



# UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

Instituto Superior de Agronomia



## EFEITO DA MELATONINA EM CARACTERES REPRODUTIVOS DE CARNEIROS DAS RAÇAS MERINA PRETA E CAMPANIÇA

*Ricardo Jorge da Costa Trindade Palmeiro Romão*

Constituição do Júri:

Orientador Científico:

Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt

2002

LISBOA

**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA**

**Faculdade de Medicina Veterinária    Instituto Superior de Agronomia**

**EFEITO DA MELATONINA EM CARACTERES  
REPRODUTIVOS DE CARNEIROS DAS RAÇAS MERINA  
PRETA E CAMPANIÇA**

**Dissertação de Mestrado em Produção Animal**

*Ricardo Jorge da Costa Trindade Palmeiro Romão*

**Constituição do Júri:**

**Orientador Científico:**

**Doutor Carlos Manuel Varela Bettencourt**

**2002**

**LISBOA**

## RESUMO

Pretendemos determinar o efeito da melatonina em características reprodutivas de carneiros das raças Merina Preta (MP) e Campaniça (C). Carneiros MP não receberam qualquer tratamento (GPC; n=6) ou foram tratados com três implantes sub-cutâneos de melatonina (GPT; n=6) tal como um grupo de carneiros C (GCT; n=7). A aplicação da melatonina foi realizada em Março. Num primeiro ensaio, durante treze semanas, avaliaram-se em todos os carneiros o perímetro testicular e características seminais (volume, concentração, mobilidade individual, coloração vital, teste de endosmose e anomalias espermáticas). Não se encontraram diferenças significativas entre animais tratados e não-tratados e entre as duas raças. Notaram-se diferenças significativas ( $p<0,001$ ) entre algumas semanas no perímetro testicular, concentração, mobilidade individual e coloração vital. Na avaliação do sémen a correlação positiva encontrada entre a mobilidade individual e a coloração vital foi a mais elevada ( $r=0,64$ ;  $p<0,001$ ). Num segundo ensaio congelou-se sémen em dois períodos (antes e após o efeito esperado da melatonina). As provas para avaliação (em fresco e à descongelação) foram a mobilidade individual, a coloração vital e a endosmose. Não houve diferenças significativas na fertilidade obtida entre carneiros tratados ou não e entre raças. Os resultados da coloração vital do sémen em fresco foram os únicos significativos ( $p<0,05$ ). Houve diferenças significativas ( $p<0,05$ ) na fertilidade dos carneiros MP entre o primeiro e segundo período de congelação diagnosticada por ecografia (42,6% vs. 14,4%). Com base nos resultados concluímos que o tratamento com melatonina a carneiros das raças MP e C não conduziu a alterações nas características reprodutivas avaliadas, possivelmente por estas raças serem pouco sazonais na latitude do Sul de Portugal.

**Palavras-chave:** Carneiro, Campaniça, Melatonina, Merina Preta, Sazonalidade, Sémen.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the effect of melatonin in reproductive characteristics of Merino Preto (MP) and Campaniça (C) breed rams. MP rams were either not treated (GPC; n=6), or treated (GPT; n=6) with melatonin implants (three per ram). A group of C rams (GCT; n=7) received also melatonin implants. The administration of melatonin was performed in March. Ram's scrotal circumference and sperm characteristics (volume, concentration, individual motility, supravital stain, HOST-test and sperm morphology) were evaluated in a first study over a thirteen weeks period. We observed no differences between treated and not-treated rams and between breeds. There were statistical differences ( $p<0,001$ ) in scrotal circumference, concentration, sperm motility and supravital stain test among week periods. Semen evaluation data revealed a positive correlation between individual motility and vital staining ( $r=0,64$ ;  $p<0,001$ ). In a second study, semen was frozen in two distinct periods (before and after the expected effect of melatonin). The evaluation tests performed (in fresh semen and after thawing) were sperm motility, vital staining and HOST-test. No differences were found in fertility rates in treated or control rams and between breeds. Only the supravital stain test was significant ( $p<0,05$ ). There were differences in MP ram fertility (ultrasound pregnancy diagnosis) between the first and the second freezing period ( $p<0,05$ ; 42,6% vs. 14,4%). These data suggest that melatonin administration to MP and C rams did not affect the reproductive characteristics evaluated. This maybe due to the lower seasonality exhibited by these breeds at the latitude of Southern Portugal.

**Key-words:** Campaniça, Melatonin, Merina Preta, Ram, Seasonality, Semen.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Doutor Carlos Bettencourt, por aceitar a orientação deste trabalho e pela disponibilidade sempre manifestada.

Ao Doutor Claudino Matos pelo precioso auxílio, sobretudo no tratamento estatístico dos dados.

Ao Professor Doutor Luis Lopes da Costa por aceitar ser Tutor deste trabalho.

À Direcção Regional de Agricultura do Alentejo na pessoa do Dr. João Fialho, Director do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, pela disponibilização dos meios principais necessários á execução do trabalho.

A todo o pessoal do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, que demonstrou sempre assinalável profissionalismo.

Ao Dr. Nestor Chagas e Silva e à D. Cremilde pelos ensinamentos e auxílio preciosos.

