de Portugal, na área abrangida pelo Parque Natural de Montesinho (Afonso *et al.*, 2015; Carolino *et al.*, 2017).

Dentro das raças autóctones portuguesas, todas assumem um papel de importância na produção de alimentos tradicionais e de qualidade, possibilitando a promoção de uma forma de sustento aos produtores rurais. Todas as raças possuem dupla aptidão, contudo, para a produção do leite, especialmente para produção de queijos, geralmente

são utilizadas as quatro raças caprinas de maior vocação leiteira: Algarvia, Serrana, Serpentina e Charnequeira. Enquanto que as cabras Bravias e Pretas de Montesinho comumente são destinadas apenas para a produção de carne (Carolino *et al.*, 2017). Entretanto, as actividades que normalmente envolvem a caprinocultura, baseada em trabalho braçal e dispendioso, associada ao êxodo rural que tem ocorrido nos últimos 40 anos em Portugal, fez com que o sector sofresse elevadas baixas de mão-de-obra, associadas a um aumento da idade dos criadores (INE, 2007) que resulta em grandes carências ao nível técnico e zootécnico na maioria das explorações (Carolino *et al.*, 2017).

A União Europeia definiu e criou certificações (Denominação de Origem Protegida-DOP, Indicação Geográfica Protegida-IGP e Especialidade Tradicional Garantida-ETG) permitindo a defesa e a promoção do património alimentar tradicional dos países comunitários, incentivando o desenvolvimento da criação de raças autóctones e atualmente, todas as raças caprinas autóctones portuguesas estão incluídas em programas de conservação e melhoramento que tiveram início na década de 90. O delineamento e a execução destes planos são da responsabilidade das Associações de Criadores gestoras dos livros genealógicos das várias raças (Carolino *et al.*, 2017).

Em Portugal se implementaram diferentes projectos para a protecção e criação das raças autóctones e a fundação de associações de criadores de raças caprinas autóctones, com o intuito de consolidar e promover a produção e preservação destes animais, (ANCRAS: Associação Nacional de Criadores da Raça Serrana – ANCABRA: Associação Nacional de Criadores da Cabra Bravia – ANCCRAL: Associação de Criadores de Caprinos de Raça Algarvia – APCRS: Associação de Portuguesa de Caprinocultores da Raça Serpentina – OVIBEIRA: Associação de Produtores de Ovinos do Sul da Beira), atuando em explorações de caprinos da raça Serrana e Preta de Montesinho, Bravia, Algarvia, Serpentina e Charnequeira (FAO, 1999 citado por Correia, 2004; ANCRAS, 2017; SPREGA, 2017; APCRS, 2017; OVIBEIRA, 2017).

É conhecida a necessidade de preservar as raças autóctones, uma vez que elas ocupam um importante lugar nos sistemas de produção sustentáveis e possuem várias implicações no meio rural: permitindo o aproveitamento de zonas marginais, contribuindo para a não desertificação, estimulam e defendem a biodiversidade e enriquecem, com produtos tradicionais, o património histórico, cultural e social português (Portugal, 2001 citado por Correia, 2004).

Para que estes sistemas se mantenham terão que se tornar mais produtivos e eficientes, de forma a serem rentáveis. Esta rentabilidade não pode pôr em causa as características do produto final, nem deixar de lado a sustentabilidade do sistema produtivo e a preocupação ambiental. E para que estes sistemas de produção sustentáveis se tornem mais eficientes e aplicáveis, são necessários conhecimentos mais profundos sobre os animais tanto a nível genético, como produtivo e reprodutivo (Correia, 2004).

2. FISILOGIA E ACTIVIDADE REPRODUTIVA DAS CABRAS

2.1. Sazonalidade Reprodutiva

A sazonalidade reprodutiva é uma característica adaptativa apresentada por diversas espécies animais, que ajusta os nascimentos aos períodos do ano em que as disponibilidades naturais de alimentos e as condições climáticas são mais favoráveis ao início da lactação e ao desenvolvimento final da gestação e pós-natal. A sazonalidade reprodutiva então, afecta positivamente as taxas de sobrevivência e o desenvolvimento das crias (Valentim, 2004; Leão, 2018).

O fotoperíodo é um dos factores que mais influenciam na sazonalidade reprodutiva em pequenos ruminantes. A importância do fotoperíodo sobre os pequenos ruminantes é ampliada do equador até às regiões polares, ou seja, aumenta ou diminui conforme a latitude (Leboeuf *et al.*, 2000; Baril *et al.*, 1993; Steyn, 2003; Valentim, 2004 ; Leão, 2018). Este fenómeno está relacionado com a duração da fase luminosa e escura dos dias, das quais a produção de melatonina ocorre exclusivamente durante os períodos de escuro (nocturno). Desta forma, a duração do dia e da noite influencia os níveis de melatonina no organismo, e suas ações sobre a actividade reprodutiva (Baril *et al.*, 1993; Gordon, 1997; Steyn, 2003; Valentim, 2004; Abecia e Forcada, 2010; Abecia *et al.*, 2012).

Do ponto de vista reprodutivo, os caprinos e ovinos são animais poliéstricos sazonais, exibindo actividade reprodutiva preferencialmente em dias de fotoperíodo decrescente ou “curto”, para que assim, os partos ocorram na Primavera, época em que as condições ambientais são mais favoráveis tanto para a fêmea como para as crias (Baril *et al.*, 1993; Leboeuf *et al.*, 2000; Freitas e Rubianes, 2004; Valentim *et al.*, 2004; Scaramuzzi *et al.*, 2006; Safari *et al.*, 2014; Valentim *et al.*, 2014; Valentim *et al.*, 2016a).

A delimitação da estação reprodutiva, está associada a vários factores, tais como: o fotoperíodo, a latitude, as condições climatéricas, a alimentação, a condição corporal, a idade, a saúde, o estado fisiológico e interações sociais (Mascarenhas, 2006; Greyling, 2010; Fatet *et al.*, 2011). A estação reprodutiva das espécies de pequenos ruminantes de zonas temperadas geralmente se inicia por volta do solstício de Verão e a estação de anestro após o solstício de Inverno (Garcia *et al.*, 2004; Valentim *et al.*, 2016a).

Neste sentido, se faz necessário a identificação do estado fisiológico e ambiental das fêmeas e machos antes mesmo de começar os processos de controlo da actividade reprodutiva e a aplicação de técnicas de inseminação artificial, analisando com antecedência os factores influentes sobre a reprodução afim de gerar resultados eficientes principalmente nas raças que apresentam sazonalidade reprodutiva mais acentuada (Steyn, 2003).

2.2. Ciclo Éstrico

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

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

Nos caprinos, a duração do ciclo éstrico é aproximadamente de 21 dias podendo, no entanto, variar. A duração do cio é de aproximadamente 24 a 48 horas variando em função da genética (raça e indivíduo), do indivíduo (idade, estado de saúde), das condições ambientais e factores sociais. Os sinais mais visíveis do cio são: intranquilidade, vocalizações frequente e de maior amplitude, agitação rápida e constante da cauda, apetite reduzido, procura do macho, montas homossexuais, diminuição da produção de leite (se está em lactação), edema vulvar, corrimento vaginal (Hafez & Hafez, 2004).

O ciclo éstrico pode ser subdividido em quatro fases (Figura 2), caracterizadas por manifestações ou modificações fisiológicas específicas e com diferentes períodos de duração. O proestro e o estro ocorrem na fase de desenvolvimento folicular (crescimento e maturação folicular), quando predomina o efeito dos estrogénios (Grunert *et al.*, 2005

citado por Vitaliano, 2011). O metaestro e o diestro ocorrem na fase lútea (formação e funcionamento do CL), quando prevalece a acção progestagénica (Grunert *et al.*, 2005 citados por Vitaliano, 2011).

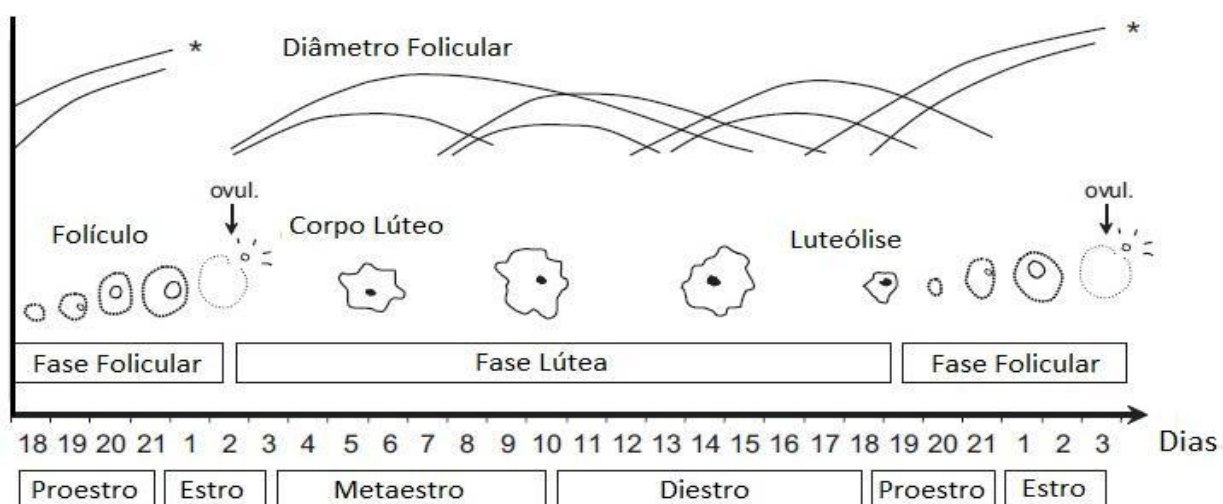


FIGURA 2 – Esquema representativo das alterações fisiológicas no ovário que ocorrem durante o ciclo estrico da cabra: padrão do desenvolvimento folicular e o ciclo ovárico. (Adaptado de Fatet *et al.*, 2011).

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

2.3. Regulação Hormonal

A actividade reprodutiva é regulada por inter-relações hormonais de origem hipotalâmica (GnRH), hipofisária (FSH e LH), folicular (estradiol e inibina), lútea (progesterona e oxitocina) e uterina (PGF2 α). O processo de regulação é desencadeado através de estímulos sobre o hipotálamo, oriundo de fontes externas (fotoperíodo, alimentação, clima, factores sociais) ou internas (condição fisiológica, hormonas, idade) (Karsch *et al.* 1984; Scaramuzzi *et al.*, 1993 citado por Raposo, 2011).

O hipotálamo é uma área do diencéfalo que forma o piso do terceiro ventrículo, que inclui o quiasma óptico, *tuber cinereum*, corpos mamilares e eminência média. O hipotálamo produz péptidos e aminas que atuam sobre a hipófise para produzir: 1) hormonas trópicas, que por sua vez influenciam a produção de hormonas por tecido endócrino alvo ou, 2) hormonas que produzem diretamente um efeito biológico nos

tecidos. Além disso, é também o centro de controle para um grande número de caminhos de controle do sistema nervoso autônomo (Gallego-Calvo *et al.*, 2015).

A inter-relação das hormonas e seus efeitos sobre o tracto reprodutivo são controladas por uma série de eventos fisiológicos, com atuações inibitórias ou estimulantes à libertação de hormonas, mecanimos estes que agem de modo simultâneo e em consonância. Os neurônios componentes do hipotálamo são influenciados por captação de estímulos fisiológicos por entradas trans-sinápticas e células de glia, determinando o aumento ou diminuição da libertação da hormona GnRH, que atua sobre a glândula hipófise anterior determinando a libertação pulsátil de gonadotropinas (LH e FSH), condicionando a maturação e regulação das funções gonadais. A função do eixo HHG fica sob a regulação de vários sinais periféricos, que incluem a ação de esteroides gonadais responsáveis por controle através de retroalimentação: como a testosterona testicular que inibe a libertação de GnRH/Gonadotropinas, enquanto que os esteroides ováricos (Progesterona e Estadiol) atuam tanto com retroalimentação negativa quanto positiva, dependendo do estágio do ciclo ovariano (Pinilla *et al.*, 2012) (Figura 3).

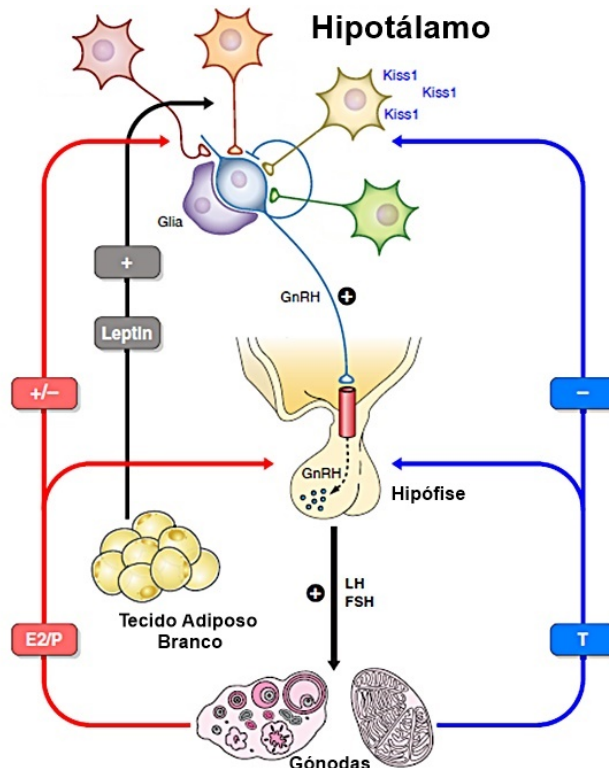


FIGURA 3 - Neurobiologia do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas (HHG). Apresentação esquemática dos principais elementos do eixo neuroendócrino controlando a reprodução (Adaptado de Roa e Tena-Sempere, 2010 por Pinilla *et al.*, 2012). (Leptin): Leptina, (E2): Estradiol, (P): Progesterona, (T): Testosterona Testicular, (Kiss1): kisspeptinas.

Outros reguladores periféricos do eixo HHG são hormonas metabólicas; entre eles, a leptina que exerce o papel estimulante/permisivo, produzido pelo tecido adiposo branco, que também condicionam a libertação de GnRH. Entre os sinais excitatórios mais destacados, se apresenta a Kiss1 (kisspeptinas) que atua, estimulando a libertação de GnRH mais predominante, e possui efeito directo no hipotálamo, e não a nível da hipófise ou gónadas (Pinilla *et al.*, 2012; Abbara *et al.*, 2013; Bailey, 2016) (Figura 3).

A GnRH principal hormona envolvida na regulação hormonal e que desencadeia uma série de eventos fisiológicos, é libertada pelo hipotálamo e estimula a secreção de FSH e LH pela hipófise anterior, e controla a sequência de eventos endócrinos que regulam o ciclo éstrico e a ovulação. As gonadotropinas FSH e LH produzidas pela hipófise anterior, têm como função estimular o desenvolvimento folicular, originando a ovulação e o desenvolvimento do CL subsequente. Por sua vez, a inibina e o estradiol, libertados pelos folículos, e a progesterona produzida pelo CL formado após a última ovulação regulam o desenvolvimento folicular através da retroalimentação negativa que exercem a nível hipofisário e hipotalâmico, impedindo a maturação de outros folículos (Stabenfeldt e Edqvist, 1996; Fortune *et al.*, 2004; Simões e Mascarenhas, 2004 citados por Raposo 2011).

A secreção de GnRH é governada por dois mecanismos de controle diferentes: descarga pulsátil e ovulatória (Karsch *et al.*, 1984; Goodman, 1994; Sisk & Foster, 2004). No primeiro caso se baseia por descargas intermitentes e a secreção é regulada pelo nível de LH na circulação periférica, a frequência de pulso de LH é um determinante crítico do desenvolvimento gonadal e secreção de esteróides tanto em machos como em fêmeas. A descarga ovulatória gera uma descarga súbita e maciça de GnRH e LH para induzir a ovulação na fêmea (onda pré-ovulatória), isso então é acompanhado por um aumento de estradiol (E2) no período (Karsch *et al.*, 1984; Goodman, 1994; Raposo 2011).

A 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).

As concentrações de estradiol apresentam um pico dois dias antes da ovulação (Castro *et al.*, 1999). A hormona estradiol, é o principal desencadeador das mudanças

comportamentais. Assim, a proporção de fêmeas manifestando estro, bem como a intensidade da expressão da receptividade aumentam quando os níveis de estradiol são elevados (Okada *et al.*, 2001).

O pico de LH na cabra tem a duração de aproximadamente oito a dez horas, sendo iniciado cerca de três horas após o estradiol ter atingido sua concentração máxima (Chemineau *et al.*, 1982). A ovulação ocorre em média 20 horas após o pico de LH, aproximadamente 30 a 36 horas após o início do estro (Chemineau & Delgadillo, 1994).

Após a ovulação e a formação do CL, que corresponde a fase lútea do ciclo éstrico, ocorre uma elevação dos níveis circulantes de progesterona, que actuam a nível do hipotálamo, induzindo uma diminuição da frequência de libertação de GnRH e consequentemente, de LH e FSH (Karsch *et al.*, 1984; Bettencourt, 1999; Pinilla *et al.*, 2012). Nesta altura, os níveis basais de estrogénios reduzem a capacidade de resposta da hipófise anterior à acção da GnRH, determinando igualmente uma diminuição da síntese de gonadotropinas (Karsch *et al.*, 1984; Bettencourt, 1999; Pinilla *et al.*, 2012). A reduzida frequência de secreção de LH e FSH impede o recrutamento e maturação folicular e, subsequente, a ovulação.

A regressão do CL induzida pela PGF2 α uterina, é imprescindível para a ocorrência normal da ciclicidade, relacionada com a dinâmica folicular. Esta regressão é constituída por duas fases distintas no tempo e pelos mecanismos: (a) luteólise funcional, caracterizada pelo declínio rápido da progesterona de origem lútea e (b) luteólise estrutural, constituída pelos eventos que conduzem a reabsorção do CL e que ocorre em alguns dias (Meidan *et al.*, 2000 citado por Raposo, 2011) (Figura 4).

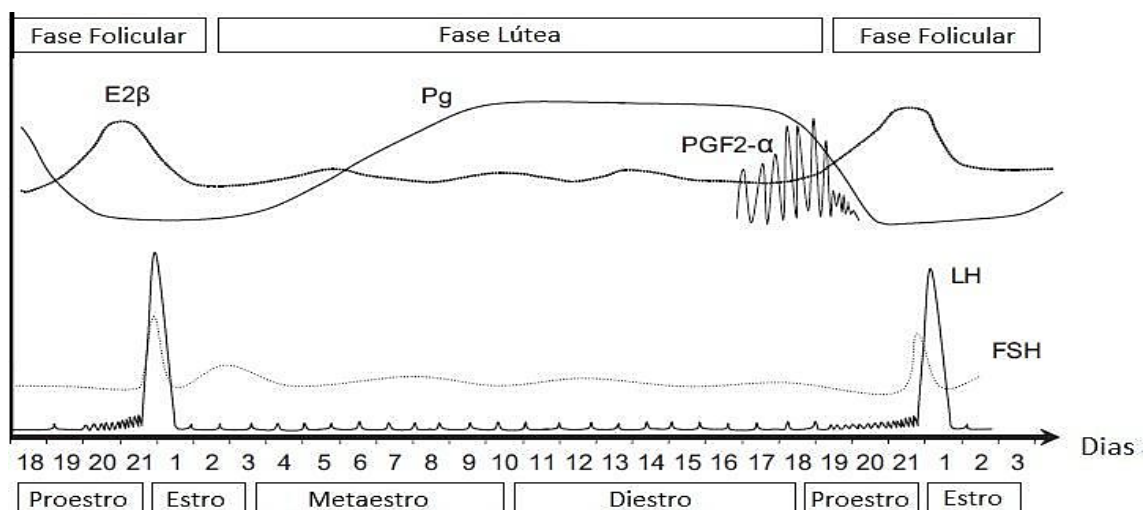


FIGURA 4 - Representação esquemática das alterações hormonais que ocorrem durante o ciclo éstrico da cabra: padrão da regulação endócrina. Adaptado de Fatet *et al.* (2010).