À CEVA, pela cedência de fármacos de melatonina utilizados no trabalho.

À Elisa, pela amizade, pelo empenho e dedicação a este trabalho e cuja colaboração foi essencial à realização do mesmo.

À Dra. Maria de Lurdes Bettencourt, pela forma carinhosa e amiga com que sempre recebeu as minhas incursões a Serpa.

Ao Zé e à Nélia, pela longa amizade, que foi mais uma vez reforçada.

À Xana, pela paciência e compreensão ao longo do tempo do trabalho.

A meus pais, Guida e Joaquim, ao Nuno e a meus avós pelo apoio e aconselhamentos de sempre.

Finalmente, àqueles que, embora não referidos, contribuíram directa ou indirectamente para este trabalho.

## **ENQUADRAMENTO EM PROJECTOS DE INVESTIGAÇÃO**

Os dados do presente trabalho foram conseguidos através do acompanhamento do Projecto de Demonstração AGRO nº 76 dedicado ao desenvolvimento de um Programa de Conservação Genética para as raças ovinas Merina Preta e Campaniça e para a raça caprina Serpentina, cuja coordenação estava a cargo do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, da Direcção Regional de Agricultura do Alentejo.

# ÍNDICE

Índice de Tabelas .....	vi
Índice de Gráficos.....	ix
Abreviaturas usadas.....	x

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
1 .1 Anatomia e Fisiologia Reprodutiva do carneiro .....	1
1 .1.1 Endocrinologia reprodutiva do carneiro .....	3
1 .2 Recolha de sémen .....	4
1 .2.1 Colheita por electroejaculação .....	5
1 .2.2 Colheita por vagina artificial .....	6
1 .3 Avaliação do sémen.....	7
1 .3.1 Características macroscópicas do sémen.....	8
1.3.1.1 Volume .....	8
1.3.1.2 Cor e cheiro .....	9
1.3.1.3 Consistência ou densidade.....	9
1 .3.2 Características microscópicas do sémen.....	9
1.3.2.1 Concentração .....	9
1.3.2.2 Mobilidade massal e individual.....	10
1.3.2.3 Testes de funcionalidade .....	12
1.3.2.4 Coloração vital .....	13
1.3.2.5 Teste de endosmose.....	13
1.3.2.6 Morfologia.....	16
1 .4 Anatomia e fisiologia reprodutiva na ovelha.....	17
1 .4.1 Endocrinologia na ovelha .....	17
1 .5 Sazonalidade reprodutiva em pequenos ruminantes.....	20
1 .5.1 Modulação da actividade reprodutiva nos ovinos pelo fotoperíodo .....	20

1 .5.2 Sazonalidade reprodutiva em ovinos machos.....	22
1 .5.3 Regulação hormonal da sazonalidade reprodutiva .....	25
1 .5.4 Manipulação da actividade reprodutiva pela luminosidade.....	26
1 .5.5 Manipulação da sazonalidade reprodutiva com recurso à melatonina .....	30
1 .6 Conservação de sémen e outras tecnologias reprodutivas em ovinos .....	35
1 .6.1 Sémen refrigerado .....	35
1 .6.2 Sémen congelado.....	37
1.6.2.1 Descongelção do sémen.....	42
1.6.2.2 Avaliação do sémen à descongelção.....	42
1 .6.3 Sincronização deaios para inseminação artificial .....	44
1 .6.4 Métodos de inseminação artificial.....	47
1.6.4.1 Inseminação vaginal .....	48
1.6.4.2 Inseminação cervical .....	48
1.6.4.3 Inseminação transcervical .....	49
1.6.4.4 Inseminação intrauterina .....	50
1.6.4.4.1 Técnica de inseminação laparoscópica .....	52
1 .6.5 Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes.....	54
 <b>2. EFEITO DO TRATAMENTO COM IMPLANTES DE MELATONINA EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CARNEIROS DA RAÇA MERINA PRETA E CAMPANIÇA .....</b>	<b>57</b>
2 .1 Resumo .....	57
2 .2 Introdução .....	58
2 .3 Materiais e métodos.....	60
2 .3.1 Colheita de sémen.....	62
2 .3.2 Avaliação de parâmetros reprodutivos .....	62
2 .3.3 Modelo estatístico.....	64
2 .4 Resultados.....	65
2 .5 Discussão e conclusões.....	74



### **3. EFEITO DO TRATAMENTO COM IMPLANTES DE MELATONINA NA FERTILIDADE DE SÉMEN CONGELADO DE CARNEIROS DA RAÇA MERINA PRETA E CAMPANIÇA .....77**

3 .1 Resumo .....	77
3 .2 Introdução .....	78
3 .3 Material e métodos .....	81
3 .3.1 Colheita e avaliação do sémen .....	82
3 .3.2 Congelação de sémen .....	83
3 .3.3 Avaliação do sémen após descongelação .....	84
3 .3.4 Inseminação artificial .....	84
3 .3.5 Diagnóstico de gestação e resultados da parição.....	85
3 .3.6 Tratamento estatístico.....	86
3 .4 Resultados.....	86
3 .5 Discussão e conclusões.....	91