Tanto na ovelha como na cabra, a produção de PGF2 pelo endométrio é regulada por interações entre a progesterona, o estradiol e a oxitocina (Cooke *et al.*, 1998 citado por Raposo, 2011). O estradiol, actuando a nível do endométrio, eleva a formação de receptores de oxitocina e activa as enzimas necessárias à síntese de PGF2 α (Huslig *et al.*, 1979; Dey *et al.*, 1982 citados por Bettencourt, 1999; Flint *et al.*, 1990).

3. CONTROLO DA ACTIVIDADE REPRODUTIVA

O controlo da actividade reprodutiva é uma das técnicas de manejo mais importantes em qualquer exploração animal (Azevedo *et al.*, 2006, Abecia *et al.*, 2012 e Valentim *et al.*, 2016a). Possui ainda um grande interesse a sua utilização nos períodos de anestro, permitindo aumentar as taxas reprodutivas (fertilidade aparente, prolificidade e fecundidade) e produtivas (produtividade numérica e produtividade do sistema) e a obtenção de produtos de maior qualidade e homogeneidade (Gordon, 1997; Ungerfeld e Rubianes, 2002; Aisen, 2004a; Valentim *et al.*, 2016c; Leão, 2018).

Existem métodos de controlo da actividade reprodutiva “naturais” e/ou “hormonais” (Morello e Chemineau, 2004; Valentim *et al.*, 2016a,b). Os métodos naturais envolvem a utilização do flushing, do “efeito macho” e dos tratamentos luminosos (Baril *et al.*, 1993; Morello e Chemineau, 2004; Valentim, 2004; Valentim *et al.*, 2016a; Leão, 2018). Estes métodos, geralmente conseguem interromper o anestro, mas não garantem uma sincronização estreita dosaios e das ovulações (Valentim *et al.*, 2016a). Os métodos hormonais implicam a administração de melatonina exógena (estação de anestro), de progesterona ou seus análogos sintéticos (progestagénios), de prostaglandinas F2 α (PGF2 α) ou seus análogos sintéticos (estação reprodutiva) e caso se queira promover ainda a ovulação de gonadotropinas – FSH (Hormona Folículo-Estimulante), eCG (Gonatotropina Coriónica equina) ou hCG (Gonatotropina Coriónica humana) (Baril *et al.*, 1993; Gordon, 1997; Freitas e Rubianes, 2004; Morello e Chemineau, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Valentim *et al.*, 2016b; Leão, 2018).

3.1. Tratamentos Progestagénicos

O controlo da actividade ovárica assenta na utilização de hormonas exógenas que mimetizam artificialmente as variações das secreções endócrinas endógenas. Os progestagénios, são as hormonas mais utilizadas nestas situações e atuam simulando os efeitos naturais da progesterona que impedem a ovulação e prolongam a fase lútea. Os progestagénios possuem uma semivida curta, já que são rapidamente metabolizados

(Valentim *et al.*, 2006). Ao fim da sua utilização e metabolização produz-se um rápido regresso à actividade ovárica (Valentim *et al.*, 2006, citado por Cortez, 2012).

Durante a estação de anestro apenas a progesterona/progestagénios permite uma sincronização estreita da actividade reprodutiva, particularmente quando acompanhadas da administração de gonadotropinas exógenas (Baril *et al.*, 1993; Gordon, 1997; Ungerfeld e Rubianes, 2002; Azevedo *et al.*, 2006; Valentim *et al.*, 2016b; Leão, 2018).

Durante a estação reprodutiva a sincronização da actividade reprodutiva pode ser conseguida através do uso de progesterona/progestagénios, de PGF2 α ou seus análogos sintéticos ou da combinação destas hormonas (Ungerfeld e Rubianes, 2002; Freitas e Rubianes, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b; Leão 2018). Nesta altura, a aplicação dos tratamentos de controlo da actividade reprodutiva tendem a produzir taxas de fertilidade inferiores às que podem ser alcançadas naturalmente (Letelier *et al.*, 2011). O uso de prostagénios parece alterar o crescimento folicular final (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005 citados por Letelier *et al.*, 2011), o padrão de secreção de LH (Gordon, 1975; Scaramuzzi *et al.*, 1988; Menchaca e Rubianes, 2004 citados por Letelier *et al.*, 2011), a qualidade das ovulações (Killian *et al.*, 1985; Viñoles *et al.*, 2001; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2005 citados por Letelier *et al.*, 2011) o transporte e a sobrevivência dos espermatozóides no tracto genital feminino (Hawk e Conley, 1971 citados por Letelier *et al.*, 2011).

O método de controlo da actividade ovárica mais comum em todo o mundo baseia-se no uso de esponjas vaginais impregnadas com progestagénios FGA (Acetato de Fluorogesterona) ou MAP (Acetato de medroxiprogesterona). As esponjas vaginais constituem o método mais comum e prático de administração de progestagénios (Valentim *et al.*, 2006). O progestagénio é libertado gradualmente para a corrente sanguínea, simulando a fase lútea bloqueando a ovulação até a esponja vaginal ser removida e a hormona ser eliminada da circulação sanguínea (Mascarenhas, 2006). Comparativamente, o FGA permite um controlo mais preciso da actividade ovárica, particularmente importante quando a beneficiação é assegurada por IA (Valentim *et al.*, 2006).

A progesterona/progestagénios impede a retoma da ciclicidade, pelo que o tratamento deve ter uma duração semelhante à da fase lútea (tratamento progestagénico “longo”) – 12-15 dias (ovinos) (Baril *et al.*, 1993; Azevedo *et al.*, 2006; Granados *et al.*, 2006; Letelier *et al.*, 2011; Valentim *et al.*, 2016b; Leão, 2018) e 14-18 dias (caprinos) (Baril *et al.*, 1993; Freitas e Rubianes, 2004; Granados *et al.*, 2006). Nas ovelhas, o cio

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

Os tratamentos “progestagénicos “curtos” têm uma duração de 5-7 dias e implicam igualmente a administração de PGF2 α (Ungerfeld e Rubianes, 2002; Freitas e Rubianes, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Granados *et al.*, 2006; Valentim *et al.*, 2016b; Leão, 2018). Esta deve ser feita quando da colocação das esponjas vaginais com progestagénios, a fim de evitar os efeitos deletérios da PGF2 α sobre a formação de depósitos, o transporte e a capacitação dos espermatozóides no tracto genital feminino e os mecanismos ovários que levam à ovulação (Freitas e Rubianes, 2004; Valentim *et al.*, 2016b). No fim dos tratamentos de controlo da actividade ovária pode ser administrada uma gonadotropina (Baril *et al.*, 1993; Gordon, 1997; Freitas e Rubianes, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Valentim *et al.*, 2014; Valentim *et al.*, 2016b). Na sincronização do cio das cabras, a administração de gonadotropinas exógenas antecipa a ovulação e eleva o grau de sincronização das mesmas (Westhuysen, 1979; Ritar *et al.*, 1984; citados por Granados *et al.*, 2006).

Depois da remoção das esponjas vaginais com progestagénios, o cio começa em 36 horas (Gordon, 1997) e a ovulação em cerca de 58-60 horas (Steyn, 2003). Quando tratadas com CIDR (Controlled Internal Drug Release) durante 12 dias, as ovelhas e as cabras em anestro entram em cio e ovulam 4 horas mais cedo, ou seja, cerca de 54 horas após a remoção destes dispositivos vaginais (Gordon, 1997; Steyn, 2003 ; Leão, 2018). Estes valores variam segundo a raça e a estação do ano (Gordon, 1997; Steyn, 2003). Na estação reprodutiva, a ovulação pode ocorrer 48-50 horas após a remoção do CIDR (Steyn, 2003). Para uma inseminação única, o tempo “universalmente” aceite para se proceder à IA é de 42-46 horas pós-remoção do dispositivo (Gordon, 1997).

3.2. Prostaglandinas

Nos ruminantes, a prostaglandina F2 α (PGF2 α) é o agente luteolítico natural responsável pela destruição do CL (fim da fase lútea) (Hafez & Hafez., 2004; Abecia *et al.*, 2012) e pelo começo de um novo ciclo (McCracken *et al.*, 1972; Sicherle, 2005; Dixon *et al.*, 2006). A queda dos níveis circulantes de progesterona leva ao aumento da

secreção de gonadotropinas e à ovulação (Benites, 1999). Os análogos sintéticos da PGF2 α são mais baratos e podem ser usados em doses menores (Rubianes, 2000).

Na ausência de um CL, a PGF2 α ou seus análogos são totalmente ineficazes (Rathbone *et al.*, 2001; citados por Neto, 2009; Abecia *et al.*, 2012), pelo que não podem ser usados na indução da actividade ovárica na estação de anestro (Carlson *et al.*, 1973; Abecia *et al.*, 2012). De acordo com Rubianes (2000) as PGF2 α só actuam quando existe um CL funcional (com receptores para a PGF2 α). Nos ruminantes, o CL começa a organizar-se logo após a ovulação, mas só se torna funcional 1-2 dias depois da ovulação (Moraes *et al.*, 2003). A plenitude funcional só ocorre no 5º dia (Moraes *et al.*, 2003). A PGF2 α só destrói eficazmente o CL a partir do 2-3º dia (Rubianes *et al.*, 2003; Abecia *et al.*, 2012) ou do 5º dia do ciclo éstrico (Benites, 1999; Moraes *et al.*, 2003).

A administração de uma injeção de PGF2 α , com o objectivo de garantir o controlo da actividade ovárica das fêmeas que ainda possuam um corpo lúteo funcional após os tratamentos progestagénios é aconselhada a fim de reduzir os efeitos deletérios deste tipo de tratamento (Valentim *et al.*, 2006). Mais recentemente, alguns autores propõem que a administração de PGF2 α seja feita antes do tratamento curto com progestagénios. Desta forma, poder-se-ão evitar os efeitos negativos da PGF2 α sobre o momento da ovulação (Valentim *et al.*, 2006).

As PGF2 α destroem o corpo lúteo (CL) funcional, através de duas injeções administradas com 7-9 dias de intervalo, de forma que todas as ovelhas iniciam simultaneamente um novo ciclo éstrico (Freitas e Rubianes, 2004, Azevedo *et al.*, 2006, Letelier *et al.*, 2011 e Valentim *et al.*, 2016b). Nas cabras, o tratamento com PGF2 α deve ter um intervalo de duração de 10-14 dias (Baril *et al.*, 1993 e Freitas e Rubianes, 2004). Nas ovelhas, o cio inicia-se em 25-48 horas (Freitas e Rubianes, 2004) ou 36-48 horas (Baril *et al.*, 1993) e, nas cabras, em 72 horas (Bonilla, 2001) ou 72-96 horas (Baril *et al.*, 1993).

3.3. Gonadotropinas

As gonadotropinas coriónicas (CG) são hormonas pertencentes à mesma família que a hormona folículo-gonadotrópico estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) e hormona estimuladora da tireóide (TSH). CG é conhecido por ocorrer apenas em primatas e equídeos (Henke e Gromoll., 2008).

As gonadotropinas mais utilizadas são a eCG e a hCG, pelo preço, por poderem ser injectadas intramuscularmente uma só vez, por terem efeitos semelhantes à FSH e à LH e promoverem melhores respostas ováricas (Azevedo *et al.*, 2006; Letelier *et al.*, 2011; Valentim *et al.*, 2016b; Leão, 2018). Suportam os mecanismos ováricos que levam ao crescimento e à maturação dos folículos, à ovulação e à correcta luteinização do corpólúteo (CL) (Baril *et al.*, 1993; Freitas e Rubianes, 2004; Valentim *et al.*, 2016b). Nas ovelhas, a eCG deve ser administrada quando da remoção das esponjas vaginais (Baril *et al.*, 1993) e nas malatas e nas cabras leiteiras cerca de 48 horas antes (Baril *et al.*, 1993). A dose varia de acordo com vários factores: genética, idade, estação do ano, estado fisiológico da fêmea (Baril *et al.*, 1993; Gordon, 1997). As raças prolíficas e pouco sazonais são geralmente mais sensíveis à administração de eCG (Baril *et al.*, 1993).

A eCG possui uma acção FSH + LH. A acção FSH é mais prolongada e a LH menos marcada (Valentim *et al.*, 2006). Liga-se a receptores foliculares de FSH e de LH e a receptores lúteos de LH (Stewart e Allen, 1981; citados por Neto, 2009), ou seja, condiciona o crescimento e a maturação folicular, a ovulação e vida do CL. Promove o desenvolvimento folicular, recrutando novos folículos e auxiliando na sincronização da ovulação (Baldassare e Karatzas, 2004). *Per se*, a eCG não permite o controlo da actividade ovárica (Evans e Robinson 1980; e Martemucci e D'Alessandro, 2011) mas sim, quando aplicada no âmbito de tratamentos progestagénios e/ou com PGF2 α , ela melhora a resposta ovárica e aumenta as taxas de fertilidade e de prolificidade (Dias *et al.*, 2001 e Barret *et al.*, 2004; Neto, 2009).

A hCG possui efeitos biológicos semelhantes à FSH e à LH, com predomínio deste último (Khan *et al.*, 2003; Gómez-Brunet *et al.*, 2007), estimulando a maturação dos oócitos e a ovulação (Khan *et al.*, 2003). Além de induzir a ovulação de folículos maduros, possui efeitos luteotrópicos (Khan *et al.*, 2003; Gómez-Brunet *et al.*, 2007; Dias, 2011). Eventualmente, pode determinar até a ovulação de folículos de pequeno tamanho e de baixa fertilidade. Os seus efeitos luteotrópicos parecem diminuir as perdas embrionárias (Khan *et al.*, 2003; Valentim *et al.*, 2006; Dias, 2011) e, consequentemente, elevam a taxa de fertilidade aparente (Khan *et al.*, 2003).

Na estação reprodutiva após a aplicação de tratamentos de controlo da actividade ovárica ocorre normalmente a libertação de gonadotropinas em doses capazes de promover as manifestações de cio e a ovulação (Valentim *et al.*, 2006). Contudo, recomenda-se a administração de gonadotropinas exógenas a fim de sustentar a

atividade ovárica natural, contrariando possíveis efeitos negativos dos progestagénios e/ou da PGF2 α sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadas desta forma, elevar as taxas de fertilidade aparente e/ou de prolificidade (Valentim *et al.*, 2006).

4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial (IA) é uma das tecnologias de reprodução assistida (TRA) mais disseminada na reprodução de ruminantes, capaz conduzir à melhoria do potencial genético dos efectivos, uma vez que permite acelerar o melhoramento genético através do uso de reprodutores de alto mérito genético ou com características desejáveis, sem a necessidade de aquisição dos mesmos, uma vez que um único ejaculado permite inseminar várias fêmeas (Hafez e Hafez, 2004). Além disso, em combinação com sincronização hormonal de estro e ovulação, é possível a produção de crias e leite em épocas do ano que não são o período de reprodução natural, devido a sazonalidade reprodutiva apresentada por espécies como os caprinos e ovinos (Chemineau e Cognié, 1991; Baldassarre & Karatzas, 2004).

As técnicas de IA permitem aos produtores a possibilidade de um melhor ajuste entre a produção e as necessidades de mercado, possibilitando uma escolha mais precisa das épocas de cobrição e de parição, simplificando a criação de lotes de animais mais uniformes (destinados a venda) e/ou na mesma fase do ciclo produtivo, além de, permitir a programação mais precisa da utilização da mão-de-obra (Fernandes, 2008). A IA também possui papel importante em programas de conservação genética *in situ* ou *ex situ* de raças em vias de extinção, sendo fundamental, por facilitar o controlo do número e do tamanho do efectivo, permitindo ainda controlar os riscos de consanguinidade particularmente quando há trocas de material genético entre efectivos de pequena dimensão (Bettencourt, 1999 citado por Fernandes, 2008).

Mas a IA aplicada na reprodução de pequenos ruminantes enfrenta obstáculos à difusão desta técnica em caprinos e ovinos. A dificuldade relaciona-se com a impossibilidade de ultrapassar a estrutura tortuosa do canal cervical apresentada por estas duas espécies, que dificilmente permite a deposição do sémen no corpo ou nos cornos uterinos. A deposição das doses seminais pode ser feita a nível da vagina, do canal cervical e do útero, sendo o local de deposição do sémen, o qual denomina a técnica de IA utilizada: vaginal, intra-uterina e cervical. (Donovan *et al.*, 2001; Dayan *et al.*, 2010; Bezerra, 2010a; ANCRAS, 2017).

Dentre os vários países da União Europeia, a França é aquele em que a prática da IA entre pequenos ruminantes se encontra mais difundida, especialmente aplicada em ovinos (Bettencourt, 1999; Fernandes, 2008). Neste país, a IA é assegurada, todo o ano, fundamentalmente pelas associações de criadores. Em Portugal, a IA de ovinos e caprinos é quase que exclusivamente experimental e recentemente sendo disseminada através de projectos de parcerias entre associações de criadores e instituições de ensino (Fernandes, 2008; ANCRAS, 2017).

4.1. Técnicas e Métodos Utilizados

Como já referido anteriormente um dos maiores obstáculos à implementação da técnica de IA nos caprinos compreende a impossibilidade de ultrapassar as dobras do canal cervical, de forma a dificultar a deposição mais profunda do sémen no tracto reprodutivo. Assim, algumas técnicas de IA mais utilizadas em caprinos são denominadas de acordo com o local de deposição das doses seminais podendo ser feita a nível da vagina (IA vaginal), do útero (IA intra-uterina) e do canal cervical (IA cervical) , cada qual realizada de acordo com a necessidade, disponibilidade e viabilidade da técnica. (Dayan *et al.*, 2010; Bezerra, 2010a; ANCRAS, 2017).

A inseminação vaginal é frequentemente designada por “tiro no escuro” e consiste na deposição do sémen na vagina, o mais profundamente possível sem preocupação de o fazer próximo da entrada do canal cervical (Mylne *et al.*, 1997; Bettencourt, 1999). É normalmente realizada com sémen fresco diluído. Quando bem realizada pode resultar em taxas de fertilidade aparente de 60%, com sémen fresco diluído, e de até 40%, com sémen congelado (Buckrell *et al.*, 1991; Bettencourt, 1999 citados por Fernandes, 2008). Porém, para se alcançarem estas taxas há que utilizar um elevado número de espermatozóides, frequentemente superior a 500 milhões de células espermáticas viáveis/dose de inseminação (Buckrell *et al.*, 1991; Bettencourt, 1999; Donovan *et al.*, 2001; Bezerra, 2010a; ANCRAS, 2017). Nas ovelhas, as doses seminais para deposição vaginal devem conter entre 200-400 x 10⁶ espermatozóides (Dendena, 2017) ou 300 x 10⁶ espermatozóides (Aisen, 2004a). Nos caprinos, esta técnica está contra indicada pois resulta em baixas taxas de fertilidade (Simões *et al.*, 2008; citados por Valentim *et al.*, 2016c). O índice de fertilidade pós-inseminação vaginal em ovinos varia entre 40-65% (Ax *et al.*, 2004) ou de 88,9% (Dendena, 2017) já em caprinos Leão (2017) encontrou índice igual a 75% de fertilidade.

A inseminação intra-uterina é uma técnica de IA que consiste na deposição directa de sémen no corpo do útero (Eppleston *et al.*, 1994) ou nos cornos uterinos (Killeen e Caffery, 1982; Eppleston *et al.*, 1994), e pode ser realizada via laparoscopia (Keisler, 1991; Mylne *et al.*, 1997; Salamon e Maxwell, 2000). Por se tratar de uma intervenção cirúrgica, que requer material sofisticado e mão-de-obra especializada (custos mais elevados), possibilita a obtenção de taxas de fertilidade aparente bastante satisfatórias - até 75%, com sémen congelado (Buckrell *et al.*, 1991). Um inseminador experiente consegue inseminar, rapidamente, um elevado número de ovelhas (Hill *et al.*, 1998; citados por Bettencourt, 1999). O uso sistemático desta técnica pode resultar na formação de aderências uterinas e, conseqüentemente, numa rápida diminuição da sua aplicabilidade. Na inseminação intra-uterina as taxas de fertilidade aparente são mais elevadas quando o sémen é depositado nos dois cornos uterinos do que quando é em apenas um deles (Findlater, 1991; Bettencourt, 1999; Donovan *et al.*, 2001; Bezerra, 2010b; ANCRAS, 2017). Nos ovinos, inseminam-se $10-12 \times 10^6$ de espermatozóides móveis (Gordon, 1997) ou $10-50 \times 10^6$ espermatozóides móveis (Aisen, 2004a) e nos caprinos 120×10^6 espermatozóides móveis (Gordon, 1997). Mesmo com sémen criopreservado, as taxas de fertilidade são elevadas: 60% (Baril *et al.*, 1993) e 65-80% (Ax *et al.*, 2004). Esta técnica é mais utilizada em ovinos do que em caprinos devido à anatomia do canal cervical (Valentim *et al.*, 2016c). Nos ovinos, alguns autores conseguiram uma maior fertilidade quando inseminaram os dois cornos uterinos (metade da dose em cada um deles) (Perkins *et al.*, 1996; citados por Valentim *et al.*, 2016c).