### **4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA .....95**

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-1: Escala de avaliação da densidade (adaptado de Evans e Maxwell, 1987; Shamsuddin <i>et al.</i> , 2000). .....	9
Tabela 1-2: Sistema de classificação para mobilidade massal do sémen ovino (adaptado de Nelson e Lin, 1983; Evans e Maxwell, 1987; Chemineau <i>et al.</i> , 1991; Mylne <i>et al.</i> , 1997). .....	11
Tabela 2-1: Composição química do meio BL-1 (Pursel <i>et al.</i> , 1972, citado por Ferreira <i>et al.</i> , 2001). .....	63
Tabela 2-2: Estatísticas descritivas para os vários parâmetros avaliados nos carneiros de raça Merina Preta, tratados e não-tratados com melatonina (GPT vs. GPC) durante as 13 semanas de ensaio. ....	65
Tabela 2-3: Estatísticas descritivas para os vários parâmetros avaliados nos carneiros tratados com melatonina das raças Merina Preta e Campaniça (GPT vs. GCT) durante as 13 semanas de ensaio. ....	65
Tabela 2-4: Graus de liberdade (GL), valores de F e respectiva significância para os vários parâmetros avaliados na raça Merina Preta (GPT vs. GPC), com base nos vários factores que, neste caso, são a presença ou não de implante de melatonina e a semana de colheita. Indica-se também a variância devida ao carneiro e ao resíduo e os graus de liberdade do resíduo. ....	66
Tabela 2-5: Graus de liberdade (GL), valores de F e respectiva significância para os vários parâmetros avaliados em todos os animais tratados com implantes de melatonina (GPT vs. GCT), com base nos vários factores que, neste caso, são a raça e a semana de colheita. Indica-se também a variância devida ao carneiro e ao resíduo e os graus de liberdade do resíduo. ....	66
Tabela 2-6: Médias dos mínimos quadrados $\pm$ erro padrão para os vários caracteres em função do tratamento e da semana para os carneiros de raça Merina Preta, tratados e não tratados com melatonina (GPC vs. GPT). Médias com as mesmas letras não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). .....	67
Tabela 2-7: Médias dos mínimos quadrados $\pm$ erro padrão para os vários caracteres em função da raça e da semana para os animais tratados com melatonina de raça Merina Preta e Campaniça (GPT vs. GCT). Médias com as mesmas letras não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ). .....	68
Tabela 2-8: Estatística descritiva para os vários parâmetros avaliados em todos os carneiros (GPT, GPC e GCT) durante as 13 semanas de ensaio. ....	72

Tabela 2-9: Correlações entre os vários parâmetros avaliados em todos os carneiros (GPC, GPT e GCT) e número de observações (n). Indicam-se os valores estatisticamente significativos para $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*).	73
Tabela 3-1: Composição química do meio BL-1 (Pursel <i>et al.</i> , 1972, citado por Ferreira <i>et al.</i> , 2001).	83
Tabela 3-2: Composição do diluidor Triladil®	83
Tabela 3-3: Análise de variância para a raça Merina Preta (GPC <i>vs.</i> GPT) em função dos vários factores e provas avaliados na altura da recolha de sémen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo ( $R^2$ ), o coeficiente de variação e ainda a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia (ECO) ou no parto.	87
Tabela 3-4: Análise de variância para a raça Merina Preta (GPC <i>vs.</i> GPT) em função dos vários factores e provas avaliados após descongelação do sémen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo ( $R^2$ ), o coeficiente de variação e a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia ou no parto.	87
Tabela 3-5: Análise de variância para os animais tratados das duas raças (GPT <i>vs.</i> GCT), em função dos vários factores e provas avaliados na recolha de sémen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo ( $R^2$ ), o coeficiente de variação e a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia ou no parto.	88
Tabela 3-6: Análise de variância para os animais das duas raças (GPT <i>vs.</i> GCT), em função dos vários factores e provas avaliados após descongelação do sémen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo ( $R^2$ ), o coeficiente de variação e a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia ou no parto.	88
Tabela 3-7: Média dos mínimos quadrados $\pm$ erro-padrão para as taxas de fertilidade por ecografia ou ao parto, considerando como covariável o teste de coloração vital efectuado na altura de recolha do sémen. Os valores referem-se aos carneiros de raça Merina Preta, tratados ou não com implantes de melatonina (GPC <i>vs.</i> GPT), cujo sémen foi congelado em dois períodos (1 e 2). Médias com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).	89
Tabela 3-8: Média dos mínimos quadrados $\pm$ erro-padrão para as taxas de fertilidade por ecografia ou ao parto, considerando como covariável o teste de coloração vital efectuado na altura de recolha do sémen. Os valores referem-se aos carneiros tratados com implantes de melatonina, de raça Merina Preta (GPT) ou Campaniça (GCT), cujo sémen foi congelado em dois períodos (1 e 2).	89

Tabela 3-9: Número de observações, valores máximos, mínimos, média  $\pm$  desvio padrão e coeficiente de variação para as provas de mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose antes da congelação e após descongelação do sémen de todos os carneiros de raça Merina Preta e Campaniça (GPC, GPT e GCT)..... 90

Tabela 3-10: Correlações entre as provas de mobilidade individual, coloração vital e endosmose, realizadas na altura da recolha de sémen ou após descongelação das minipalhinhas, para todos os carneiros das raças Merina Preta e Campaniça (GPC, GPT e GCT). Indicam-se os valores estatisticamente significativos para  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*). ..... 90

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 2-1: Médias dos mínimos quadrados para o perímetro testicular ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs.GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7 .....	69
Gráfico 2-2: Médias dos mínimos quadrados para o volume ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7. ....	69
Gráfico 2-3: Médias dos mínimos quadrados para a concentração ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs.GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7. ....	70
Gráfico 2-4: Médias dos mínimos quadrados para a mobilidade individual ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7. ....	70
Gráfico 2-5: Médias dos mínimos quadrados para a coloração vital ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7. ....	71
Gráfico 2-6: Médias dos mínimos quadrados para o teste de endosmose ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7. ....	71
Gráfico 2-7: Médias dos mínimos quadrados para a percentagem de células anormais ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7. ....	72

## ABREVIATURAS USADAS

<b>ABP</b>	androgen-binding protein	<b>LH</b>	luteinizing hormone
<b>AMPc</b>	adenosina monofosfato cíclica	<b>MAP</b>	acetato de medroxiprogesterona
<b>ARIC</b>	acrosome reaction following ionophore challenge	<b>mg</b>	miligrama
<b>ASMA</b>	automated sperm morphology analysis	<b>MHz</b>	megahertz
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato	<b>min</b>	minuto
<b>CASA</b>	computer automated semen analyzer	<b>ml</b>	mililitro
<b>cm</b>	centímetro	<b>mm</b>	milímetro
<b>CIDR</b>	controlled internal drug release dispenser	<b>mOsm</b>	miliosmole
<b>CREM</b>	cAMP responsive element modulator	<b>NAT</b>	N-acetiltransferase
<b>eCG</b>	equine chorionic gonadotrophin	<b>ng</b>	nanograma
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization	<b>nm</b>	nanómetro
<b>FGA</b>	acetato de fluorogestona	<b>PGF<sub>2α</sub></b>	prostaglandina F <sub>2α</sub>
<b>FIV</b>	fertilização <i>in vitro</i>	<b>PIF</b>	prolactin –inhibiting factor
<b>FSH</b>	follicle stimulating hormone	<b>pg</b>	picograma
<b>GnRH</b>	gonadotrophin releasing hormone	<b>PMSG</b>	pregnant mare’s serum gonadotrophin
<b>h<sup>2</sup></b>	heritabilidade	<b>PRF</b>	prolactin-releasing factor
<b>hCG</b>	human chorionic gonadotrophin	<b>r</b>	coeficiente de regressão
<b>HOST</b>	hypoosmotic swelling test	<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>IA</b>	inseminação artificial	<b>spz</b>	espermatozóide
<b>ICER</b>	inductible cAMP early repressor	<b>SOD</b>	superóxido-dismutase
<b>IFN-τ</b>	interferão tau	<b>STLS</b>	lauril-sulfato de trietanolamina
<b>IM</b>	intramuscular	<b>TP-1</b>	proteína trofoblástica ovina
<b>IV</b>	intravenoso	<b>TRIS</b>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>kg</b>	quilograma	<b>UHT</b>	ultra-high-temperature
<b>l</b>	litro	<b>UI</b>	unidades internacionais
<b>LDL</b>	low density lipoprotein	<b>VCV</b>	vaginal collection vial
		<b>vs.</b>	<i>versus</i>
		<b>v/v</b>	volume:volume

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Anatomia e Fisiologia Reprodutiva do carneiro

O aparelho reprodutor do macho ovino é composto essencialmente pelos testículos, onde se formam os gametas masculinos (espermatozóides) e pelo pênis e ductos, com funções de transporte do sémen para o exterior. Além destes órgãos existem ainda as glândulas sexuais anexas que, nesta espécie, e por ordem de importância, são as glândulas vesiculares (ou vesículas seminais), a próstata e as glândulas bulbouretrais (ou glândulas de *Cowper*), responsáveis pela produção das secreções que compõem o plasma seminal (Chemineau *et al.*, 1991; Hafez, 2000a).

O processo de formação dos espermatozóides é a espermatogénese, que no carneiro demora, segundo os vários autores, 40 dias (Evans e Maxwell, 1987) ou 46 a 49 dias, desde a activação da espermatogónia totipotente até à libertação do espermatozóide nos túbulos seminíferos (Chemineau *et al.*, 1991; Kimberling e Marsh, 1997; Sharkey *et al.*, 2001). Após esta fase, os espermatozóides atravessam o epidídimo, onde sofrem o processo de maturação, última fase na formação do espermatozóide, ficando aí armazenados. A passagem pelo epidídimo demora alguns dias, sendo referida para o carneiro uma duração de 10 a 14 dias (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Garner e Hafez, 2000; Sharkey *et al.*, 2001).