Na IA cervical, o sémen é depositado dentro do canal cervical, o mais profundamente possível (Fernandes, 2008; Dendena, 2017). Na maioria das espécies, a inseminação pode ser feita ultrapassando o canal cervical com um cateter e depositando o sémen no colo (Valentim *et al.*, 2016c) ou no corpo do útero (Gordon, 1997; Morrell, 2011; Valentim *et al.*, 2016c). As excepções são os ovinos e os caprinos, em que a reduzido diâmetro (principalmente nas cabras) e/ou a conformação desalinhada das pregas cervicais (particularmente nas ovelhas) dificulta a passagem do pistolete de inseminação (Baril *et al.*, 1993; Morrell, 2011; Valentim *et al.*, 2016c), sendo que nestas espécies geralmente é possível depositar o sémen apenas para lá da 1-2ª prega cervical (Valentim *et al.*, 2016c). A IA cervical com sémen fresco é a técnica mais utilizada, uma vez que é fácil e rápida de aplicar e comporta custos relativamente baixos permite a obtenção de resultados reprodutivos satisfatórios (Bodin *et al.*, 1997; citados por

Bettencourt, 1999; Donovan *et al.*, 2001; Bezerra, 2010b; ANCRAS, 2017). Segundo Baril *et al.* (1993), cada dose seminal de sémen fresco deve conter no mínimo 60 x 10⁶ espermatozóides que se traduzem em taxas de fertilidade aceitáveis. Nos ovinos, as doses de sémen refrigerado devem conter 100-200 x 10⁶ espermatozóides (Valentim *et al.*, 2009) ou 150-200 x 10⁶ espermatozóides (Aisen, 2004a; Dendena, 2017), garantindo uma taxa de fertilidade de 60-70% (Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009) ou de 66,7-88,2% (Dendena, 2017). A fertilidade aumenta com o número de pregas ultrapassadas desde que não se force a entrada (Aisen, 2004a; Valentim *et al.*, 2016c). Este efeito não foi observado por Dendena (2017). A inflamação ou a lesão da mucosa cervical diminui ainda mais o diâmetro interior do canal cervical e causa um afluxo anormal de células de defesa ao seu lúmen (Aisen, 2004a; Candappa e Bartlewski, 2011; Ritar e Salamon, 1983; Fonseca *et al.*, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016c; Leão, 2018).

Nos ovinos e nos caprinos (particularmente, nos primeiros devido a disposição das dobras cervicais), as pregas do canal cervical constituem um obstáculo natural à passagem do *pistolet* de inseminação, porém, o canal cervical dos caprinos apresentam uma disposição das pregas mais simplificada ou menos alinhada, e as cabras tendem a apresentar menor número de dobras em seu canal cervical e estruturas menos irregulares, esse número pode ser variado de animal para animal, não podendo ser utilizado um número específico como regra (Dayan *et al.*, 2010). Resultados apresentados por autores como, Kaabi *et al.* (2006), Halbert *et al.* (1990) e Von Reinhold (1987), demonstram valores médios 5 a 6 pregas cervicais, em estudos com ovelhas, enquanto que Dayan *et al.* (2010), identificou um valor médio de 4,3 pregas cervicais em cabras da raça Angora, evidenciando as variações entre espécies, assim, podendo pressupor que a inseminação artificial cervical pode ser mais facilmente realizada nas cabras do que a nas ovelhas (Dayan *et al.*, 2010).

Qualquer que seja a técnica considerada, a determinação exacta do momento da ovulação é crucial para o sucesso da inseminação, já que o óvulo tem uma duração de vida fértil muito curta (12 a 24 horas) (Evans e Maxwell, 1987; citados por Bettencourt, 1999; Dendena, 2017). É importante que os espermatozóides alcancem a ampola imediatamente antes dos oócitos viáveis aí chegarem. Neste sentido, o aproveitamento de um cio natural, o método de sincronização/indução de cios empregue, a técnica de inseminação utilizada e o tipo de sémen aplicado (fresco ou conservado), afectam

significativamente a escolha do momento óptimo para a IA (Mylnes *et al.*, 1997; Bettencourt, 1999 citados por Fernandes, 2008; Dendena, 2017; Leão, 2018).

5. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE SÉMEN

5.1. Recolha e Avaliação

Estudos sobre técnicas adequadas para recolha, preservação e armazenamento de sémen são de grande relevância na Reprodução Animal, já que possibilitam maximizar o aproveitamento de animais de alto potencial genético, bem como, permitir a preservação por tempo indeterminado do património genético de animais que possam vir a deixar de existir (Carmo *et al.*, 2002; Bortot & Zappa, 2015). Na IA o sémen é, normalmente, transportado dos centros de recolha até às explorações onde vai ser usado. No caso de reprodutores de elevado valor genético, há que obter o maior número possível de doses seminais e conservá-las em boas condições pelo maior período de tempo possível (Pérez *et al.*, 2010 citado por Cortez, 2012).

Nos pequenos ruminantes, o volume dos ejaculados é reduzido (ml), mas a concentração é elevada (Baril *et al.*, 1993; Morrell, 2011). Na maioria dos animais domesticados o sémen é recolhido através de uma vagina artificial deixando o macho montar uma fêmea (normalmente) em cio induzido ou um manequim (Baril *et al.*, 1993; Gordon, 1997; Aisen e Venturino, 2004; Granados *et al.*, 2006; Morrell, 2011; Leão, 2018). Nos caprinos o sémen pode ser recolhido com o auxílio da vagina artificial ou de um electroejaculador. O método da vagina artificial é o mais popular uma vez que permite a criação de condições de temperatura, de pressão e de humidade similares aos naturais, não causa grandes níveis de *stress*, é rápido, simples e garante a obtenção de ejaculados de elevada qualidade. (Castelo *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010 citados por Cortez, 2012). Porém, implica a existência de machos treinados e em excelentes condições físicas (Gordon, 1997; Leboeuf *et al.*, 2000; Aisen e Venturino, 2004; Granados *et al.*, 2006). Infelizmente, nem todos os machos são treináveis, os bodes são animais gregários que não gostam de estar sozinhos na presença do homem (Baril *et al.*, 1993)

A vagina artificial consiste numa bainha de borracha colocada dentro de um tubo pouco flexível sobre o qual se dobram as pontas da bainha interior e que são presas com elásticos (Aisen e Venturino, 2004; Morrell, 2011; Leão, 2018). Desta forma, é criado um espaço que pode ser preenchido com água quente (Aisen e Venturino, 2004; Morrell, 2011) ou ser aquecida numa estufa (40-42°C) (Aisen e Venturino, 2004) ou

(42-45°C) (Baril *et al.*, 1993; Dendena, 2017). Se um macho salta na vagina artificial e não ejacula ou a temperatura ou a pressão não são as correctas (Aisen e Venturino, 2004). O tubo exterior da vagina artificial é dotado de uma válvula dupla. Quando se retiram as duas é possível encher o espaço entre a bainha interior e o tubo exterior com água. A remoção apenas da segunda válvula permite, através de insuflação, aumentar a pressão no interior da vagina artificial (Morrell, 2011; Leão, 2018), ajustando-a á preferência de cada macho em concreto. Numa das extremidades da vagina artificial coloca-se um cone de borracha e na outra das suas extremidades é inserido um tubo colector graduado (Morrell, 2011, Leão, 2018). O tubo colector deve estar envolto em material termo isolante. Outra protecção termo isolante deve recobrir desde o tubo colector recoberto até à própria vagina artificial. Antes de ser usada, a vagina deve estar lavada e desinfectada (por exemplo, com quaternário de amónio). Por outro lado, a entrada livre da vagina deve ser ligeiramente lubrificada (Gordon, 1997). Uma lubrificação muito intensa, particularmente com uma substância mais aquosa ou oleosa, leva-a a escorrer para dentro do tubo colector e a misturar-se com o sémen recolhido.

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

Sempre que não for possível recolher sémen por vagina artificial pode recorrer-se à electroejaculação (Gordon, 1997; Leboeuf *et al.*, 2000; Morello e Chemineau, 2004; Granados *et al.*, 2006; Morrell, 2011; Leão, 2018). Nos bodes a electroejaculação é pouco recomendada devido ao *stress* em que o animal é sujeito. Esta baseia-se na estimulação eléctrica, via transrectal, dos centros nervosos que controlam a erecção e especificamente a ejaculação. Este método é utilizado em bodes não treinados, indisciplinados, com libido diminuída ou com qualquer outro problema que os impeça, temporária ou permanentemente de realizar a monta natural, mas que sejam férteis e possuam um elevado interesse genético (Castelo *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010 citados por Cortez, 2012).

É uma técnica que depende de um equipamento eléctrico que produz descargas de 4-15 volts e de uma sonda com 2-3 eléctrodos e que permite estimular os centros nervosos que controlam a erecção e a ejaculação do sémen, localizados logo abaixo do recto (introdução rectal da sonda). A electroejaculação tem várias desvantagens: no

mínimo, é desconfortável para os animais (Morello e Chemineau, 2004; Granados *et al.*, 2006; Leão, 2018), pode determinar a libertação simultânea de espermatozóides e de urina (amostra seminal estragada) (Morello e Chemineau, 2004; Ferra e Sereno, 2006; citados por Valentim *et al.*, 2016c) e alterar a proporção natural de secreções libertadas pelas glândulas anexas ou acessórias com efeitos deletérios sobre a sobrevivência dos espermatozóides (Morello e Chemineau, 2004; Morrell, 2011). O ejaculado pode ser mais volumoso e menos concentrado (Leboeuf *et al.*, 2000). Não há alteração da motilidade espermática (Akusu *et al.*, 1984; citados por Leboeuf *et al.*, 2000).

Recolhida a amostra de sémen deve-se proceder rapidamente à avaliação dos parâmetros seminais mais importantes: volume, cor, cheiro, viscosidade, motilidade massal e individual, percentagem de espermatozóides vivos, percentagem de espermatozóides normais e concentração espermática. Com a avaliação prévia é possível a observação da qualidade do sémen de macho, podendo determinar seu potencial como doador (Donovan *et al.*, 2001; Mascarenhas & Simões, 2005).

Importante que estas análises decorram de forma rápida para evitar o aumento de metabólitos prejudiciais aos espermatozoides, principalmente nos bodes, que apresentam abundante secreção pelas glândulas bulbo-uretrais de uma enzima – a Fosfolipase A (também denominada de enzima da coagulação da gema de ovo) – que catalisa a hidrólise das lecitinas presentes na gema de ovo em ácidos gordos e em lisolecitina (Baril *et al.*, 1993; Leboeuf *et al.*, 2000). Em grandes quantidades, o último composto, é tóxico para a sobrevivência *in vitro* dos espermatozóides (Baril *et al.*, 1993; Morrell, 2011). A hidrólise das lecitinas depende de certas condições: presença de cálcio, pH, temperatura, concentração do plasma seminal, estação do ano e raça (Baril *et al.*, 1993). Existem, igualmente, importantes diferenças entre bodes quanto à actividade desta enzima (Baril *et al.*, 1993), por isso, é fundamental uma análise, processamento e utilização do sémen no menor período possível ou ainda a utilização de diluidores seminais.

5.2. Sémen Fresco

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

O sémen fresco pode ser processado puro ou diluído (30-37°C) (Aisen, 2004b) e deve utilizado até 2 horas pós-recolha. Devendo ser mantido à temperatura de 30-37°C e

podendo ser puro ou diluído em meio adequado (Baldassarre, & Karatzas, 2004; Bezerra, 2010b). Porém deve ser utilizado no menor tempo possível pós-colheita, devido ao curto período de vida dos espermatozóides assim conservados. Nestas condições, a motilidade e a viabilidade espermáticas reduzem-se rapidamente (Baril *et al.*, 1993; Pellicer-Rubio e Combarrous, 1998; citados por Morrell, 2011; O'Hara *et al.*, 2010). Ocorre a acumulação de catabolitos provenientes da actividade metabólica dos espermatozóides e ação da Fosfolipase A, que acabam por se tornar tóxicos para os mesmos (Rojero *et al.*, 2009).

A inseminação artificial com sémen fresco, quando bem executada, alcança eficiência comparável ao uso da monta natural (Sohnrey & Holtz, 2005), com fertilidade superior ao sémen refrigerado e congelado (Baldassarre & Karatzas, 2004). As condições de boa fertilidade do sémen fresco podem se manter até cinco horas sem comprometer drasticamente as taxas de fertilidade (Salvador *et al.*, 2006). Na inseminação com sémen fresco de caprinos por via cervical recomenda-se a utilização doses seminais de 80-100 x 10⁶ espermatozóides num volume de 0,02-0,1 ml (Baril *et al.*, 1993).

Magalhães *et al.* (2013) constataram que a inseminação com sémen fresco juntamente com um tratamento curto de progestagénios foi possível elevar as médias de fertilidade, alcançando taxas de 80% a 93% com a utilização de inseminação transcervical.

5.3. Sémen Refrigerado

A refrigeração do sémen é um método que permite que as doses seminais possam ser transportadas para inseminação em explorações algo afastadas espacialmente (Gordon, 1997; Morrell, 2011). Tradicionalmente nos pequenos ruminantes a IA é feita com sémen fresco ou refrigerado, com taxas de fertilidade aceitáveis (Morrell, 2011; Valentim *et al.*, 2016c; Leão, 2018).

Nesta técnica, o sémen é primeiramente diluído com diluentes ricos em açúcares, lipídeos, antibióticos, substâncias tamponantes e sais, e só então o sémen é submetido a diminuição de temperatura podendo ser utilizado de 5 a 15°C. A capacidade fertilizadora dos espermatozóides é prolongada através da redução reversível da sua motilidade e do seu metabolismo. Nas primeiras 48 horas de refrigeração não ocorre uma diminuição significativa da motilidade. O sémen refrigerado pode ser usado até 48 horas, com relatos de resultados satisfatórios em períodos até 96 horas, sem que se

produza uma redução significativa da taxa de fertilidade aparente. A refrigeração do sémen constitui um método eficaz de armazenamento a curto prazo, ainda que apresente alguns efeitos deletérios sobre os espermatozóides: diminuição da taxa de viabilidade, da integridade estrutural, da motilidade e da taxa de fertilidade aparente (Carmo *et al.*, 2002; Baldassarre & Karatzas, 2004; Siqueira *et al.*, 2009 Bezerra, 2010b).

O sémen é armazenado na forma líquida com a 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; Decuadro-hansen, 2004; Câmara e Guerra, 2011).

A diminuição da temperatura 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 redução deve ser progressiva pode levar cerca de 1 a 1.30 horas para atingir os 15°C e 2 a 3 horas, para alcançar os 5°C (Maxwell e Watson, 1996; Valentim *et al.*, 2009; Leão, 2018).

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; 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; Naim *et al.*, 2009). Dendena (2017), constatou melhores taxas de fertilidade obtidas com sémen refrigerado (90,0%) enquanto que com sémen fresco obteve taxas inferiores (79,4%).

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

Nos ovinos, cada dose seminal refrigerada (0,25 ml) deve conter entre 100-400 x 10⁶ espermatozóides Aisen (2004b), 200 x 10⁶ (Dendena, 2017) ou 400 x 10⁶ de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). Nos caprinos, cada dose seminal deve ter 150 x 10⁶ espermatozóides (Baril *et al.*, 1993).

5.4. Sémen Congelado

A técnica de criopreservação do sémen favorece a utilização do mesmo em locais distantes daquele onde foi colhido e processado, além de propiciar um longo tempo de armazenamento (Baldassarre & Karatzas, 2004), porém reduz a viabilidade e fertilidade do espermatozoide por causar danos estruturais, bioquímicos e funcionais (Leboeuf *et al.*, 2000; Salamon e Maxwell, 2000; Dorado *et al.*, 2009). O efeito negativo da congelação sobre os espermatozóides é distinto em diferentes reprodutores (Apu *et al.*, 2012), sendo uma característica intrínseca do animal, podendo suportar melhor ou não, o processo de congelamento (Sánchez-Partida *et al.*, 1999; Neto & Martins, 2013).

Nas explorações animais os custos da criopreservação e a previsão da taxa de sucesso após a IA devem ser avaliadas antes de se decidir pela utilização de sémen fresco, refrigerado ou congelado (Morrell, 2011). Os resultados conseguidos via IA com sémen congelado são muito díspares devido a múltiplos factores que afectam a integridade das membranas dos espermatozóides (Gordon, 1997, Leboeuf *et al.*, 2000; Aisen, 2004b). Os mais importantes estão relacionados com os tipos de diluidores e os métodos de congelação/descongelação (Aisen, 2004b). Os últimos afectam principalmente o sistema de membranas celulares causando alterações ultra-estruturais, bioquímicas e funcionais numa percentagem significativa de células espermáticas (Leboeuf *et al.*, 2000 e Aisen, 2004b; Leão, 2018).

O sémen de caprino apresenta particularidades que o diferenciam do de outras espécies. A mais importante é, provavelmente, a síntese e a secreção de várias enzimas a partir das glândulas bulbo-uretrais que integram o plasma seminal. Estas enzimas apresentam actividade fosfolipase e hidrolisam os fosfolipídeos como a lecitina, em lisolecitinas e em ácidos gordos livres, produtos tóxicos para os espermatozóides, pois com a formação de ácidos gordos livres (ácido oleico), conduziriam a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e plasmática, o que elevaria a morte celular (Amann e Pickett, 1987 citado por Bittencourt, 2009). Antes da congelação então alguns autores separam por centrifugação os espermatozóides dos bodes (e também os dos equinos, dos suínos e dos seres humanos) do plasma seminal (Baril *et al.*, 1993;

Morrell, 2011). Os espermatozóides são então diluídos em diluidores seminais, armazenados em palhinhas e congelados em vapores de azoto líquido, antes de serem mergulhados em azoto líquido (-196°C) (Morrell, 2011).

A taxa de sucesso da criopreservação varia muito em função da raça, apesar da intensa investigação relativa aos constituintes dos criodiluidores e das taxas de congelação e de descongelação (Aisen, 2004b; Morrell, 2011; Leão, 2018). Em França, a taxa de fertilidade das cabras inseminadas artificialmente profundamente com sémen congelado na estação de anestro após indução hormonal da actividade ovárica ronda os 65% (Leboeuf *et al.*, 2008; citados por Morrell, 2011). Muitos outros autores obtêm taxas de fertilidade muito mais baixas 20-30% (Morrell, 2011) ou 16,7% (Cortez, 2012).

Nos ovinos, a dose seminal congelada para IA cervical (0,25 ml) deve conter 450 x 10⁶ de espermatozóides (Baril *et al.*, 1993). Nos caprinos, esta dose (0,5 ml) deve conter 200 x 10⁶ espermatozóides (Baril *et al.*, 1993).

5.5. Diluidores

A diluição do sémen atua beneficemente sobre os espermatozóides (Araújo *et al.*, 2012), além de resultar em maior número de doses de um mesmo reprodutor, permitindo um maior aproveitamento e disseminação de sua genética (Mian *et al.*, 1990) e de favorecer a condição sanitária do sémen (Souza *et al.*, 2006). Com a diluição é possível a obtenção de volumes desejados e ideais de diluidor e número de espermatozóides, sendo realizada com base na concentração espermática ou adicionando quantidade específica de diluente (Purdy, 2006).

Um bom diluente deve prover substâncias que mantenham o ambiente adequado para as células espermáticas (Purdy, 2006), podendo ser capaz de melhorar a motilidade e o poder fecundante dos espermatozóides (Araújo *et al.*, 2012). Existem diversos diluidores, para diferentes espécies de animais, com múltiplos constituintes, desde os mais elaborados aos mais simples (Salamon e Maxwell, 2000; Neto & Martins, 2013).

Existem vários tipos de diluidores de sémen: naturais (leite de vaca desnatado, gema de ovo, água de coco ou gel de aloé vera) (Rodriguez *et al.*, 1988 e Palacios, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016c) ou sintéticos (Valentim *et al.*, 2016c). De um modo geral, estes diluidores devem aumentar o volume do sémen diluído, estabilizam o pH (efeito tampão), manter a osmolaridade adequada, proporcionar uma fonte de energia para os espermatozóides e protegê-lo de possíveis infecções bacterianas ou

fúngicas, para além de os proteger do choque térmico provocado pelas baixas temperaturas (Baril *et al.*, 1993, Gordon, 1997, Aisen, 2004b e Valentim *et al.*, 2016c; Leão, 2018). Este último pode ser evitado através de uma diminuição regular da temperatura (Baril *et al.*, 1993).

Nos ovinos e caprinos, 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). Os diluidores por sua vez devem fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático (fonte de energia e nutrientes), ter capacidade tampão (regulação do pH) e osmolaridade adequadas (sais) e devem interagir com o sémen proporcionando proteção às diferentes estruturas do espermatozóide durante o arrefecimento ou a congelação/descongelação (crioprotetores) e inibir o crescimento bacteriano e fúngico (antibióticos e antifúngicos) (Araújo *et al.*, 2016).

Para que as células espermáticas possam sobreviver, quando expostas a temperaturas não fisiológicas (muito baixas), a presença de compostos crioprotetores no diluidor é essencial. Estes agentes podem ser classificados como não penetrantes e penetrantes (Araújo *et al.*, 2016).

O choque térmico traduz-se no aumento do número de espermatozóides mortos, formas anormais, alteração da distribuição dos lípidos membranares e aumento do cálcio intracelular, com possível fusão de membranas (Aisen, 2004a). Há que afirmar que o choque térmico altera súbita e irreversivelmente a membrana plasmática (Aisen, 2004a). No caso dos espermatozóides dos ovinos existe uma distribuição desigual das proteínas do citoesqueleto associadas à membrana, sendo mais sensíveis à refrigeração (Aisen, 2004a). Proteínas como a actina comprometem a estabilidade das membranas ou a sua redistribuição antes do processo de fecundação (Aisen, 2004a).

As espécies cujos espermatozóides possuem membranas com uma relação entre colesterol/fosfolípidos de 0,88 (coelho) e 0,99 (homem) são mais resistentes do que aqueles com relações de 0,45 (touro) e 0,3 (carneiro e bode) (Aisen, 2004b). Uma proporção de colesterol adequada fluidifica a membrana e não permite a separação lateral da cadeia lipídica, pelo que as proteínas intrínsecas não são deslocadas (Aisen, 2004b). A relação entre ácidos gordos insaturados/saturados e a proporção de colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides são algumas das características específicas que dificulta a refrigeração e a congelação (Gordon, 1997 e Aisen, 2004b). O sémen de caprino limita a utilização exagerada de diluidores ricos em fosfolípidos,

como aqueles à base de leite ou mesmo com altas proporções de gema de ovo. Tal facto deve-se a presença da fosfolipase A no plasma seminal desta espécie produzidos principalmente na contra estação sexual, que hidrolisa fosfolípidios presentes nos diluidores, formando substâncias tóxicas aos espermatozóides (Neves *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2017).

Até aos 5°C, há autores que usam como crioprotector apenas a gema de ovo (Ferra e Sereno, 2006 e Palacios, 2010; citados por Valentim *et al.*, 2016c; Leão, 2018). Alguns diluidores seminais comerciais não usam glicerol – INRA96® [água ultrapura, caseínas (fracção purificada das proteínas micelares do leite), tampões, sais, açúcares, antibióticos e antifúngicos – penicilina sódica, sulfato de gentamicina e anfotericina B) (IMV Technologies, L'Aigle, França), enquanto outros sim – diluidor Tris-frutose (3,63 g Tris, 0,50 g de frutose, 1,99 g ácido cítrico, 20 ml de gema de ovo, 7% de glicerol e 100 ml de água bidestilada (Salamon e Maxwell 2000; citados por Turri *et al.*, 2013), Andromed® (água bidestilada, frutose, glicerol, ácido cítrico, tampões, fosfolípidos, antibióticos: espectinomomicina e lincomomicina, tilosina e gentamicina) (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) e Ovixcell® (água ultrapura, sais, açúcares, electrólitos, glicerol, antibióticos, sem proteína animal) (IMV Technologies, L'Aigle, França). A adição do diluidor seminal ao ejaculado deve ser feita à temperatura a que este estiver no momento da diluição (Valentim *et al.*, 2016b; Leão, 2018).

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

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

6. SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA

6.1. Considerações Sobre a Suplementação Vitamínica

As vitaminas são compostos orgânicos indispensáveis para o bom funcionamento do organismo, envolvidas em processos metabólicos e fisiológicos. Desempenham um papel importante no crescimento e na eficiência produtiva e reprodutiva dos animais (El-Shahat & Monem, 2011). Dentre as vitaminas, estas podem ser divididas em relação as suas formas de absorção e solubilização: substâncias que são solúveis em gordura (lipossolúveis) - isto é, as vitaminas A, D, E e K - e aquelas que são solúveis em água (hidrossolúveis) – vitaminas do complexo B e C (Hart, 2008).

As vitaminas hidrossolúveis que englobam, as vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, B12), ácido pantotênico (B5), biotina (H) e ácido ascórbico (C), são facilmente sintetizadas pelas bactérias no rúmen dos caprinos, que podem sintetizar quantidades adequadas destas vitaminas, o que torna os problemas por deficiência muito raros e apenas em situações extremas, com exceção da vitamina B12 que depende do micromineral cobalto para ser sintetizada e se tornar funcional (Júnior *et al.*, 2011). As vitaminas hidrossolúveis, são precursoras de coenzimas para as enzimas do metabolismo intermediário, principalmente no metabolismo energético e hematopoiético (CHAMPE *et al.*, 2006 citado por Júnior *et al.*, 2011).

No caso das vitaminas lipossolúveis (A, E, D e K) o fornecimento através de suplementação se faz necessária aos caprinos, pois o organismo não é capaz de sintetizar naturalmente ou pelo menos não em quantidades necessárias. Uma das principais características dessas vitaminas é sua capacidade de armazenamento no organismo não havendo necessidade de serem ingeridas diariamente (Júnior *et al.*, 2011).

Todas as vitaminas são exigidas fisiologicamente pelos animais e desempenham papel preponderante no metabolismo. A ausência das vitaminas na dieta, ou absorção e utilização imprópria causam deficiências específicas, com impossibilidade para sintetizar quantidades suficientes às necessidades fisiológicas. A diminuição sistemática de determinada vitamina pode desencadear sintomatologia específica de doença carencial, característica do estado de avitaminose (ausência de vitamina), estes casos estão relacionados principalmente as vitaminas lipossolúveis (Bouwstra *et al.*, 2010; Júnior *et al.*, 2011).

Dentre as vitaminas lipossolúveis a vitamina A, ou retinol, é essencial para uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a visão, a função imune, a reprodução e o desenvolvimento embrionário, incluindo o crescimento e a diferenciação celular, e pode ser sintetizada através de carotenoides, composto abundante nas células vegetais (Stephensen, 2001; Blomhoff e Blomhoff, 2006; Hart, 2008; Mora *et al.*, 2008; Eldaim *et al.*, 2015). A vitamina E por sua vez possui importante função antioxidante em conjunto com o selênio e os requisitos para um podem ser parcialmente satisfeitos pelo outro. Assim, a vitamina E é importante em áreas com níveis marginais ou deficientes de selênio. Uma deficiência de vitamina E pode resultar em depressão do sistema imunológico e causar falha reprodutiva. As pastagens e o feno seco pelo sol apresentam altos níveis de vitamina E e podem ser uma opção de suplementação dietética de vitamina E (Hart, 2008). A vitamina K é essencial ao organismo e tem como principal função, atuar na coagulação sanguínea. Contudo, esta pode ser produzida por bactérias no trato próprio digestivo e absorvidas, com isso, as cabras ocasionalmente precisam ser suplementadas com vitamina K. (Hart, 2008). A vitamina D é sintetizada pela pele dos animais desde que sejam expostos aos raios solares (ultravioleta) ou através da dieta ingerida. Há várias formas ativas de vitamina D na natureza, as mais eficazes em ruminantes são a D2 e D3. A D2 é sintetizada nos vegetais, sobretudo quando cortados e expostos ao sol. Já a forma D3 é sintetizada nos organismos dos próprios animais, desde que recebam luz solar. A função primordial desta vitamina é aumentar a absorção intestinal, a mobilização, a retenção e deposição óssea do Ca e P (Júnior *et al.*, 2011).

É de fundamental importância observar as necessidades vitamínicas mínimas dos animais, como forma de distinguir as necessidades fisiológicas e dietéticas (Bouwstra *et al.*, 2010; Júnior *et al.*, 2011; Oliveira *et al.* 2010, citado por Nascimento *et al.*, 2015). No entanto, não só a quantidade de vitamina deve ser considerada, mas também sua função biológica. Neste sentido não cabe o equivocado pressuposto de “quanto mais, melhor”. Assim como todos os nutrientes, o equilíbrio vitamínico é de extrema importância, uma vez que as vitaminas diferenciam entre si quanto a sua estrutura química, bem como a sua forma, função e ação biológica (Bouwstra *et al.*, 2010; Júnior *et al.*, 2011).

6.2. Vitaminas lipossolúveis e a Reprodução

Os caprinos são muito sensíveis ao *stress* nutricional no período reprodutivo devido as mobilizações e alterações fisiológicas nesta fase, levando a um desafio

metabólico que requer a mobilização de nutrientes (Osuagwuh e Akpokdje, 1986; Osuagwuh, 1990). A gestação e a formação fetal são processos fisiológicos acompanhados por muitas modificações bioquímicas (Karjnicakova *et al.*, 2003; Kashinakunti *et al.*, 2010). Os tecidos maternos fornecem energia necessária para o processo reprodutivo o que pode afetar os valores de nutrientes na corrente sanguínea. O estado nutricional juntamente com crescimento fetal durante a gestação também tem efeito direto sobre os níveis de nutrientes circulantes (Swanson *et al.*, 2004; Yokus *et al.*, 2006). De tal modo, um suprimento inadequado de nutrientes durante o período reprodutivo e gestação pode resultar em falhas reprodutivas (Osuagwuh, 1992; Sibanda *et al.*, 1997).

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são radicais livres, como o radical hidroxilo (-OH) e o anião superóxido (-O₂) ou moléculas como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que se acumulam no organismo e acabam por prejudicar o bom funcionamento celular. Os efeitos da peroxidação lipídica (LPO) está ligado diretamente à ação das ROS sobre os fosfolípidos e ácidos gordos, afetando as membranas dos tecidos (Agarwal *et al.*, 2005). A produção de ROS é um evento fisiológico normal e há um equilíbrio delicado entre ROS e antioxidantes no corpo. Certos níveis de ROS podem ter um papel regulador para múltiplos processos reprodutivos tais como maturação de oócitos, produção de esteróides e fertilização. No entanto, o *stress* oxidativo ocorre quando o equilíbrio é interrompido em relação a uma superabundância de ROS. Já a LPO é uma das expressões mais importantes de *stress* oxidativo induzidas por ROS, que acarreta na oxidação de lípidios devido o acúmulo de radicais livres. O dano oxidativo tem sido implicado na causa de muitas doenças. Portanto, o desempenho de vitaminas, principalmente as lipossolúveis e minerais como agentes antioxidantes jogam um papel importante na fisiopatologia da infertilidade e da fertilidade assistida (Agarwal e Allamaneni, 2004).

Vitaminas e minerais desempenham um papel vital no crescimento e na saúde reprodutiva dos animais. A vitamina E, é conhecida como o antioxidante que rompe a corrente, é um dos principais componentes do sistema antioxidante e é particularmente importante na proteção de células contra o dano oxidativo por acúmulo de ROS (Chow, 1991). Além disso, a vitamina E também é importante para a qualidade dos oócitos e a maturação (Sönmes *et al.*, 2009). A vitamina E é considerada a principal constituinte antioxidante do sêmen e que protege contra os efeitos da (ROS) e (LPO) (Youself *et al.*, 2003). No sêmen de carneiros, adição de antioxidantes como a vitamina C e E para a

preservação do sémen melhora a longevidade média e a qualidade dos espermatozóides submetidos ao arrefecimento (Azawai e Hussein, 2013).

A vitamina D tem sido associada à fertilidade e reprodução em vários estágios da função reprodutiva masculina e feminina. Estudos demonstraram ligação específica da forma ativa de vitamina D, 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25 (OH) 2D3), em vários tecidos reprodutivos incluindo o útero (Walters *et al.*, 1983) e testículos (Walters *et al.*, 1983; Merk *et al.*, 1983), com expressão de receptor uterino, sendo estimulado por estrogênios (Walters, 1981). O papel preciso de 1,25 (OH) 2D3 sintetizado localmente no tecido reprodutivo, ainda não foi totalmente definido, mas pode envolver efeitos sobre desenvolvimento das modificações úterinas e sobre os folículos. Em outros modelos de desregulações funcionais, em deficiência de vitamina D, tais como estudo em ratos fêmeas com deficiência de vitamina D, observou-se que fertilidade é reduzida em 75% e os tamanhos dos folículos foram diminuídos em 30% (Halloran e DeLuca, 1980). A vitamina D é considerada a mais tóxica das vitaminas, pois como todas as vitaminas lipossolúveis, essas podem ser armazenadas no corpo sendo lentamente metabolizada. Doses elevadas desta vitamina podem causar perda de apetite, sede e prostração. Um aumento da absorção de cálcio e reabsorção óssea resulta em hipercalcemia, que pode levar à deposição de cálcio em vários órgãos dos animais, nos rins e artérias (Stanton, 1998; Roche, 2000 citados por Júnior *et al.*, 2011).

A vitamina A, ou retinol, é essencial para uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a visão, a função imune, a reprodução e o desenvolvimento embrionário, incluindo o crescimento e a diferenciação celular (Stephensen, 2001; Blomhoff e Blomhoff, 2006; Mora *et al.*, 2008). A vitamina A está envolvida durante diferenciação de espermatogonia e regulação de adesão espermática (Cheah & Yang, 2011). Uma avançada deficiência de vitamina A causa degeneração dos túbulos seminíferos e atrofia testicular. Vitamina A em conjunto com a deficiência de iodo prejudica a libido do carneiro (Eldaim *et al.*, 2015). Quando deficiente a vitamina A implica em problemas reprodutivos, tais como fracos sinais de cio, atraso na ovulação, baixa taxa de fecundação e elevado número de abortos e reabsorção embrionária, aumento da sensibilidade às infecções das mucosas, atrofia dos ovários e baixa taxa de ovulação, além de problemas de ciclo estral e retenção de placenta (NRC, 1996 citado por Júnior *et al.*, 2011).

Sobre os benefícios trazidos pela suplementação vitamínica em pequenos ruminantes, Bouwstra *et al.* (2010) destacam alguns aspectos da utilização de vitaminas

sem avaliação prévia dos animais e suas reais necessidades, devido a utilização indiscriminada de suplementação vitamínica, sob o conceito de que a mesma não afeta diretamente o estado fisiológico e desempenho dos animais de forma negativa, sem considerar o real *status* nutricional e vitamínico dos animais. Por se tratar de elementos com diferentes estruturas químicas, as vitaminas em situações e condições diversas podem agir de formas inesperadas (Júnior *et al.*, 2011; Oliveira *et al.* 2010, citado por Nascimento *et al.*, 2015).

A busca de um conhecimento mais aprofundado de seu modo de ação e necessidades de aplicação de vitaminas são extremamente importantes, e a suplementação feita de forma consciente, pode trazer a redução de custos na produção e ainda evitar efeitos negativos sobre o desempenho do animal.

III. TRABALHO EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi desenvolvido nas dependências do Instituto Politécnico de Bragança, juntamente ao Laboratório de Reprodução, sob orientação do Professor Doutor Ramiro Corujeira Valentim.

O período do trabalho experimental decorreu dentre os meses de Abril de 2017 a Julho de 2017.

1. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança, nas Quintas de Santa Apolónia (latitude 41° 49' N, longitude 6° 40' W e altitude 720 metros) e do Pinheiro Manso (Latitude 41° 48' 33''N, Longitude 6° 44' 3''W e Altitude 670 metros), pertencente à ESA-IPB, entre 15 de Abril e 22 de Junho 2017.

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

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

1.1. Animais

Neste trabalho foram utilizadas cabras das raças Serrana (Figura 5), ecótipo Transmontano (multíparas: 55), e Preta de Montesinho (Figura 6), (nulíparas: 4 e múltiparas: 6) pertencentes ao rebanho pedagógico-experimental da ESA-IPB. As cabras Serranas tinham 2-9 anos e as Pretas de Montesinho 1-4 anos de idade. A última parição das cabras primíparas e múltiparas tinha ocorrido cerca de 6 meses antes (Outubro).

Os bodes da raça Serrana (n = 2) tinham 3 e 5 anos e o (n = 1) da raça Preta de Montesinho 4 anos de idade.



FIGURA 5 - Exemplares de caprinos da raça Serraana, écotipo Transmontano. (a) Cabra. (b) Bode. Fonte: ANCRAS.

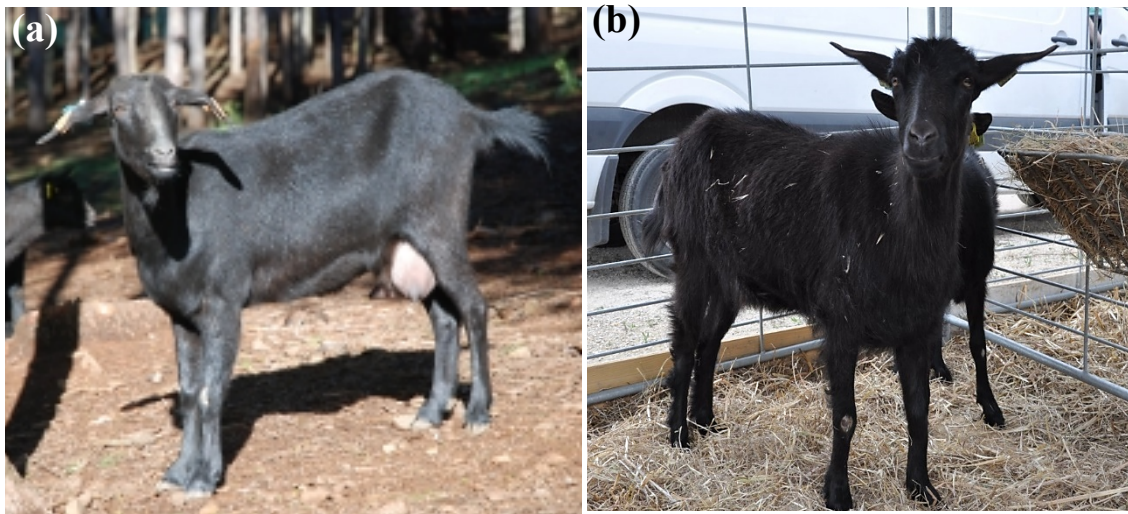


FIGURA 6 - Exemplares de caprinos da raça Preta de Montesinho. (a) Cabra. (b) Bode. Fonte: ANCRAS.

1.2. Actividade ovárica

A actividade ovárica das cabras foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de progesterona (P_4). A recolha das amostras de sangue (Figuras 7 e 8) foi feita com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através da punção da veia jugular. Após centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, à temperatura ambiente, procedeu-se à separação do sobrenadante – plasma sanguíneo. O teste de radioimunoensaio (RIA) foi realizado com recurso a um leitor de cintilações DPC® Gamma C12 (Bertholt Technologies, Bad Wildbad, Alemanha), segundo a técnica indicada pelo fabricante dos kits (*DiaSource® ImmunoAssays*, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 6,5 e 13,1%.