Os espermatozóides são produzidos no testículo, a uma temperatura 4 a 7°C inferior à temperatura corporal, o que é possível por mecanismos de termorregulação conseguidos por troca de calor entre o sangue arterial e o sangue venoso, por glândulas sudoríparas e pelas contracções da musculatura do próprio escroto (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Hafez, 2000a; Parkinson, 2001a). Por esta razão, quando há aumento de temperatura nos testículos causado por qualquer patologia ou por temperatura ambiente elevada, há diminuição da mobilidade individual e aumento de anomalias espermáticas, resultando num decréscimo da qualidade do sémen (Chemineau *et al.*, 1991). Mesmo que a fertilidade se mantenha para este sémen após a fecundação, aumenta a mortalidade embrionária (Mieusset

*et al.*, 1992). O retorno à normalidade depois destas alterações pode levar entre 50 a 60 dias (Chemineau *et al.*, 1991).

Para que o espermatozóide fecunde o gâmeta feminino, tem que sofrer um processo de maturação, que inclui a aquisição de mobilidade, progressiva perda de água, migração e perda da gota citoplasmática e aquisição de capacidade fecundante. Estes fenómenos ocorrem no epidídimo. A reacção de capacitação e a reacção do acrossoma, que acontecem posteriormente, têm lugar já no tracto reprodutor feminino; a capacidade fecundante do espermatozóide neste local é mantida em condições normais durante 30 a 48 horas (Chemineau *et al.*, 1991).

A capacitação é um fenómeno algo difícil de explicar, mas pensa-se que envolve a remoção de um factor de descapacitação, de colesterol e de proteínas de superfície. A reacção do acrossoma consiste na fusão e vesiculação da membrana plasmática com a membrana acrossómica externa, activando-se as enzimas que possibilitam a penetração no oócito, essencialmente acrosina e hialuronidase (Chemineau *et al.*, 1991; Barrios *et al.*, 2000; Mack *et al.*, 1983 e Yanagimachi, 1988, citados por Risopatrón *et al.*, 2001; Yanagimachi, 1994, citado por Medeiros *et al.*, 2002). Pensa-se que a reacção do acrossoma só ocorre após exposição a temperaturas mais elevadas, isto é, ao passar dos 35°C do epidídimo para o tracto genital feminino onde a temperatura é de cerca de 39°C (Watson *et al.*, 1991).

A maximização de produção de espermatozóides nos testículos é essencial para obter animais de boa aptidão reprodutiva e a avaliação morfológica desta capacidade pode fazer-se através das características testiculares. Land (1973) demonstrou uma correlação genética ( $r=0,97$ ) entre caracteres reprodutivos de machos e fêmeas. Desde essa altura, tem vindo a ser aprofundado o conhecimento acerca dos parâmetros testiculares, sendo o tamanho testicular o carácter morfológico mais usado, já que se verifica uma elevada correlação ( $r=0,75$ ) entre a produção diária de espermatozóides e o peso testicular (Lapwood, 1986; Chemineau *et al.*, 1991; Fitzgerald, 1997), e o perímetro testicular (Evans e Maxwell, 1987; Sharkey *et al.*, 2001). O peso e perímetro testicular estão também correlacionados ( $r=0,53$ ), e este último parâmetro pode ser avaliado *in vivo* (Ashdown e Hafez, 1993).



O perímetro testicular está correlacionado com o potencial de produção espermática pelo carneiro, taxa de fertilidade, idade à puberdade das filhas, taxa de ovulação e número de partos múltiplos (Kimberling e Marsh, 1997; Sharkey *et al.*, 2001; Duguma *et al.*, 2002). É um dos parâmetros mais associados à eficiência reprodutiva, apresentando uma heritabilidade de 0,35 (Kimberling e Marsh, 1997), ou de 0,29 (Duguma *et al.*, 2002), embora Matos e Thomas (1992) refiram que ajustamentos em relação ao peso vivo possam aumentar a heritabilidade. O perímetro testicular está correlacionado com o peso vivo do animal em todas as raças, havendo valores de referência para cada uma (Braun *et al.*, 1980; Bettencourt, 1999). No carneiro adulto o perímetro testicular deve estar acima de 28 cm nas raças pequenas e acima de 34 cm nas raças maiores (Parkinson, 2001b). Duguma *et al.* (2002) afirmam mesmo que os machos com perímetro testicular inferior a 30 cm devem ser refugados.

### **1.1.1 Endocrinologia reprodutiva do carneiro**

A regulação endócrina da reprodução no carneiro centra-se em dois compartimentos orgânicos fundamentais: o eixo hipotálamo-hipofisário e o testículo. Na hipófise são segregadas as gonadotrofinas LH (*luteinizing hormone*) e FSH (*follicle-stimulating hormone*), cuja libertação é estimulada pela GnRH (*gonadotrophin releasing hormone*) produzida a nível hipotalâmico (Hafez *et al.*, 2000). No testículo, a nível das células de *Leydig* existentes no tecido intersticial, é produzida a testosterona, hormona derivada do colesterol, cujos níveis aumentam por estimulação pela LH. A libertação pulsátil desta última ocorre com intervalos irregulares cada 2 a 4 horas, e essa frequência aumenta na estação reprodutiva (Lincoln *et al.*, 1978; Lapwood, 1986; Ebling *et al.*, 1994, citados por Gerlach e Aurich, 2000; Parkinson, 2001a).