FIGURA 7- Colheita de sangue das Cabras Serrasas écotipo Transmontano.



FIGURA 8 – Colheita de sangue das Cabras Pretas de Montêsinho.

1.2.1. PRÉ-TRATAMENTOS

Nas primeiras duas semanas de ensaio (15 e 26 de Abril), com o objectivo de determinar o estado fisiológico inicial das cabras, pela manhã, com 3-4 dias de intervalo, procedeu-se à recolha de amostras de sangue por punção da veia jugular para posterior determinação dos níveis plasmáticos de P_4 .

Considerou-se que as cabras estavam em anestro sazonal quando na totalidade das amostras recolhidas, os níveis plasmáticos de P_4 foram inferiores a 0,5 ng/ml (Thimonier *et al.*, 2000 e Leão, 2017).

1.2.2. PÓS-TRATAMENTOS

Com o intuito de identificar a formação do primeiro corpo lúteo (CL) pós-tratamentos progestagénicos curto (FGA ou MAP) + eCG ou hCG, nos cinco dias seguintes à administração de eCG ou hCG, procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para posterior determinação dos níveis plasmáticos de P₄.

Considerou-se que o primeiro CL se havia formado quando os níveis plasmáticos de P₄ ultrapassaram, pela primeira vez, os 0,5 ng/ml (Thimonier *et al.*, 2000; Leão, 2017).

1.3. Tratamentos Aplicados

No dia 11 de Abril, os bodes Serranas e os Pretos de Montesinho receberam uma dose (2 ml/10 kg peso vivo) de um suplemento injectável de selénio+vitamina E (Selevit Complex[®], Syva, Espanha). No dia 18 de Abril, as cabras de ambas as raças foram divididas em dois grupos: metade formou o grupo Controlo e a outra metade recebeu uma primeira dose (4 ml/cabra) de um complexo vitamínico (Duphafrol Multi[®], Zoetis, Espanha) – grupo Suplementado, que voltaram a receber uma segunda dose (4ml/cabra) no momento da inseminação artificial.

No dia 2 de Maio, as cabras Serranas dos grupos Controlo e Suplementado foram divididas em dois subgrupos: metade recebeu uma esponja vaginal impregnada com 20 mg de FGA (Acetato de Fluorogestona; Chrono-Gest[®], Intervet, Portugal) e a outra metade uma esponja vaginal com 60 mg de MAP (Acetato de Medroxiprogesterona; Sincro-Gest[®], Laboratorios Ovejero, Espanha) (Quadro I). As cabras Pretas de Montesinho foram tratadas com esponjas vaginais impregnadas com 20 mg de FGA (Quadro II). Simultaneamente, todas as cabras (Serranas e Pretas de Montesinho) foram injectadas intramuscularmente (i.m.) com 100 µg de cloprostenol (Estrumate[®], MSD Animal Health, Portugal) – análogo sintético de Prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}).

O tratamento progestagénico teve a duração de 6 dias. Quando da remoção das esponjas vaginais (8 de Maio). As cabras Serranas do grupo Controlo e Suplementado, foram divididas em subgrupos de acordo com a gonadotropina utilizada: o sub-grupo FGA+eCG e as cabras Pretas de Montesinho foram injectadas i.m. com 300 UI de eCG/cabra (Intergonan[®], Intervet, Portugal), enquanto as cabras Serranas do Grupo Suplementado e Controlo, do sub-grupo MAP+hCG foram tratadas i.m. com 300 UI de hCG/cabra (Chorulon[®], MSD, Portugal).

QUADRO I – Divisão das cabras Serranas segundo os tratamentos aplicados.

Cabras Serranas (n = 55)							
Controlo (n = 25)				Suplemento Vitamínico (n = 30)			
PGF_{2α} + FGA (n = 11)		PGF_{2α} + MAP (n = 14)		PGF_{2α} + FGA (n = 15)		PGF_{2α} + MAP (n = 15)	
300 UI eCG (n = 11)		300 UI hCG (n = 14)		300 UI eCG (n = 15)		300 UI hCG (n = 15)	
Fresco (n = 6)	Refrigerado (n = 5)	Fresco (n = 7)	Refrigerado (n = 7)	Fresco (n = 8)	Refrigerado (n = 7)	Fresco (n = 8)	Refrigerado (n = 7)

QUADRO II – Divisão das cabras Pretas de Montesinho segundo os tratamentos aplicados

Cabras Pretas de Montesinho (n = 10)	
Controlo (n = 5)	Suplemento vitamínico (n = 5)
PGF_{2α} + FGA (n = 10)	
300 UI de eCG (n = 10)	
Sémen refrigerado (n = 10)	

1.4. Recolha de Sêmen e Análises Seminais

O sêmen foi recolhido por electroejaculação (Figura 9) (Electrojac™ Ideal, Minnesota, EUA) (Figura 10). Os bodes Serranos (n = 2) e os Preto de Montesinho (n = 1) não ejaculavam há 3 dias. Feitas as colheitas dos ejaculados, os tubos colectores foram tapados e transportados para laboratório, onde foram mantidos a 37°C, num banho-maria (Neslab® RTE 221, Newington, EUA). No mesmo equipamento foi conservado o diluidor seminal.

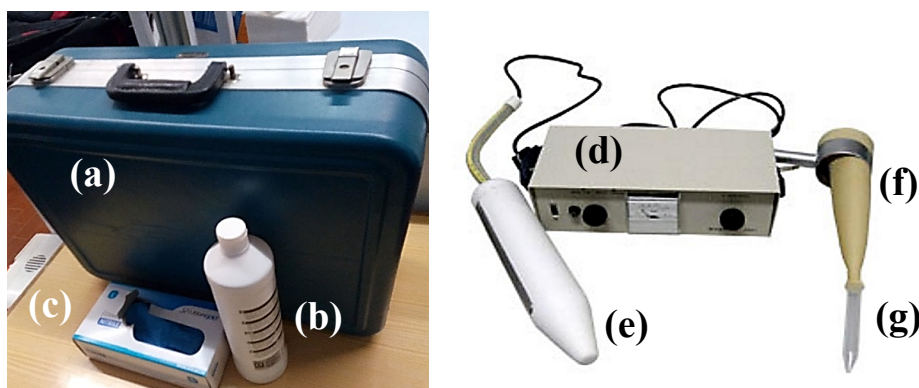


FIGURA 9 – IMAGEM ILUSTRATIVA: Equipamentos que compõem o eletroejaculador. Maleta transportadora (a). Gel Lubrificante (b). Luvas (c). Caixa de energia do Eletroejaculador (d). Eletrodo (e). Saco coletor (f). Tubo graduado de coleta (g).

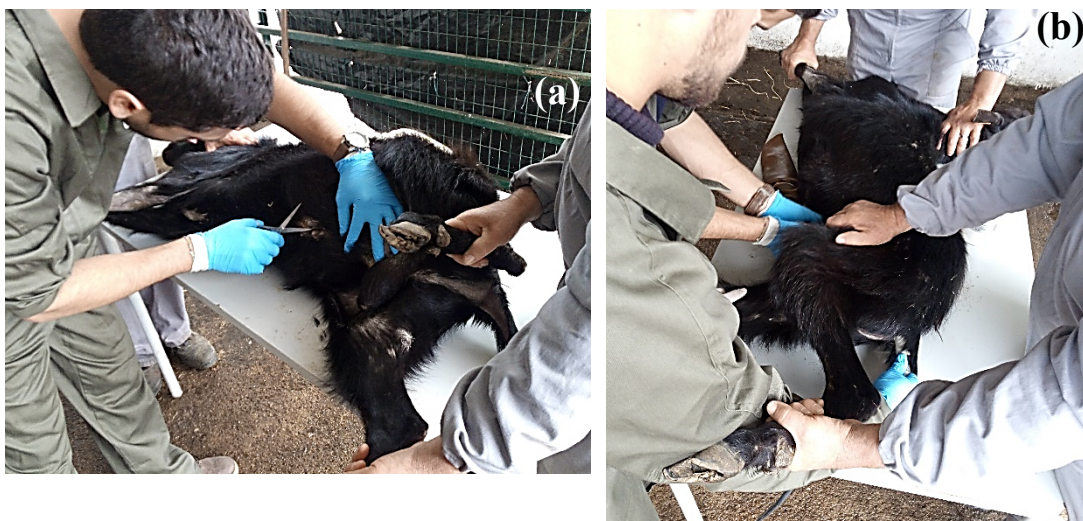


FIGURA 10 - Preparação e limpeza do bode (a). Momento da eletroejaculação e colheita (b).

O volume foi medido através da graduação dos tubos colectores e a motilidade e a concentração espermática foram estimadas com o auxílio de um sistema CASA da Minitube (Androvision®, Minitüb, Tiefenbach, Alemanha), constituído por um microscópio de contraste de fase Carl Zeiss Axio Lab A1 (Gottngun, Alemanha), com placa aquecida (37°C) e uma camera de vídeo (Basler camera A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha). Foram tiradas cerca de 30 fotos/0,5 minutos. Foram usadas

lâminas não reutilizáveis com 4 câmaras Leja 20 (Leja Products, B.V., Nieuw-Vennep, Holanda). O *software* foi programado para gravar 7 campos (motilidade) e 30 campos (concentração espermática) sob contraste de fase negativo e uma ampliação de X 200. No laboratório existiam duas placas de aquecimento (37°C) que permitiam manter todos os demais utensílios (pontas de pipetas, tubos, lâminas com 4 câmaras Leja 20).

Os ejaculados utilizados tinham um volume $\geq 0,8$ ml, uma motilidade $\geq 75\%$ e uma concentração espermática $\geq 3,0 \times 10^9$ espermatozoides/ml.

1.5. Doses Seminais

Depois de realizadas as análises seminais, cada ejaculado foi inicialmente diluído (1:1) (Baril *et al.*, 1993) com um diluidor comercial INRA 96® (IMV Technologies, L'Aigle, França). Posteriormente, o volume foi acertado com os valores indicados pelo programa Androvision® (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Em seguida, a temperatura dos ejaculados em banho maria foi reduzida durante 120 minutos, de 37°C para 15°C (Neslab® RTE 221, Newington, EUA). Os ejaculados a serem utilizados em fresco também foram diluídos a 37°C. Depois de 10 minutos de repouso (37°C ou 15°C), o sémen diluído (respectivamente, fresco ou refrigerado) foi aspirado para palhinhas francesas de 0,25 ml e seladas com pó de álcool polivinílico. Cada palhinha de sémen continha, pelo menos, 80×10^6 espermatozoides.

As palhinhas com sémen refrigerado foram transportadas numa arca refrigeradora da Minitüb® (Tiefenbach, Alemanha), a 15°C. Por seu turno, as palhinhas com sémen fresco foram transportadas num banho-maria da IMV®, a 37°C. Entre o fim dos processos de preparação das doses seminais e o começo da IA passou-se menos de 30 minutos. Começou-se a inseminação pelas doses de sémen fresco.

1.6. Inseminação Artificial a Tempo Fixo

As cabras foram inseminadas (Figura 11), independentemente de terem manifestado cio, cerca de 43 + 1 hora pós-administração da eCG ou hCG. A deposição do sémen foi feita sempre o mais profundamente possível no canal cervical, com o auxílio de fórceps vaginais, luzes LED e pistoletes Quicklock® (Minitüb, Alemanha).



FIGURA 11 – Inseminação cervical artificial das cabras Serranas(a). Inserção do pistoleta no momento da inseminação cervical (b).

As variáveis registradas foram, o tipo de *Os* externo (Figura 12), a cor (Rosa vs. Rosa Escuro vs. Rosa Hemorrágico) e o grau de lubrificação (Reduzida vs. Boa vs. Abundante) vaginal, a viscosidade do muco cervical (Líquida vs. Viscosa), o local de deposição do sêmen (Vagina vs. 1ª prega vs. 2ª prega), se houve refluxo (Sem vs. Com) e o inseminador (A vs. B).

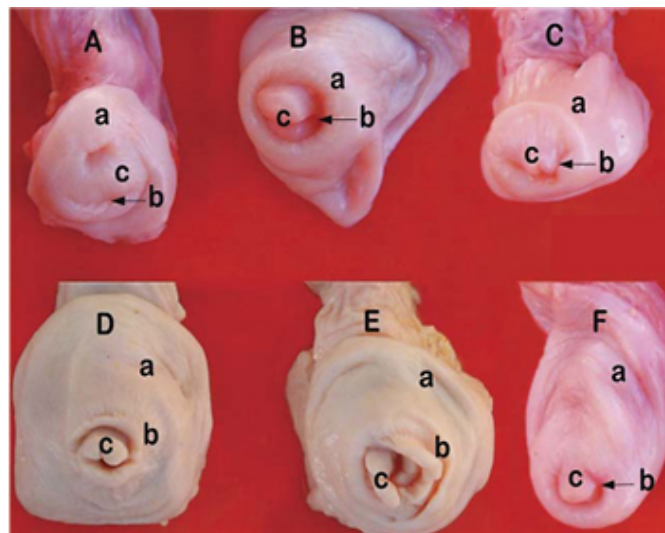


FIGURA 12 – Classificação da aparência da entrada de *Os* cervical externo em cabras Angorá (Dayan *et al.*, 2010). *Legenda: A – Estrela, B – Bico de Pato, C – Crescente, D – Espiral, E – Agregado e F – Proeminente. a. cavidade vaginal, b. saco vaginal e c. protursão vaginal.*

1.7. Diagnóstico de Gestação

Quarenta e um dias (22/6/2017) após a IA procedeu-se ao diagnóstico de gestação

por ultra-sonografia em tempo real (Suguna *et al.*, 2008) (Figura 13), com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet e de uma sonda rectal multifrequência (5,0-10,0 MHz).



FIGURA 13 - Diagnóstico de Gestação 41 dias após a Inseminação Artificial.

1.8. Análise Estatística

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

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início deste estudo, a idade média das cabras Serranas era de $4,3 \pm 2,2$ anos (c.v. = 51,1%) e a das cabras Pretas de Montesinho era de $2,7 \pm 1,4$ anos (c.v. = 52,5%). As diferenças de idade registadas entre raças e grupos Controlo e Suplementado revelaram-se estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) (Quadro II).

QUADRO II – Idade, peso corporal e condição corporal (CC) das cabras em função da raça (Serrana vs. Preta de Montesinho) e do grupo (Controlo vs. Suplementado)

Raça	Grupo	Idade (anos)	Peso (kg)	CC (pontos)
Serrana	Controlo	$4,2^{a,x} \pm 2,3$	$44,9^{a,x} \pm 6,3$	$3,1^{a,x} \pm 0,5$
	Suplementado	$4,5^{a,y} \pm 2,1$	$44,1^{a,x} \pm 6,2$	$3,0^{a,x} \pm 0,6$
Preta de Montesinh o	Controlo	$1,8^{b,x} \pm 1,3$	$35,2^{b,x} \pm 10,1$	$2,9^{a,x} \pm 0,3$
	Suplementado	$3,6^{b,y} \pm 0,9$	$43,4^{b,x} \pm 7,0$	$3,2^{a,x} \pm 0,3$

a=a, para $P>0,05$, a≠b, para $P\leq 0,05$ (entre linhas, mesma raça).
x=x, para $P>0,05$, x≠y, para $P\leq 0,05$ (entre linhas, mesmo grupo).

As cabras Serranas pesavam, em média, $44,5 \pm 6,2$ kg (c.v. = 14,0%) e as Pretas de Montesinho $39,3 \pm 9,3$ kg (c.v. = 23,6%). Por seu turno, as cabras Serranas tinham uma CC média de $3,1 \pm 0,6$ (c.v. = 20,0%) e as Pretas de Montesinho de $3,2 \pm 0,3$ (c.v. = 10,0%). As diferenças de peso corporal observadas entre raças foram estatisticamente significativas ($P\leq 0,05$) e as encontradas entre grupos estatisticamente não significativas ($P>0,05$). As diferenças de CC entre raças e grupos revelaram-se estatisticamente não significativas ($P>0,05$). Todas as cabras apresentavam uma CC adequada à actividade reprodutiva – 2,5-3,5 (O’Brein, 2002, Scaramuzzi e Martin, 2008 e Karikari e Blasus, 2009).

2.1. Estado Fisiológico Pré-Tratamento Progestagénico

Segundo Steyn (2003), o estado fisiológico das fêmeas deve ser sempre verificado antes de se dar início ao processo de controlo da actividade reprodutiva e de aplicação da técnica de IA. Nas duas semanas anteriores à aplicação do tratamento progestagénico “curto” + eCG ou hCG, 63,6% das cabras Serranas e 100,0% das cabras Pretas de Montesinho apresentaram em, pelo menos uma das recolhas de sangue, níveis plasmáticos de progesterona superiores a 0,5 ng/ml. A diferença entre raças foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 43,9$, para $P\leq 0,001$).

Esta diferença é racial ou resulta do facto das cabras Serranas terem estado alojadas na Quinta do Pinheiro Manso e as Pretas de Montesinho na Quinta de Santa Apolónia e conseqüentemente terem estado sujeitas a diferentes condições ambientais (quando em pastoreio). A Quinta do Pinheiro Manso encontra-se numa zona mais ventosa. O vento pode ter condicionado as disponibilidades naturais de alimentos e/ou ter alterado a percepção da temperatura do ar por parte das cabras e o funcionamento dos seus mecanismos de termorregulação. Condições adversas que autores como Karsch *et al.* (1984) e Valentim *et al.*, (2006b), também observaram que afetaram diretamente a expressão reprodutiva de pequenos ruminantes.

2.2. Resposta Ovária ao Tratamento Progestagénico Curto+eCG ou hCG

Cerca de 98,2% das cabras Serranas responderam aos tratamentos progestagénicos curtos + gonadotropinas coriónicas aplicados. Por seu turno, todas as cabras Pretas de Montesinho apresentaram uma resposta ovária completa (100,0%). A diferença entre raças foi estatisticamente não significativa ($\chi^2 = 2,0$, para $P>0,05$). Estes valores são

iguais ou superiores, respectivamente, aos indicados por Leão (2017) – 94,2% – e por Bonilla (2001) – 50-90%. Nas cabras Serranas, nem a suplementação vitamínica (Controlo: 96,7% vs. Suplementado: 100,0%), nem o tratamento hormonal (FGA + eCG: 100,0% vs. MAP + hCG: 96,6%) influenciaram significativamente a percentagem de cabras que ovularam ($\chi^2 = 3,0$, para $P > 0,05$). Nas cabras Pretas de Montesinho, a suplementação vitamínica também não alterou a percentagem de cabras que ovularam (Controlo: 100,0% vs. Suplementado: 100,0%) ($P > 0,05$).

Nas cabras Serranas, a primeira elevação dos níveis plasmáticos de progesterona (PENPP₄) surgiu, em média, $72,0 \pm 6,6$ horas (c.v. = 9,2%) e nas cabras Pretas de Montesinho $76,8 \pm 15,2$ horas (c.v. = 19,8%) pós-tratamento progestagénico curto + gonadotropina coriónica ($P > 0,05$). Os valores relativos às cabras Serranas e Pretas de Montesinho são semelhantes ao obtido por Leão (2017) que trabalhou com cabras Serranas – $76,0 \pm 17,4$ horas (c.v. = 22,9%). A suplementação vitamínica não teve qualquer efeito estatisticamente significativo sobre este parâmetro ($P > 0,05$). Por outro lado, nas cabras Serranas, nenhum dos tratamentos hormonais influenciou significativamente a PENPP₄ (FGA + eCG: $72,9 \pm 8,3$ horas vs. MAP + hCG: $71,1 \pm 4,5$ horas) ($P > 0,05$). Ao que tudo indica, as cabras Serranas e Pretas de Montesinho, para além de apresentarem um bom peso e uma boa CC, também não apresentavam carência em vitaminas capazes de influenciar negativamente a sua resposta ovárica.

O momento da inseminação artificial pós-tratamento de sincronização deaios é muito importante (Kukovics *et al.*, 2011). Nos protocolos franceses, as inseminações cervicais são feitas 43 horas (Alpina) ou 45 horas (Saanen) após a remoção das esponjas vaginais (Corteel e Leboeuf, 1990; citados por Leboeuf *et al.*, 2000). López-Sebastián *et al.* (2007) propõem que as cabras sejam inseminadas 43, 46 ou 50 horas pós-retirada das esponjas vaginais. Abecia *et al.* (2016) sugerem o intervalo de 46 ± 1 hora. Baril *et al.* (1993) e Cseh *et al.* (2012) recomendam que esta seja feita 45 +1 hora após o fim do tratamento hormonal. Nas cabras Serranas, os técnicos da ANCRAS (Associação Nacional de Caprinicultores da raça Serrana) inseminam 43 + 1 hora pós-tratamento hormonal (Pereira, informação pessoal, 2016). O mesmo fez Leão (2017).

2.3. Resposta à Inseminação Artificial

São múltiplos os factores que podem afectar a taxa de fertilidade nos pequenos ruminantes inseminados artificialmente: genética, indivíduo, alimentação, meio ambiente, sistema de exploração, método de controlo da actividade reprodutiva,

métodos de recolha e de conservação do sêmen, tipo de inseminação, local de deposição do sêmen e inseminador (Campbell *et al.*, 1996, Gordon, 1997, Anel *et al.*, 2005, 2006, Domínguez *et al.*, 2008, Morrell, 2011, Cseh *et al.*, 2012, Santolaria *et al.*, 2014, Palacios e Abecia, 2015, Valentim *et al.*, 2016, Yotov *et al.*, 2016, Dendena, 2017 e Vichas *et al.*, 2017).

2.3.1. RAÇA

De acordo com a bibliografia, em caprinos, a taxa de fertilidade pós-IA cervical ronda os 50-65% (Baril *et al.*, 1993, Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009). No presente trabalho, quarenta e um dias após a IA, 69,1% (n = 38) das cabras Serranas e 60% (n = 6) das cabras Pretas de Montesinho estavam gestantes ($\chi^2 = 1,8$, para $P > 0,05$). Esta diferença racial é ainda menor quando se comparam os resultados verificados nas cabras Serranas e Pretas de Montesinho sujeitas ao mesmo tratamento FGA + eCG e a IA com sêmen refrigerado (Serranas: 66,7% vs. Pretas de Montesinho: 60,0%) ($\chi^2 = 1,1$, para $P > 0,05$). No trabalho realizado por Leão (2017), com cabras Serranas, esta autora encontrou uma taxa de fertilidade estatisticamente igual – 74,6% ($\chi^2 = 1,6$, para $P > 0,05$) – à observada no presente trabalho. Relativamente às cabras da raça Preta de Montesinho não existe nenhum outro trabalho como o qual se possa comparar os resultados alcançados.

2.3.2. IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL

Em ambas as raças, a idade, o peso corporal e a CC não influenciaram de modo estatisticamente significativamente a taxa de fertilidade ($P > 0,05$).

2.3.3. NÚMERO DE PARTOS

É geralmente aceite que as fêmeas nulíparas são menos férteis do que as múltiparas (Gordon, 1997). As primeiras tendem a apresentar ciclos éstricos mais curtos e ovulam mais cedo do que as segundas (Steyn, 2003). Para Gordon (1997), a subfertilidade das fêmeas nulíparas resulta, fundamentalmente, de um aumento da taxa de mortalidade embrionária. No grupo de cabras Serranas não havia fêmeas nulíparas. Nas cabras Pretas de Montesinho, a taxa de fertilidade das fêmeas nulíparas (66,7%) foi estatisticamente igual à das fêmeas múltiparas (57,1%) ($\chi^2 = 2,1$, para $P > 0,05$). Entre as cabras Serranas, a taxa de fertilidade não variou significativamente entre fêmeas primíparas (73,3%) e as fêmeas múltiparas (67,5%) ($\chi^2 = 0,6$, para $P > 0,05$).

2.3.4. SUPLEMENTAÇÃO VITAMÍNICA

Nos animais de interesse zootécnico, o desempenho reprodutivo depende do estado nutricional (Osuagwuh e Akpokdje, 1986, Osuagwuh e Aire, 1990, Smith e Akinbamijo, 2000 e Balikci *et al.*, 2007). A carência em micronutrientes é preocupante, pois eles estão envolvidos em funções essenciais como a desintoxicação intracelular relativa a radicais livres (Smith e Akinbamijo, 2000) – vitamina A (Hashem *et al.*, 2016), vitamina D (Yao *et al.*, 2017) e vitamina E (McDowell *et al.*, 1996 e Smith e Akinbamijo, 2000) –, a secreção de hormonas esteróides (Smith e Akinbamijo, 2000) – vitamina A (Hashem *et al.*, 2016), vitamina C (Hashem *et al.*, 2016) e vitamina D (Liu e Hewison, 2012, Shahrokhi *et al.*, 2016 e Yao *et al.*, 2017) – e de AMH (Hormona Anti-Mülleriana) (Lorenzen *et al.*, 2017 e Yao *et al.*, 2017), o metabolismo da água (Hashem *et al.*, 2016), de ácidos gordos (Duplessis *et al.*, 2014), de hidratos de carbono, de proteínas e de ácidos nucleicos (Smith e Akinbamijo, 2000), a função ovárica – vitamina A (Eldaim *et al.*, 2015 e Hashem *et al.*, 2016) e vitamina D (Barrett *et al.*, 2010, Lorenzen *et al.*, 2017 e Yao *et al.*, 2017) –, a taxa de fertilidade – vitamina A (Eldaim *et al.*, 2015), vitamina B (Duplessis *et al.*, 2014), vitamina C (Hashem *et al.*, 2016) e vitamina D (Liu e Hewison, 2012, Shahrokhi *et al.*, 2016 e Lorenzen *et al.*, 2017) – e o crescimento e a viabilidade embrionária (Smith e Akinbamijo, 2000) – vitamina A (Eldaim *et al.*, 2015), vitamina B (Duplessis *et al.*, 2014) e vitamina D (Shahrokhi *et al.*, 2016). A informação relativa ao modo de acção e à função das vitaminas continua a ser contraditória (Smith e Akinbamijo, 2000, Shahrokhi *et al.*, 2016 e Fabris *et al.*, 2017). No presente trabalho, a administração prévia do suplemento vitamínico condicionou negativamente a taxa de fertilidade nas cabras Serranas (Controlo: 76,0% vs. Suplementado: 63,3%) ($\chi^2 = 4,0$, para $P \leq 0,05$), mas não nas cabras Pretas de Montesinho (Controlo: 60,0% vs. Suplementado: 60,0%) ($P > 0,05$). A origem da diferença observada entre as cabras Serranas e Pretas de Montesinho não se pode descartar o facto desta possível diferença racial resultar apenas do reduzido tamanho da amostra das cabras Pretas de Montesinho. Estes efeitos deverão ser avaliados em futuros trabalhos.

Desconhece-se o motivo para o resultado encontrado entre as cabras Serranas, podendo se tratar de uma possível relação complexa entre as vitaminas e as condições fisiológicas, nutricionais ou ambientais, que os animais apresentavam e estavam expostos, porém, relação essa que não foi possível identificar, uma vez que, não foram realizadas análises mais aprofundadas sobre estes factores e seus possíveis efeitos.

2.3.5. TRATAMENTOS HORMONAIIS

Neste trabalho, as cabras Serranas foram submetidas a dois tratamentos de sincronização da actividade ovárica – FGA + eCG vs. MAP + hCG. Os efeitos destes tratamentos sobre a taxa de fertilidade foram estatisticamente não significativos (FGA + eCG: 65,4% vs. MAP + hCG: 72,4%) ($\chi^2 = 1,1$, para $P > 0,05$).

2.3.6. BODE

Para inseminar as cabras Serranas foram usados ejaculados de dois bodes dadores de sémen. A taxa de fertilidade diferiu entre machos (A: 77,8% vs. B: 60,7%) ($\chi^2 = 6,8$, para $P \leq 0,01$). Já as cabras Pretas de Montesinho foram todas inseminadas com o sémen do mesmo bode, devido seu reduzido número de amostragem.

2.3.7. TÉCNICA DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN

Na IA das cabras Serranas foi utilizado sémen fresco ou refrigerado. A taxa de fertilidade não variou significativamente em função do tipo de preservação do sémen utilizado (Fresco: 69,0% vs. Refrigerado: 69,2%) ($\chi^2 = 0,0$, para $P > 0,05$). As cabras Pretas de Montesinho foram todas inseminadas com sémen refrigerado.

2.3.8. OS EXTERNO

Os externo de todas as cabras inseminadas artificialmente foi classificado de acordo com a Tabela de Dayan *et al.* (2010). Nas cabras Serranas foram identificados os 6 tipos de Os externo. O mais frequente foi o Bico de Pato (27,3%), o segundo o Espiral (25,5%), os terceiros o Crescente e o Agregado (16,4%), o quarto o Proeminente e o quinto o Estrela (5,5%) ($\chi^2 = 26,4$, para $P \leq 0,001$). Nas cabras Pretas de Montesinho também foram encontrados os 6 tipos de Os externo. O mais comum foi o Crescente (40%), depois o Agregado (20%) e finalmente os demais tipos (10%/cada) ($\chi^2 = 52,8$, para $P \leq 0,001$). A diferença entre raças foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 26,7$, para $P \leq 0,001$). Contudo, ela não pode não resultar apenas de diferenças raciais, mas também de diferenças de idade e do número de partos anteriores (Gordon, 1997 e Steyn, 2003). Estes parâmetros condicionam o tamanho e a forma do canal cervical (Candappa e Bartlewski, 2011 e Moura *et al.*, 2011).

Nas cabras Serranas, as melhores taxas de fertilidade obtiveram-se pós-ultrapassagem de Os externo dos tipos Espiral (78,6%), Crescente (77,8%), Bico de Pato (66,7%) e Agregado (66,7%). Valor intermédio foi observado no tipo Proeminente (60,0%). O pior resultado de fertilidade foi registado com o tipo Estrela (33,3%). Nas cabras Pretas de Montesinho, o tamanho da amostra e a dispersão dos tipos de Os

externo não permitiu estabelecer qualquer relação estatisticamente significativa entre estes últimos e a taxa de fertilidade.

2.3.9. COR DA MUCOSA VAGINAL

Nas cabras Serranas, a cor da mucosa vaginal foi maioritariamente classificada como Rosa (98,2%). Apenas uma das cabras apresentou uma cor Rosa Hemorrágica (1,8%). Nas cabras Pretas de Montesinho, a cor da mucosa vaginal foi sempre classificada como Rosa. Este é um parâmetro sempre difícil de avaliar, pela sua “subjectividade” e porque a cor da mucosa vaginal pode ter outras origens que não o cio – genética e/ou estado de saúde (Leão, 2017).

Nas cabras Serranas, a taxa de fertilidade foi afectada pela cor da mucosa vaginal (Rosa: 68,5% vs. Rosa Hemorrágico: 100,0%) ($\chi^2 = 38,1$, para $P \leq 0,001$) (Quadro III). Porém, este resultado tem de ser visto com muito cuidado, pois apenas uma cabra apresentou a mucosa vaginal de cor Rosa Hemorrágico (e ficou gestante). Os resultados encontrados por Leão (2017) também não são muito elucidativos pois apenas 2 cabras apresentaram uma mucosa vaginal de cor Rosa e outras 2 de cor Rosa Hemorrágico. Todas elas ficaram gestantes. Contudo, esta autora encontrou maioritariamente cabras com uma mucosa vaginal de cor Rosa Escuro (73,0%). Nas cabras Pretas de Montesinho, o tamanho da amostra e a cor Rosa da mucosa vaginal presente em todas as fêmeas que ficaram gestantes não permitiu estabelecer uma relação clara entre a cor da vagina e a taxa de fertilidade.

QUADRO III – Cor da mucosa vaginal quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho

Raça	Cor da Mucosa Vaginal	Taxa de Fertilidade
Serrana	Rosa	68,5% ^a (37/54)
	Rosa Escuro	0,0% ^b (0/0)
	Rosa Hemorrágico	100,0% ^c (1/1)
Preta de Montesinho	Rosa	60,0% (6/10)
	Rosa Escuro	0,0% (0/0)
	Rosa Hemorrágico	0,0% (0/0)

^a≠^b e ^a≠^c, para $P \leq 0,001$ (entre linhas).

2.3.10. LUBRIFICAÇÃO VAGINAL

Na IA cervical, o sémen é depositado na porção anterior do canal cervical e o transporte do sémen é afectado pela quantidade e qualidade do muco cervical (Santolaria *et al.*, 2014). Quando as fêmeas têm um fluxo abundante ou muito reduzido a fertilidade diminui, pelo que é conveniente eliminar o excesso de muco, sempre que este exista (Palacios, 2010, Dendena, 2017 e Leão, 2017). Nas cabras Serranas, a lubrificação foi maioritariamente boa (94,5%). Apenas uma cabra (1,8%) apresentou lubrificação reduzida e duas (3,6%) lubrificação abundante. A lubrificação abundante pode promover uma maior diluição da dose seminal nas secreções do tracto genital feminino, reduzindo rapidamente os efeitos protectores do plasma seminal (Morrell, 2011 e Santolaria *et al.*, 2011) e eventualmente um aumento do refluxo vulvar (Dendena, 2017). Esta maior lubrificação pode estar associada ao Proestro ou aos momentos iniciais do Estro (Fonseca *et al.*, 2010). Nas cabras Pretas de Montesinho, todas as fêmeas apresentaram uma boa lubrificação (100,0%). A diferença entre raças foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 6,2$, para $P \leq 0,05$).

Nas cabras Serranas, a lubrificação vaginal condicionou a taxa de fertilidade (Quadro IV). Contudo, os resultados têm de ser vistos com cuidado dado o tamanho (número de cabras) de algumas classes. Nas cabras Pretas de Montesinho, todas elas apresentaram uma boa lubrificação vaginal.

QUADRO IV – Lubrificação vaginal quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho

Raça	Lubrificação Vaginal	Taxa de Fertilidade
Serrana	Reduzida	100,0% ^a (1/1)
	Boa	67,3% ^b (35/52)
	Abundante	50,0% ^c (1/2)
Preta de Montesinho	Reduzida	0,0% (0/0)
	Boa	60,0% (6/10)
	Abundante	0,0% (0/0)

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

2.3.11. VISCOSIDADE DAS SECREÇÕES CERVICAIS

A viscosidade das secreções cervicais não variou significativamente entre as cabras Serranas (Líquida: 94,5% vs. Viscosa: 5,5%) e as cabras Pretas de Montesinho (Líquida: 90% vs. Viscosa: 10%) ($\chi^2 = 1,1$, para $P > 0,05$).

Nas cabras Serranas, a viscosidade das secreções cervicais não influenciou a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 0,1$, para $P > 0,05$) (Quadro V). Pelo contrário, nas cabras Pretas de Montesinho, a viscosidade afectou a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 56,4$, para $P \leq 0,001$). De novo, porque apenas uma cabra Preta de Montesinho apresentou secreções cervicais viscosas, este resultado deve ser visto com prudência. Num futuro trabalho, a viscosidade das secreções cervicais será classificada segundo a tabela de Fonseca *et al.* (2010) que parece ser mais clarificadora da fase do ciclo éstrico em que as cabras se encontram.

QUADRO V – Viscosidade das secreções cervicais quando da inseminação artificial e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho

Raça	Viscosidade	Taxa de Fertilidade
Serrana	Líquida	69,2% ^a (36/52)
	Viscosa	66,7% ^a (2/3)
Preta de Montesinho	Líquida	55,6% ^a (5/9)
	Viscosa	100,0% ^b (1/1)

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

2.3.12. LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÉMEN

Nas cabras Serranas e Pretas de Montesinho, o sémen foi depositado na vagina (Serranas: 38,2% vs. Pretas de Montesinho: 30,0%), após a 1ª prega (Serranas: 41,8% vs. Pretas de Montesinho: 60,0%) e depois da 2ª prega cervical (Serranas: 20,0% vs. Pretas de Montesinho: 10,0%). A diferença entre raças revelou-se estatisticamente significativa ($\chi^2 = 7,5$, para $P \leq 0,05$).

Na inseminação cervical, a taxa de fertilidade é maior quanto mais profundamente for deixado o sémen (Aisen, 2004a, Anel *et al.*, 2005, Candappa e Bartlewski, 2011 e Valentim *et al.*, 2016). Efectivamente, entre as cabras Serranas, a taxa de fertilidade

aumentou com a profundidade a que o sémen foi depositado dentro do genital feminino (Quadro VI).

QUADRO VI – Local da deposição do sémen e sua relação com a taxa de fertilidade nas raças Serrana e Preta de Montesinho

Raça	Local deposição do sémen	Taxa de Fertilidade
Serrana	Vaginal	57,1% ^a (12/21)
	1 ^a prega	73,9% ^{b,c} (17/23)
	2 ^a prega	81,8% ^c (9/11)
Preta de Montesinho	Vaginal	33,3% ^x (1/3)
	1 ^a prega	83,3% ^y (5/6)
	2 ^a prega	0,0% ^z (0/1)

a≠b, para P≤0,05, a≠c, para P≤0,001 (entre linhas, cabras Serranas)

x≠y, x≠z, y≠z, para P≤0,001 (entre linhas, cabras Pretas de Montesinho).

Nas cabras Pretas de Montesinho, a taxa de fertilidade foi elevada quando o sémen foi depositado depois de ultrapassar a 1^a prega cervical. Nesta raça, a IA vaginal produziu uma taxa de fertilidade superior à da IA mais profunda (pós-2^a prega cervical). Resultados semelhantes foram observados por Dendena (2017), em ovelhas Churras Bragançanas, e por Leão (2017), em cabras Serranas. Segundo alguns autores, o possível trauma que a tentativa de ultrapassar a 2^a prega cervical comporta traduz-se num decréscimo da taxa de fertilidade, por afectar o transporte e a viabilidade dos espermatozóides no tracto genital feminino, originando um maior fluxo de células imunitárias ao lúmen do canal cervical (Aisen, 2004a, Candappa e Bartlewski, 2011 e Fonseca *et al.*, 2010). No presente trabalho, as cabras Serranas eram primíparas ou múltiparas, enquanto as Pretas de Montesinho eram nulíparas, primíparas ou múltiparas.

2.3.13. REFLUXO CERVICAL

Na IA cervical, o refluxo seminal deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012 e Dendena, 2017), particularmente quando este é abundante (Dendena, 2017). Nas cabras Serranas, 88,2% (30/34) das fêmeas não produziu refluxo cervical. Nas cabras Pretas de

Montesinho, esta percentagem foi de 57,1% (4/7). A diferença entre raças foi estatisticamente significativa ($\chi^2 = 24,1$, para $P \leq 0,001$).

Nas cabras Serranas, 80,0% (24/30) das fêmeas inseminadas sem refluxo cervical e 50% (2/4) das inseminadas com refluxo ficaram gestantes ($\chi^2 = 19,8$, para $P \leq 0,001$) (Quadro VII). Nas cabras Pretas de Montesinho, 50% (2/4) das cabras inseminadas sem refluxo cervical e 100% (3/3) das inseminadas com refluxo ficaram gestantes. Nenhuma das cabras estudadas realizou um refluxo abundante. É possível que os pequenos refluxos observados resultem do “hábito” (a corrigir) por parte de alguns inseminadores: ir retirando o pistolete de IA do canal cervical à medida que descarregam a dose seminal.

QUADRO VII – Refluxo seminal e sua relação com a taxa de fertilidade

Raça	Refluxo Seminal	Taxa de Fertilidade
Serrana	Sem	80,0% ^a (24/30)
	Com	50,0% ^b (2/4)
Preta de Montesinho	Sem	50,0% ^a (2/4)
	Com	100,0% ^b (3/3)

a \neq b, para $P \leq 0,001$ (entre linhas, mesma raça).

No trabalho realizado por Leão (2017), a maioria das cabras Serranas que não apresentaram refluxo cervical ficaram gestantes (81,1%). A taxa de fertilidade foi inferior entre as cabras que exibiram um refluxo cervical ligeiro 44,4% (Leão, 2017). Estes valores são semelhantes aos encontrados no presente trabalho ($P > 0,05$).