A testosterona intervém em várias funções endócrinas no macho, nomeadamente na estimulação da produção de espermatozóides no testículo e posterior maturação no epidídimo e na função das glândulas sexuais acessórias. Influencia ainda as características sexuais masculinas secundárias, como é o caso do comportamento sexual (Reeves, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Bearden e Fuquay, 1997a; Hafez *et al.*, 2000; Parkinson, 2001a). A castração anula manifestações como a agressividade sexual, o *flehmen* e a monta (López, 1991). Os níveis de testosterona inibem a libertação de GnRH, já que no encéfalo ela é aromatizada em estrogénios que, por sua vez, são inibidores da mesma hormona (Bearden e Fuquay, 1997a;

Gerlach e Aurich, 2000; Parkinson, 2001a); em consequência deste *feedback* negativo, reduz-se a secreção de LH. Há ainda outras substâncias que inibem a libertação de GnRH, entre as quais podemos citar os opióides endógenos, como a  $\beta$ -endorfina (Gerlach e Aurich, 2000).

No epitélio seminífero do testículo, existem as células de *Sertoli*, que são estimuladas pela FSH, produzindo ABP (*androgen-binding protein*), cuja acção é captar a testosterona e um derivado da redução desta, a 5-dihidroestenodiona, com um efeito ainda mais potente que a testosterona. Nas células de *Sertoli* é ainda produzida uma outra hormona, a inibina, que juntamente com a testosterona inibe a libertação de FSH (Bearden e Fuquay, 1997a; Parkinson, 2001a).

A prolactina, outra hormona produzida na adenohipófise, tem secreção mais circadiana, com variações sazonais (Lapwood, 1986). A sua libertação é modulada por um factor de libertação (PRF: *prolactin-releasing factor*) e por um factor de inibição (PIF: *prolactin-inhibiting factor*) produzido no hipotálamo (Bearden e Fuquay, 1997a; Hafez *et al.*, 2000). No macho a prolactina participa na regulação da actividade dos tecidos sensíveis aos androgénios, não apresentando qualquer correlação com a regulação da função testicular (Langford *et al.*, 1999; Gerlach e Aurich, 2000).

Vários factores influenciam a produção de gonadotrofinas como a temperatura, o *stress*, doenças e o estado nutricional. O mais importante, no entanto, parece ser o fotoperíodo, conforme se explicará mais adiante. O estado nutricional é também relevante e a subnutrição causa diminuição no perímetro testicular (Thwaites, 1995), o qual está correlacionado com as concentrações de LH, FSH e testosterona (Matos e Thomas, 1992). Por esta razão podem-se suplementar nutricionalmente os machos 6 a 8 semanas antes das colheitas de sémen para melhores resultados (Evans e Maxwell, 1987). O estado nutricional pode ser avaliado pela condição corporal dos animais, recomendando-se que os machos entrem na época reprodutiva com condição corporal de 2,5 a 3, numa escala de 1 a 5 (Kimberling e Marsh, 1997; Sharkey *et al.*, 2001).

## **1.2 Recolha de sémen**

A obtenção de sémen em carneiros para posterior avaliação ou utilização pode ser feita recorrendo a dois métodos disponíveis: a electroejaculação e a recolha com vagina artificial.

Alternativamente, está descrito um método de colheita de sémen, designado por *vaginal collection vial* (VCV), que é colocado na fêmea, e que pode ser interessante em carneiros não treinados, apresentando o sémen colhido a mesma qualidade do recolhido por vagina artificial (Wulster-Radcliffe *et al.*, 2001).

A frequência das colheitas depende do animal em causa mas, regra geral, em machos adultos, podem ser feitas diariamente (Mylne *et al.*, 1997). Evans e Maxwell (1987) referem que não há alteração da qualidade do sémen com 3 a 5 colheitas diárias durante 4-5 dias separadas por intervalos de descanso de 2-3 dias. Perspectivando o uso do sémen, Ollero *et al.* (1996), num estudo em que avaliaram a qualidade deste relativamente a ejaculações sucessivas, concluíram que se obtém sémen de melhor qualidade para inseminação artificial no segundo ejaculado, com um período de abstinência de 2 ou 3 dias, podendo aumentar o sucesso da inseminação artificial. Da mesma forma, Aguado *et al.* (1993, citados por Lopez-Brea *et al.*, 1995), referem melhor capacidade de congelação dos espermatozóides provenientes do terceiro ejaculado. Ainda a utilização prévia do carneiro em colheitas de sémen faz variar a quantidade de ejaculado, uma vez que o volume obtido aumenta com a idade e em animais em que já foram feitas recolhas anteriores (Lightfoot, 1968, Colas *et al.*, 1975, citados por Courot, 1979).