2.3.14. INSEMINADOR

Na IA cervical, a aptidão técnica do inseminador é muito importante (Campbell *et al.*, 1996, Steyn, 2003, Anel *et al.*, 2005, 2006, David *et al.*, 2015 e Dendena, 2017). Se nas cabras Serranas, a diferença de aptidão entre técnicos não afectou significativamente a taxa de fertilidade (A: 67,9% vs. B: 70,4%) ($\chi^2 = 0,9$, para $P > 0,05$), o contrário foi observado entre as cabras Pretas de Montesinho (A: 80,0% vs. B: 40,0%) ($\chi^2 = 33,3$, para $P \leq 0,001$). Ao contrário do inseminador A, o inseminador B tende a forçar a passagem do pistolete de inseminação pelo canal cervical. Se nas cabras Serranas (mais velhas) esta atitude não condicionou a taxa de fertilidade, nas cabras Pretas de Montesinho (mais jovens), ela terá prejudicado esta mesma taxa. Nestas cabras, este terá

sido o factor mais importante na determinação da taxa média de fertilidade encontrada (60%). Tais factos podem ter condicionado negativamente a taxa de fertilidade nas Pretas de Montesinho, principalmente por se tratar de animais mais jovens, em que o tracto reprodutivo não estivesse acostumado a qualquer tipo de incisão ou contacto e isso poderia ter desencadeado uma reacção em cadeia com um ferimento ou escoriação, prejudicando as taxas de fertilidade.

3. CONCLUSÕES

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

- Na segunda quinzena de Abril, 63,6% das cabras Serranas e 100% das cabras Pretas de Montesinho estavam cíclicas. Esta diferença foi estatisticamente significativa.
- Cerca de 98,2% das cabras Serranas e 100,0% das cabras Pretas de Montesinho responderam ao tratamento de sincronização deaios. A diferença entre raças foi estatisticamente não significativa.
- Em ambas as raças, a suplementação vitamínica não afectou a percentagem de cabras que ovularam.
- Nas cabras Serranas, o tratamento hormonal empregue não condicionou a percentagem de fêmeas que ovularam (FGA + eCG: 100,0% vs. MAP + hCG: 96,6%), nem a duração do intervalo entre a remoção das esponjas vaginais e a primeira elevação dos níveis plasmáticos de progesterona (PENPP₄) – FGA + eCG: 72,9 ± 8,3 horas vs. MAP + hCG: 71,1 ± 4,5 horas.
- A PENPP₄ surgiu, em média, 72,0 ± 6,6 horas pós-tratamento progestagénico curto + gonadotropina coriónica, nas cabras Serranas, e 76,8 ± 15,2 horas, nas cabras Pretas de Montesinho. A diferença entre raças foi estatisticamente não significativa.
- Quarenta e um dias após a IA, 69,1% das cabras Serranas e 60,0% das cabras Pretas de Montesinho estavam gestantes. A diferença entre raças foi estatisticamente não significativa.
- A raça (Serrana: 69,1% vs. Preta de Montesinho: 60,0%), a idade, o peso, a condição corporal e o número de partos anteriores não afectaram a taxa de fertilidade.
- Nas cabras da raça Serrana, a suplementação vitamínica (Controlo: 76,0% vs. Suplementado: 63,3%), o bode (A: 77,8% vs. B: 60,7%), o tipo de Os cervical externo (Espiral: 78,6% vs. Crescente: 77,8% vs. Bico de Pato: 66,7% vs. Agregado 66,7% vs. Proeminente: 60,0% vs. Estrela: 33,3%), a cor (Rosa: 68,5% vs. Rosa Escuro: 0,0% vs. Rosa Hemorrágico: 100,0%) e a lubrificação

vaginal (Reduzida: 100% vs. Boa: 67,3% vs. Abundante: 50,0%), o local de deposição do sémen (Vagina: 57,1% vs. 1ª prega: 73,9% vs. 2ª prega: 81,8%) e o refluxo cervical (Sem: 80,0% vs. Com: 50,0%) influenciaram significativamente a taxa de fertilidade. Pelo contrário, os tratamentos hormonais (FGA + eCG: 65,4% vs. MAP + hCG: 72,4%), a técnica de preservação do sémen (Fresco: 69,0% vs. Refrigerado: 69,2%), a viscosidade do muco cervical (Líquida: 94,5% vs. Viscosa: 5,5%) e o inseminador (A: 67,9% vs. B: 70,4%) não alteraram significativamente esta taxa.

- Nas cabras Pretas de Montesinho, a viscosidade do muco cervical (Líquida: 55,6% vs. Viscosa: 100,0%), o local de deposição do sémen (Vagina: 33,3% vs. 1º prega: 83,3% vs. 2ª prega: 0,0%), o refluxo cervical (Sem: 50,0% vs. Com: 100,0%) e o inseminador (A: 80,0% vs. B: 40,0%) condicionaram significativamente a taxa de fertilidade. Pelo contrário, a suplementação vitamínica (Controlo: 60,0% vs. Suplementado: 60,0%) não alterou significativamente esta taxa.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbara, A., Ratnasabapathy, R., Jayasena, C. N., & Dhillon, W. S. (2013). The effects of kisspeptin on gonadotropin release in non-human mammals. In: *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology* (pp. 63-87). Springer, New York, NY.
- Abecia, A., Forcada, F. (2010). Manejo reproductivo en ganado ovino. Zaragoza: **Servet**.
- Abecia, J.A., Arrébola, F., Macías, A., Laviña, A., González-Casquet, O., Benítez, F. e Palacios, C., (2016). Temperature and rainfall are related to fertility rate after spring artificial insemination in small ruminants. **International Journal of Biometeorology**, **60**, 1603-1609.
- Abecia, J.A., Forcada, F., González-Bulnes, A., (2012). Hormonal control of reproduction in small ruminants. **Anim Reprod Sci**, **130**, 173-179.
- Afonso, F. P., De Sousa, C. B., Carloto, A., & Gama, L. T. (2015). Preta de montesinhova raça caprina com reconhecimento oficial em portugal. In: **XI Simposio iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos**. Online. 192-196.
- Agarwal, A., Allamaneni, S.S., (2004). Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reprod. Biomed.** Online **9** (3), 338–347.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R.K., (2005). Role of oxidative *stress* in female reproduction. **Reprod. Biol. Endocrinol.** **3**, 28.
- Aisen, E.G. e Venturino, A., (2004). Recolección e evaluación del semen. In: *Reproducción Ovina y Caprina*, E.G. Aisen (Ed), Cap. 5, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Aisen, E.G., (2004a). Procesamiento y conservación del material seminal. *In: Reproducción Ovina y Caprina*, E.G. Aisen (Ed), Cap. 6, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Aisen, E.G., (2004b). Inseminación artificial de ovejas e cabras. *In: Reproducción Ovina y Caprina*, E.G. Aisen (Ed), Cap. 8, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- ANCRAS, Associação Nacional de Caprinocultores da Raça Serrana. (2017). Actividades e Projectos. Acendido a 09 de Novembro de 2017 em: <http://www.ancras.pt/>
- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E. e de Paz., P., (2006). Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, **41** (Suppl. 2), 30-42.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., de la Fuente, L.F. e de Paz., P., (2005). Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay. **Theriogenology**, **63**, 1235-1247.
- APCRS, Associação Portuguesa de Caprinocultores da Raça Serpentina. (2017). Actividades e Projectos. Acendido a 09 de Novembro de 2017 em: <http://www.cabraserpentina.pt/>
- Apu, A. S. *et al.* (2012). A comparative study of fresh and frozen-thawed semen quality in relation to fertility of Black Bengal goats. **Iranian J. Appl. Anim. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 157–161,.

- Araújo, A. A.; Dacheux, J.-L.; Yvon, G. (2012) Insémination Artificielle Ovine: Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle. 1. ed. Saarbrücken: AV Akademikerverlag GmbH & Co., p. 172
- 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.
- Azevedo, J.M., R.C. Valentim e T.M. Correia, (2006). Controlo hormonal da actividade ovárica em ovinos. *Albeitar, Portuguesa*, 2 (6), 4-8.
- Bailey, A. M. (2016). Regulation of seasonal reproduction by interacting environmental cues in Siberian hamsters (*Doctoral dissertation*, Indiana University),EUA.
- Baldassarre, H. & Karatzas, C. N., (2004). Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science** 82–83, 255–266.
- Balikci, E., Yildiz, A., Gurdogan, F. (2007). Blood metabolite concentrations during pregnancy and post-partum in Akkaraman ewes. **Small Rumin. Res.** 67, 247–251.
- 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..
- Barret, 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 progesterone releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. **Theriogenology**, 61, 311-327.
- Barrett, H., & McElduff, A. (2010). Vitamin D and pregnancy: An old problem revisited. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, 24(4), 527-539.
- Benites, N.R., (1999). Medicamentos empregados para sincronização do ciclo estral e transferência de embriões. *In: Farmacologia aplicada à medicina veterinária*, H.S. SPINOSA, S.L. GÓRNIAC e M.M BERNARDI (Eds), 2ª Edição, Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 646 p..
- Bettencourt, E. M. V. (1999). Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. 1999. 126 f Mestrado em Produção Animal -Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa. (*Dissertação de Mestrado*).
- Bezerra, F.S.B., (2010a). Inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinária Brasília**, v. 4 (Supl), S26-S29.
- Bezerra, F.S.B., (2010b). Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. **Acta Veterinária Brasília**, v. 4 (Supl), S20-S25.
- Bittencourt, R. F. (2009). Viabilidade e fertilidade de sêmen ovino criopreservado com glicerol e dimetilacetamida acrescido de trealose EDTA. *Tese de Doutorado*. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP.Brasil.
- Blomhoff, R., Blomhoff, H.K., (2006). Overview of retinoid metabolism and function. **J.Neurobiol.** 66, 606–630.

- Bonilla, W.E., (2001). Manejo reproductivo de la cabra. *In: Producción de cabras lecheras*, P.C. Banderas (Ed), Boletín INIA 66, Chillán, Chile, 200 pp..
- Bortot, D., & Zappa, V. (2015). Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 21(1), 1-23.
- Bouwstra, R. J., Nielen, M., Stegeman, J. A., Dobbelaar, P., Newbold, J. R., Jansen, E. H. J. M., & Van Werven, T. (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part I: Adverse effect on incidence of mastitis postpartum in a double-blind randomized field trial. **Journal of dairy science**, 93(12), 5684-5695.
- Buckrell, B.C., Halbert, G.W., Gartley, C.J. e Bretzlaff, K.N. (1991). Artificial Insemination of Small Ruminants. **Theriogenology Handbook**, 0-2 (10/91): 87-91.
- 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.
- Campbell, J.A., Harvey, T.G., McDonald, M.F. e Sparksman, R.I., (1996). Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. **Theriogenology**, 45, 1535-1544.
- Candappa, I.B.R. e Bartlewski, P.M., (2011). A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. **The Open Reproductive Science Journal**, 3, 162-175.
- Cardigos, L. R. (1981). Caracterização étnica das populações caprinas nacionais e sistemas de manejo. In **14 Jornadas Nacionais de Caprinocultura**. Santarém: Direção Geral de Serviços Veterinários.
- Carlson, J.C., Barcikowski, B. e Mc Craken, (1973). Prostaglandin F2alfa and release of LH in sheep. **J Reprod Fertil**, 34, 357-361.
- Carmo, M.T.; Trinque, C.L.N.; Lima, M.M.; Medeiros, A.S.L.; Alvarenga, M.A.(2002). Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, n.3, pg.252 -254.
- Carolino, N., Sousa, C. B., Carolino, I., Santos-Silva, F., Sousa, C. O., Vicente, A., ... & Gama, L. T. (2017). Biodiversidade caprina em Portugal. **Biodiversidad caprina iberoamericana**, 57-75.
- Carvalho, A. B. D. R. L. (2017). Criopreservação de sêmen como estratégia de conservação de raças autóctones ovinas e caprinas (*Dissertação de Mestrado*). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa, Portugal.
- Castelo, T. S., Frota, T.R. e Silva, A.R., (2008). Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2(3), 67-75.
- Castro, T., Rubianes, E., Menchaca, A., & Rivero, A. (1999). Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats. **Theriogenology**, 52(3), 399-411.

- Correia, T. M. (2004) Estudo da variabilidade e relações genéticas em raças caprinas autóctones mediante microssatélites. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, (*Tese de Doutoramento*).
- Cortez, M. D. F. C. A. (2012). Antecipação da estação reprodutiva em cabras da raça serrana ecótipo Transmontano. Inseminação artificial com sémen congelado. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. (*Dissertação de Mestrado*).
- Cseh, S., Faigl, V. e Amiridis, G.S., (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, **130**, 187-192.
- Cheah, Y. & Yang, W., (2011). Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. **Adv. Biosci. Biotechnol.** 2, 182197.
- Chemineau, P., & Delgadillo, J. A. (1994). Neuroendocrinologie de la reproduction chez les caprins. **INRA Productions animales**, 7(5), 315-326.
- Chemineau, P., Cognié, Y., (1991). Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **FAO**, Rome, Italy.
- Chemineau, P., Gauthier, D., Poirier, J. C., & Saumande, J. (1982). Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. **Theriogenology**, 17(3), 313-323.
- Chow, C.K., (1991). Vitmain E and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** 11, 215–232.
- David, I., Kohnke, P., Lagriffoul, G., Praud, O., Plouarboué, F., Degond, P. e Druart, X., (2015). Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, **161**, 75-81.
- Dayan, M.O., Beşoluk, K., Eken, E. e Ozkadif, S., (2010). Anatomy of the cervical canal in the Angora goat (*Capra hircus*). **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, **16** (5), 847-850.
- Decuadro-Hansen, G., (2004). La refrigeration et la congelation du sperme: experience chez l'animal chilled and frozen semen: the animal experience. **Gynécologie, Obstétrique & Fertilité**, 32, 887-893.
- Dendena, M.W., 2017. Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 52 pp.. (*Dissertação de Mestrado*)
- Dias, L.M.K., (2011). Efeito da administração de hCG para indução de ovulação e estudo da dinâmica folicular no protocolo de 9 dias de sincronização de estros em ovelhas Santa Clara. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, São Paulo, Brasil, 96 p..(*Tese de Doutoramento*).
- Dias, F.E.F., Lopes Júnior, E.S., Villaroel, A.B.S., Rondina, D., Lima-Verde, J.B., Paula, N.R.O. e Freitas, V. J. F., (2001). Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotropina coriônica equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 53 (5), 618-623.
- Dixon, A.B., Knights, M., Pate, J.L., Lewis, P.E. e Inskeep, E.K., (2006). Reproductive performance of ewes after 5-days treatment with intravaginal inserts containing progesterone in combination with injection of Prostaglandin F2 α . **Reprod Domest Anim**, 41, 142-148.

- Domínguez, M.P. Falcinelli, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Cesari, A. e Alberio, R.H., (2008). Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. **Theriogenology**, **69**, 564-573.
- Donovan, A.; Hanrahan, J.P.; Lally, T.; Boland, M.P.; Byrne, G.P.; Duffy, P.; Lonergan, P.; O'Neill, D. J., (2001). AI for sheep using frozen-thawed semen. **End of Project Report**. ARMIS 4047. ISBN 1 84170 1521.
- Dorado, J. *et al.* (2009) Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Animal reproduction science**, v. 112, n. 1-2, p. 150–7.
- Dunn, O.J., (1961). Multiple comparisons among means. **Journal of the American Statistical Association**, **56**, 52-64.
- Duplessis, M., Girard, C. L., Santschi, D. E., Laforest, J. P., Durocher, J., & Pellerin, D. (2014). Effects of folic acid and vitamin B12 supplementation on culling rate, diseases, and reproduction in commercial dairy herds. **Journal of dairy science**, **97**(4), 2346-2354.
- Eldaim, M. A. A., Gaafar, K. M., Darwish, R. A., Mahboub, H. D., & Helal, M. A. (2015). Prepartum vitamin A supplementation enhances goat doe health status and kid viability and performance. **Small Ruminant Research**, **129**, 6-10.
- El-Maaty, A.M.A. e M.H.A. El-Gawad, 2014. Follicle growth, ovulation rate, body weight change, and antioxidant and metabolic status in three fat-tailed sheep breeds fed a half-maintenance diet. **Open Access Animal Physiology**, **6**, 21-31.
- El-Shahat, K. H., & Monem, U. A. (2011). Effects of dietary supplementation with vitamin E and/or selenium on metabolic and reproductive performance of Egyptian Baladi ewes under subtropical conditions. **World Applied Sciences Journal**, **12**(9), 1492-1499.
- Eppleston J, Salamon S, Moore NW, Evans G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. **Anim Reprod Sci**.**36**(3-4):211-25.
- 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 and in anoestrus. **Journal of Agricultural Science**, **94**, 69-88.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. 2º Ed. Butterworths, Sydney, Australia.
- Fabris, A. M., Cruz, M., Iglesias, C., Pacheco, A., Patel, A., Patel, J., ... & García-Velasco, J. A. (2017). Impact of vitamin D levels on ovarian reserve and ovarian response to ovarian stimulation in oocyte donors. **Reproductive biomedicine online**, **35**(2), 139-144.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). FAOSTAT. Acendido a 10 de Fevereiro de 2018 em: <http://www.fao.org/faostat>
- Fatet, A.; Pellicer-Rubio, M-T.; Leboeuf, B., (2011). Reproductive cycle of goats. **Animal Reproduction Science**, **124**, 211-219.
- Fernandes, S. M. (2008). Antecipação da estação reprodutiva em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Inseminação artificial. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. *Dissertação de Mestrado*.

- Fialho, J. (1996). A cabra Serpentina: Origem, efectivos, livro genealógico, características genéticas, morfológicas e produtivas. **Revista Ovelha**, 32.
- Findlater, R.C.F., Haresing, W., Curnock, R.M. e Beck, N.F.G. (1991). Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen: effects of time of insemination and semen dose on conception rates. **Anim. Prod.**, 53: 89-96.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., McCann, T.J. e Jones, D.S.C., (1990). Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF₂ α secretion at luteolysis in ruminants. **Domest Anim Endocrinol**, 7, 111-124.
- Fonseca, J.F., Cruz, R.C., Pinto, P.H.N. e Facó, O., (2010). Inseminação artificial em ovinos e caprinos. In: **I Workshop sobre Ciência Animal na Bahia**, Ilhéus, Bahia, Brasil.
- Fonseca, P. D., (1988). Contributo para a avaliação das raças caprinas portuguesas nos seus sistemas de produção. Universidade Técnica de Lisboa. Escola Superior de Medicina Veterinária. (*Dissertação de Mestrado*)
- Freitas, V.J. de F. e Rubianes, E., 2004. Preparación de las hembras. Detección e control del estro y de la ovulación. In: **Reproducción Ovina y Caprina**, E.G. Aisen (Ed), Cap. 7, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Santiago-Moreno, J., Guzmán, J.L., Zarazaga, L.A. (2015). Exogenous melatonin does not improve the freezability of Blanca Andaluza goat semen over exposure to two months of short days. **Animal Reproduction Science**, 156: 51-57.
- Garcia, A.J.D., Landete, T.C. e Gallego, L.M., 2004. Manejo reproductivo para la producción de carne y leche. In: **Reproducción Ovina y Caprina**, E.G. Aisen (Ed), Cap. 4, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Montoro, V., Garde, J., Pons, P., González-Bulnes A. e López-Sebastián, A., (2007). Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. **Small Ruminant Research**, 71, 117-122.
- 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..
- Goodman, R.L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: **The Physiology of Reproduction**. Knobil E, Neill JD (Eds.), Raven Press, New York. 2ª edición, vol. 2, págs. 659-709.
- Gordon, I., (1997). Controlled reproduction in sheep and goats, **CABI Publishing University Press**, Cambridge, Reino Unido, 450 pp..
- Granados, L. B. C.; Dias, A. J. B.; Sales, M. P., (2006). Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. **Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos**. 1ª ed. Campos dos Goytacazes. Projeto PROEX/UENF.
- Greyling, J., (2010). Applied Reproductive Physiology. In **Solaiman S.G., 2010. Goat Science and Production**. 1st Edition. Wiley-Blackwell. Iowa, USA. 425 pp.
- Hafez, E. S. E. & Hafez, B., (2004). **Reprodução Animal**. 7ª ed. Editora Manole Ltda. Brasil. 513 pp.