### **1.2.1 Colheita por electroejaculação**

Este método fundamenta-se na estimulação do animal, colocado em decúbito lateral, através de um electroejaculador, que é aplicado por via rectal até uma profundidade de 15 a 20 cm, sendo depois feitas estimulações eléctricas sucessivas durante alguns segundos (Evans e Maxwell, 1987). Há vários modelos de electroejaculadores disponíveis, mas é necessário sobretudo que a sua dimensão permita atingir a zona das glândulas acessórias (Nelson e Lin, 1983).

Hafez (1993) refere que, com estimulações sucessivas com intervalos de 7 segundos e incrementos de 1 Volt, a ejaculação ocorre após 4 a 7 estímulos. Cruz e Silva (1991) refere um máximo de 10 estímulos eléctricos e Kimberling e Marsh (1997) referem que a ejaculação ocorre ao fim da primeira ou segunda estimulação de 6 a 8 segundos, devendo ser feita previamente massagem das vesículas seminais. Outros autores recomendam estímulos de 3 a 8 segundos, de 10 a 15 Volts, com intervalos de 15 a 20 segundos. (Evans e Maxwell, 1987;

Mylne *et al.*, 1997). Martin (1986) indica como mais comum estímulos de 3 a 5 segundos com intervalos de igual duração, repetidos 9 ou 10 vezes. Para melhor colheita, o pênis deve estar em protração, colocado num tubo graduado seco, aquecido a 37°C.

As implicações negativas deste método em termos de bem-estar animal, por ser doloroso, condicionam o seu uso de rotina, devendo reservar-se a sua aplicação quando há necessidade de colheita pontual de sémen, como é o caso de exame andrológico em animais não treinados a ejacular em vagina artificial (Chagas e Silva, 1992). Além destes inconvenientes, verifica-se que o sémen obtido por electroejaculação é diferente do obtido por vagina artificial devido ao maior volume, maior conteúdo em líquido seminal, o que condiciona também a sua menor concentração (Chemineau *et al.*, 1991; Chagas e Silva, 1992; Hafez, 1993; Mylne *et al.*, 1997; Parkinson, 2001b). O sémen assim obtido é também menos resistente ao choque térmico e aos processos de congelação (Quinn e White, 1968, citados por Lopez-Brea *et al.*, 1995). Outro condicionante é que, se a estimulação for excessiva, há perda de erecção e o macho tende a urinar, contaminando o ejaculado, o que é frequente com este método (Nelson e Lin, 1983; Kimberling e Marsh, 1997; Sharkey *et al.*, 2001).

## **1.2.2 Colheita por vagina artificial**

Neste caso, a colheita é feita quase de modo natural, sem inconveniente para o animal, envolvendo no entanto maior dificuldade, essencialmente pela necessidade de habituar os animais a ejacular na vagina artificial.

O treino dos animais deve ser iniciado duas semanas a um mês antes da altura pretendida de colheita (Evans e Maxwell, 1987; Chagas e Silva, 1992; Mylne *et al.*, 1997), e preferencialmente em épocas de maior actividade sexual como sejam o final do Verão e o início do Outono (Chemineau *et al.*, 1991). Utiliza-se uma fêmea colocada num tronco de contenção que, para maior estimulação dos machos, deverá ser induzida em cio através de métodos hormonais. Recomenda-se o tratamento com 1 mg de benzoato de estradiol uma vez por semana para fêmeas ovariectomizadas (Mylne *et al.*, 1997) ou 50 a 100 µg de benzoato de estradiol, 48 h após um tratamento inicial com progestagénio durante 5-6 dias, aparecendo o cio 12 a 48 h após a administração do estrogénio (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991). Outros autores referem ainda administrações sucessivas de valerato de estradiol

(Lopez, 1991). O estímulo visual da ovelha imobilizada e de outros machos em cobrição da mesma são também estimuladores dos machos que aguardam (Rodriguez *et al.*, 1992, citados por Aguado *et al.*, 1995). Os operadores responsáveis pelo treino dos carneiros devem ser constantes, para que os animais se habituem, devem vestir roupas não intimidatórias, sugerindo-se roupa de cor azul ou preta e nunca branca (Chemineau *et al.*, 1991).

A vagina artificial é composta por uma porção inicial de borracha, de forma cilíndrica, que é cheia com água a 48-50°C (Evans e Maxwell, 1987) ou 50-55°C (Mylne *et al.*, 1997), para estar na altura da colheita a 42-45°C (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991), 41 a 44°C (Martin, 1986), 40 a 42°C (Nelson e Lin, 1983; López, 1991), 40 a 45°C (Mylne *et al.*, 1997); Hafez (1993) refere intervalo de temperaturas de 38 a 55°C. A conjugação da temperatura com a pressão, conseguida através da insuflação de uma válvula, permite simular as condições naturais de uma vagina; Lopez (1991) refere 40 a 60 mm de pressão. A porção inicial da vagina artificial continua-se por um funil de borracha, que faz a comunicação com o tubo colector no final do sistema. Todo o conjunto deve ser envolvido por uma bainha termo-isolante de forma a manter características térmicas constantes durante a colheita. Com a mesma finalidade, todo o material que compõe a vagina artificial deve ser mantido em estufa, aquecido a 30-37°C (Mylne *et al.*, 1997; Ax *et al.*, 2000b), o que assegura ao mesmo tempo a ausência de humidade, que poderia comprometer todo o processo.