- Halbert. GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. (1990) The structure of the cervical canal of ewe. **Theriogenology**, 33, 977-992.
- Halloran, B. P., & DeLuca, H. F. (1980). Effect of vitamin D deficiency on fertility and reproductive capacity in the female rat. **The Journal of Nutrition**, 110(8), 1573-1580.
- Hart, S. (2008). Nutrição de carne de cabra. Páginas 58-83 In: **Proc. 23ª Ann. Dia do campo de cabras**, Langston Universidade, Langston, OK.
- Hashem, R. M., Hassanin, K. M., Rashed, L. A., Mahmoud, M. O., & Hassan, M. G. (2016). Effect of silibinin and vitamin E on the ASK1-p38 MAPK pathway in D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatotoxicity. **Experimental biology and medicine**, 241(11), 1250-1257.
- Henke. A, Gromoll J. (2008). New insights into the evolution of chorionic gonadotrophin. **Mol Cell Endocrinol.**;291(1-2):11-9.
- INE. (2011). Recenseamento Agrícola 2009-Análise dos principais resultados. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, i.p.
- INE. (2017). Estatísticas Agrícolas 2016. Instituto Nacional de Estatística, Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, i.p.
- Júnior, A. F. M., Braga, A. P., dos Santos Rodrigues, A. P. M., & de Sales, L. E. M. (2011). Vitaminas: uma abordagem prática de uso na alimentação de ruminantes. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, 6(4).
- Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, Paz P, 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, 18761883.
- Karikari, P.K. e Blasu, E.Y., (2009). Influence of nutritional flushing prior to mating on the performance of West African Dwarf goats mated in the rainy season. **Pakistan Journal of Nutrition**, 8 (7), 1068-1073.
- Karjnicakova, M., Kovac, G., Kostecky, M., Valocky, I., Marace, I., Sutiakova, I., Lenhardt, L., (2003). Selected clinical-biochemical parameters in the puerperal period of goats. **Bull. Vet. Inst. Pulawy** .47, 177-182.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J., Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, 40: 185-232.
- Kashinakunti, V., Sunitha, H., Gurupadappa, K., Shankarprasad, D.S., Suryaprakash, G., Ingin, J.B., (2010). Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. **Al Ameen. J. Med. Sci.** 3, 38-41.
- Keisler, D.H. (1991). Sheep Reproductive Management and Artificial Insemination Clinic. June 25 and 26, Columbia Missouri. University of Missouri Columbia, Licon University, Missouri Sheep Merchandizing Council, Missouri Sheep Producers.
- Khan, T.H., Hastie, P.M., Beck, N.F.G. e Khalid, M. (2003). hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. **Anim Reprod Sci**, 76, 81-89.
- Killeen ID, Caffery GJ. (1982): Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Aust Vet J.** 59, 95.

- Kukovics, S., Gyökér, S., Németh, T. e Gergátz, E., (2011). Artificial insemination of sheep – possibilities, realities and techniques at the farm level. *In: Veterinary Medicine and Science*, M. Manafi (Ed.), Cap 3, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Leão, A.S.M., (2018). Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial de cabras da raça Serrana – Ecótipo Transmontano. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 50 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- 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.
- Leboeuf, B., Restall, B. e Salamon, S., (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 62, 113-141.
- Letelier, C.A., Contreras-Solis, I., García-Fernández, R.A., Sánchez, M.A., García-Palencia, P., Sánchez, B., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Flores, J.M. e Gonzalez-Bulnes, A., 2011. Effects of oestrus induction with progestagens or prostaglandin analogues on ovarian and pituitary function in sheep. *Animal Reproduction Science*, 126, 61-69.
- Liu, N. Q., & Hewison, M. (2012). Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), 37-47.
- López-Sebastián, A., González-Bulnes, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Díaz-Delfa, C., Santiago-Moreno, J. e Gómez-Brunet, A., (2007). New estrus synchronization and artificial insemination protocol for goats based on male exposure, progesterone and cloprostenol during the non-breeding season. *Theriogenology*, 68, 1081-1087.
- Lorenzen, M., Boisen, I. M., Mortensen, L. J., Lanske, B., Juul, A., & Jensen, M. B. (2017). Reproductive endocrinology of vitamin D. *Molecular and cellular endocrinology*, 453, 103-112.
- MADRP. (2007). Anuário Pecuário de 2006/7. Gabinete de Planeamento e Políticas. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Castel-Publicações e Edições, sa.
- Magalhães, L. C., Nogueira, D. M., & LOPES JÚNIOR, E. S. (2013). Fertilidade de cabras Saanen, quando submetidas à inseminação artificial e à sincronização do estro com reutilização do dispositivo interno de libertação controlada de progesterona (CIDR). Embrapa Semiárido-**Artigo em periódico indexado** (ALICE).
- Martemucci G, D'Alessandro AG. (2011). Induction/synchronization of oestrus and ovulation in dairy goats with different short term treatments and fixed time intrauterine or exocervical insemination system. *Anim Reprod Sci*. 126(3-4):187-94.
- Mascarenhas, R. & Simões, J., (2005). Inseminação artificial em caprinos de raças autóctones. *ANCABRA*, 7, 11-14.
- Mascarenhas, R., (2006). Melhoramento da eficiência reprodutiva em caprinos de raças nacionais. *In: I Jornadas Nacionais de Caprinocultura*, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 51-65.
- Mateus, O.J.P., (2014). Controlo reprodutivo em ovelhas Awassi x Sarda. Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 44 pp.. *Dissertação de Mestrado*.

- Maxwell, W.M.C., e Watson, P.F., (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, 42(1), 55-65.
- McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K. e Samuelsson, B., (1972). Prostaglandin F₂ α identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nat New Biol**, 238, 129-134.
- McDowell, L. R., Williams, S. N., Hidioglou, N., Njeru, C. A., Hill, G. M., Ochoa, L., & Wilkinson, N. S. (1996). Vitamin E supplementation for the ruminant. **Animal Feed Science and Technology**, 60(3-4), 273-296.
- Menchaca, A., A. Pinczak and D. Queirolo. (2005). Storage of ram semen at 5oC: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. **Anim. Reprod.**, 2: 195-198.
- Mian, A. A., Nasim, Z., Shakoor, A., & Qureshi, M. S. (1990). Effect of dilution of fowl semen with normal saline on the fertility of RIR hens through artificial insemination. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, 11(3), 201-204.
- Miranda Do Vale, J., (1949). **Gado Bissulco, Livraria Sá da Costa**, Lisboa.
- Mora, J.R., Iwata, M., Von Andrian, U.H., (2008). Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take center stage. **Nat. Rev. Immunol.** 8, 685–698.
- Moraes, J.C.F., Souza, C.J.H., Gonçalves, P.B.D., (2003). Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**, P.B.D. GONÇALVES, J.R. FIGUEIREDO e V.J.F. FREITAS (Eds), Cap. 3, Editora Varela, São Paulo, Brasil, 340 pp..
- Morrell, J.M., (2011). Artificial insemination: current and future trends. In: Artificial insemination in farm animals, M. Manafi (Ed), **InTech, Rijeka**, Croácia, 300 p..
- Morello, H.H. e Chemineau, P., 2004. Características anatómicas y funcionales del sistema reproductor de la hembra. In: **Reproducción Ovina y Caprina**, E.G. Aisen (Ed), Cap. 2, Intermédica Editora, São Paulo, Brasil, 216 pp..
- Moura, D.S., Lourenço, T.T., Moscardini, M.M., Scott, C., Fonseca, P.O. e Souza, F.F., (2011). Aspectos morfológicos da cervice de ovelhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31 (Suppl 1), 33-38.
- Mylne, M. J. A., Hunton, J. R., Buckrell, B. C., & Marsh, D. J. (1997). Artificial insemination of sheep. Current therapy in large animal theriogenology. **Philadelphia: Saunders**, 585-94.
- Naim, P., Cueto, M., e Gibbons, A., (2009). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. **Archivos de Zootecnia**, 58(223), 435-440.
- Nascimento, P. M., Alberti Morgado, A., Rocha Nunes, G., Nikolaus, J. P., Alves Weigel, R., Silva Lima, A., ... & Araripe Sucupira, M. C. (2015). Metabolismo oxidativo e perfil bioquímico de ovelhas santa inês no período periparto: efeito da suplementação parenteral com vitamina E. **Semina: Ciências Agrárias**, 36(3).
- Neto, B.M.C., (2009). Sincronização da ovulação utilizando hormona folículo estimulante em substituição a gonadotropina coriônica em ovelhas Santa Inês. Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil, 49 pp..
- Neto, V., & Martins, A. (2013). Inseminação artificial em cabras leiteiras com estro induzido e sincronizado por bioestimulação (efeito macho). *Tese de Doutorado*.

- Neves, J. P., Nunes, J. F., Moraes, J. C. F., Souza, C. J. H., Salgueiro, C. C. M., Almeida, J. L. (2008). Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: Gonçalves, P. B. D., Figueredo, J. R., Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2º ed. São Paulo: Ed. Roca. P. 395.
- O'Brein, A., (2002). Flushing the ewe flock: Is it beneficial. *In: Animal Science FactSheets*, Ministério da Agricultura e Alimentação, Ontário, Canadá, 2 pp.
- O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Vans, A.C.O. e Lonergan, O., (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, **73**, 541-549.
- Okada, M., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2001). Estradiol-dependency of sexual behavior manifestation at the post-LH surge period in ovariectomized goat. **Journal of Reproduction and Development**, 44(1), 53-58.
- Osuagwuh, A.I.A., (1992). Effects of strategic feed supplementation during pregnancy on birth weight and perinatal survival of West African Dwarf kids. **J. Agric. Sci.(Camb.)** 119, 123–126.
- Osuagwuh, A.I.A., Aire, T.A., (1990). Intra uterine growth rates of the West African dwarf goats and some fetal organs in relation to strategic feed supplementation during pregnancy. **J. Vet. Med.** 37, 198–204.
- Osuagwuh, A.I.A., Akpokdje, J.U., (1986). An outbreak of abortion in WAD (Fouta djallon) goats due to malnutrition. **Trop. Vet.** 4, 67–70.
- OVIBEIRA, Associação de Produtores Agropecuários. (2017). Livros Genealógicos – Cabra Charnequeira. Acendido a 09 de Novembro de 2017 em: <http://ovibeira.wixsite.com>
- Palacios, C. e Abecia, J.A., (2015). Meteorological variables affect fertility rate after intrauterine artificial insemination in sheep in a seasonal-dependent manner: A 7-year study. **International Journal of Biometeorology**, 59, 585-592.
- Palacios, C.R., (2010). Manejo del semen e inseminación artificial. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia e F.M. Forcada (Eds), SERVET, Saragoça Espanha, 195 pp..
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., & Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. **Physiological reviews**, 92(3), 1235-1316.
- Purdy, P. A review on goat sperm cryopreservation. (2006). **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215–225.
- Raposo, A.F.R., (2011). Utilização da modulação do fotoperíodo e da suplementação lipídica sobre o efeito macho na indução e sincronização do estro em caprinos. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. *Dissertação de mestrado*.
- 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 hyperstimulation. **Journal of human reproductive sciences**, 6(4), 227.
- Roa J, Tena-Sempere M. (2010). Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. **Trends Endocrinol Metab** 21: 519 –528.

- 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.
- Rosa, A. P. (2013). **Raça Algarvia, Em Raças Autóctones Portuguesas** (Direção Geral de Alimentação e Veterinária, eds.). Portugal: Direção Geral de Alimentação e Veterinária.
- Rubianes, E. ; De Castro, T. ; Kmaid, S, (1998). Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anoestrus goats. **Theriogenology**, v. 49, p. 354, 1998, Abstract.
- Rubianes, E., (2000). Control farmacológico del ciclo estral en caprinos y ovinos. In: **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, P.S. BARRUSELI e E.H. MADUREIRA (Eds), São Paulo, Brasil, 332 p..
- Rubianes, E., Menchaca, A. e Carbajal, B., (2003). Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . **Anim Reprod Sci**, 78, 47-55.
- Sacoto, S.M.R., 2012. Seasonality of reproduction in Churra da Terra Quente ewes: out-of-season breeding. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 152 p. (*PhD Thesis*)
- Safari, J., Kifaro, G.C., Mushi, D.E., Mtenga, L.A., Adnøy T. e Eik, L.O., 2012. Influence of flushing and season of kidding on reproductive characteristics of Small East African goats (does) and growth performance of their kids in a semi-arid area of Tanzania. *African Journal of Agricultural Research*, 7 (35), 4948-4955. Salamon, S.; Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 77–111.
- Salvador, I., Yániz, J., Viudes-de-Castro, M. P., Gómez, E. A., & Silvestre, M. A. (2006). Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 C. **Theriogenology**, 66(4), 974-981.
- Santolaria, P., Yániz, J., Fantova, E., Vicente-Fiel, S. e Palacín, I., (2014). Climate factors affecting fertility after cervical insemination during the first months of the breeding season in Rasa Aragonesa ewes. **International Journal of Biometeorology**, 58, 1651-1655.
- Scaramuzzi, R.J. e Martin, G.B., (2008). The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reprod Dom Anim**, 43 (Suppl 2), 129-36.
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M. e Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reprod Nutr Dev**, 46 (4), 339-354.
- Shahrokhi, S. Z., Ghaffari, F., & Kazerouni, F. (2016). Role of vitamin D in female reproduction. **Clinica chimica acta**, 455, 33-38.
- Sibanda, L.M., Ndlovu, L.R., Bryant, M.J., (1997). Effects of feeding varying amount of grain/forage diet during late gestation and lactation on the performance of Matabele goats. **J. Agric. Sci.** 128, 469–477.
- Sicherle, C.C., (2005). **Fisiologia da ovulação e controle ovulatório em ovelhas**. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil, 21 pp..

- Simões, J.; Mascarenhas, R.; Baril, G., (2008). Inseminação artificial em caprinos. **E-Book para técnicos de expressão Portuguesa**.
- Siqueira, A. P., da Fonseca, J. F., Silva Filho, J. M., Bruschi, J. H., Viana, J. H. M., Palhares, M. S., ... & Peixoto, M. P. (2009). **Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo**. Embrapa
- Sisk, C.L., Foster, D.L. (2004). The neural basis of puberty and adolescence. **Nature Neuroscience**, 7: 1040-1047.
- Smith, O. B., & Akinbamijo, O. O. (2000). Micronutrients and reproduction in farm animals. **Animal Reproduction Science**, 60, 549-560.
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., (1980). **Statistical methods**. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- Sohnrey B, Holtz W. (2005). Technical Note: Transcervical deep cornual insemination of goats. **J Anim Sci**;83(7):1543-8.
- Souza, A. F., Guerra, M. M. P., Coletto, Z. F., Mota, R. A., da Silva, L. B. G., de Souza Leão, A. E. D., & do Nascimento Sobrinho, E. S. (2006). Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 43(3), 329-336.
- SPREGA, Sociedade Portuguesa de Recursos Genéticos Animais. (2017). Caprinos – Raça Bravia/ Raça Algarvia. Acendido a 09 de Novembro de 2017 em: <http://www.sprega.com.pt/>
- Steel, R.G.D. e Torrie, J.H., (1980). **Principles and procedures of statistics**. 2ª Edição, McGraw-Hill Company, Nova Iorque, EUA, 633 pp..
- Stephensen, C.B., (2001). Vitamin A, infection, and immune function. **Annu. Rev. Nutr.** 21, 167–192.
- Steyn, J.J., (2003). Application of artificial insemination (AI) on commercial sheep and goat production. *In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 2. Simpósio Internacional sobre Agronegócio da Caprinocultura Leiteira*. EMEPA-DA, João Pessoa, Brasil, 367-379.
- Suguna, K., Mehrotra, S., Agarwal, S.K., Hoque, M., Singha, S.K., Shankera, U. e Saratha, T., (2008). Early pregnancy diagnosis and embryonic and fetal development using real time B mode ultrasound in goats. Technical note. **Small Ruminant Research**, 80, 80-86.
- Swanson, K.S., Kuzmuk, K.N., Schook, L.B., Fahey Jr., G.C., (2004). Diet affects nutrient digestibility, haematology, and serum chemistry of senior and weanling dogs. **J. Anim. Sci.** 82, 1713–1724.
- Thimonier, J., Cognié, Y., Lassoued, N. e Khaldi, G., (2000). The male effect in sheep: a current technique for controlling reproduction. **INRA Prod Anim**, 13 (4), 223-231.
- Turri, F., Kandil, O.M., Abdoon, A.S., Sabra, H., El Atrash, A. e Pizzi, F., 2013. Conservation of camel genetic resources: epididymal sperm recovery. In: Camel Conference @ SOAS, Londres, Reino Unido. (Poster)

- Ungerfeld, R. e Rubianes, E., 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, 46 (1), 63-66.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., (2016a). Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 4. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos naturais. **Agrotec**, 17, 19-23.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S. e Azevedo, J., (2016b). Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 5. Controlo da atividade reprodutiva em pequenos ruminantes – métodos hormonais. **Agrotec**, 18, 25-28.
- Valentim, R., Rodrigues, I., Montenegro, T., Sacoto, S., Azevedo, J. e Gomes, M.J., (2016c). Maneio reprodutivo em ovinos e caprinos. 7. Inseminação artificial em ovinos e caprinos. **Agrotec**, 21, 10-13.
- Valentim, R., Maurício, R., Correia, T., (2014). Caracterização reprodutiva das cabras Serranas, ecótipo Transmontano. In: Acta da III Reunião Nacional de Caprinicultores CAPRA 2014, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 64-69.
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., y Correia, T., (2009). Anticipación de la estación reproductiva en ovejas de la raza Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial. In: **34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia**, Barbastro, Espanha, 403-407.
- Valentim, R.C.; Correia, T.M.; Azevedo, J.M., (2006). Utilização de implantes de melatonina em ovinos. **Albóitar Portuguesa**, 2 (6), 18-22.
- Valentim, R.C., (2004). Estudo da sazonalidade sexual em carneiros da raça Churra Galega Bragançana. Aplicação de dois tratamentos – luz e melatonina. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 225 pp.. (PhD Thesis)
- Vichas, L., Tsakmakidis, I.A., Vafiadis, D., Tsousis, G., Malama E., e Boscos, C.M., (2017). The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. **Cell Tissue Bank**, online, 1-9.
- Vieira, L. M. C. (2015). Estudo de viabilidade económica de uma exploração de caprinos de leite. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Castelo Branco. *Tese de Doutoramento*.
- Villaquiran, M., Gipson, T.A. Merkel, R.C., Goetsch, A.L. e Sahl, T., (2004). Body condition scores in goats. **American Institute for Goat Research**, Langston University, Langston, EUA, 8 pp..
- Vitaliano, A., B., (2011). Avaliação do comportamento reprodutivo caprino e ovino com o uso do efeito macho interespecie. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. *Dissertação mestrado*.
- Von Reinhold G, Rommel W, Schulz J: (1987). Investigations on the anatomical structure of the cervix uteri of the merino meat sheep under the aspect of artificial insemination.. **Mh Vet-Med**, 42, 364-368.
- Walters, M. R. (1981). An estrogen-stimulated 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat uterus. **Biochemical and biophysical research communications**, 103(2), 721-726.

- Walters, M. R., Cuneo, D. L., & Jamison, A. P. (1983). Possible significance of new target tissues for 1, 25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of steroid biochemistry**, 19(1), 913-920.
- Watson, P. F., (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60, 481-492.
- Yao, S., Kwan, M. L., Ergas, I. J., Roh, J. M., Cheng, T. Y. D., Hong, C. C., ... & Quesenberry, C. P. (2017). Association of serum level of vitamin D at diagnosis with breast cancer survival: a case-cohort analysis in the pathways study. **JAMA oncology**, 3(3), 351-357.
- Yokus, B., Cakir Du Kanay, Z., Gulden, T., Uysal, E., (2006). Effects of seasonal and physiological variations on the serum chemistry, vitamins and thyroid hormone concentrations in sheep. **J. Vet. Med.** 53, 271–276.
- Yotov, S.A., Velislavova, D.V. e Dimova, L.R., (2016). Pregnancy rate in Bulgarian White milk goats with natural and synchronized estrus after artificial insemination by frozen semen during breeding season. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, 5 (2), 144-147.