A colheita deve ser feita logo a seguir à preparação do material, colocando-se o operador de joelhos do lado direito do animal. Uma vez que o macho salte, o pénis deve ser desviado e introduzido na vagina artificial previamente lubrificada, numa posição em que esta está voltada para cima no momento da ejaculação que, por sua vez, é notada quando o macho executa um brusco e mais pronunciado movimento pélvico (Mylne *et al.*, 1997; Evans e Maxwell, 1987).

### **1.3 Avaliação do sémen**

É através da determinação das propriedades do sémen colhido que podemos tentar prever resultados decorrentes da utilização deste e para isso, recorre-se a várias provas laboratoriais, macroscópicas e microscópicas. A avaliação do sémen tem que ter em atenção as técnicas

correctas de manipulação do mesmo, pois há variados factores que tendem a causar efeitos deletérios mais ou menos rápidos.

Em primeiro lugar, há que considerar o efeito temperatura. Deve assegurar-se a manutenção do sémen a mais de 30°C, pelo que, após se obter o ejaculado no tubo de colheita, este deve ser colocado imediatamente em banho-maria, entre os 30 e os 37°C (Nelson e Lin, 1983; Evans e Maxwell, 1987; Kimberling e Marsh, 1997; Mylne *et al.*, 1997; Parkinson, 2001b). A observação microscópica é feita em microscópio óptico de contraste de fase, equipado com placa aquecida a 37-39°C (Martin, 1986) ou 30-38°C (Kimberling e Marsh, 1997), e as lâminas e lamelas devem provir de placa de aquecimento, assim como os reagentes utilizados devem estar em estufa à mesma temperatura. De qualquer forma, os espermatozóides devem ser mantidos sempre abaixo dos 45-50°C, temperatura que provoca a sua morte (Evans e Maxwell, 1987; Mylne *et al.*, 1997; Parkinson, 2001b). As temperaturas baixas reduzem o metabolismo dos espermatozóides, mas se a redução for rápida causa perda irreversível de viabilidade (Evans e Maxwell, 1987).

Mais factores capazes de influenciar negativamente a colheita são: detritos, bactérias, desinfectantes e contaminantes vários, contacto com metais e mesmo a exposição ao ar e raios ultra-violeta, que causam perda de viabilidade (Nelson e Lin, 1983; Evans e Maxwell, 1987; Mylne *et al.*, 1997). Também o choque osmótico pode ser prejudicial, ocorrendo pela entrada de água durante a colheita, material molhado ou uso de diluidores inadequados (Nelson e Lin, 1983).

### **1.3.1 Características macroscópicas do sémen**

#### **1.3.1.1 Volume**

Deve ser avaliado num tubo colector graduado que é colocado na extremidade da vagina artificial quando é este o método de colheita. O volume de ejaculado no carneiro varia entre 0,5 e 2,0 ml (Nelson e Lin, 1983; Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Artiga *et al.*, 1995; Mylne *et al.*, 1997; Paulenz *et al.*, 2002).

### 1.3.1.2 Cor e cheiro

O sémen de carneiro tem normalmente uma coloração esbranquiçada, considerando-se contaminado se houver alteração, como é o caso de aparecer rosado por presença de sangue (hemoespermia) ou amarelado (e mais líquido) se contaminado por urina, tendo neste último caso um cheiro característico (Evans e Maxwell, 1987; Artiga *et al.*, 1995; Ax *et al.*, 2000a).

### 1.3.1.3 Consistência ou densidade

Avalia-se visualmente a concentração do ejaculado pela proporção de espermatozoides e líquido seminal (Mylne *et al.*, 1997), classificando-se através de uma escala, semelhante à indicada na Tabela 1-1. É uma técnica pouco rigorosa, devido à subjectividade inerente à avaliação (Chemineau *et al.*, 1991). Apesar disso, López-Valdéz e Mellado-Bosque (2001) referem valores de correlação entre a estimativa da concentração por hemocitómetro e a comparação com um padrão de fotografias de ejaculados de 0,93 e 0,96 para touros e bodes, respectivamente.

Escala	Evans e Maxwell, 1987		Shamsuddin <i>et al.</i> , 2000
	Características	Espermatozóides por ml ( $\times 10^9$ )	Características
0	Transparente, Aquoso	Insignificantes	—
1	Turvo	0,3 – 1,0	Aquoso
2	Leitoso	1,0 – 2,5	Leitoso
3	Cremoso/líquido	2,5 – 3,5	Cremoso/líquido
4	Cremoso	3,5 – 4,5	Cremoso
5	Cremoso espesso	4,5 – 6,0	Cremoso/granuloso

Tabela 1-1: Escala de avaliação da densidade (adaptado de Evans e Maxwell, 1987; Shamsuddin *et al.*, 2000).

## 1.3.2 Características microscópicas do sémen

### 1.3.2.1 Concentração

Pode ser estimada macroscopicamente pela consistência, mas, como tal método não é muito rigoroso, pode avaliar-se este parâmetro através de um hemocitómetro, de um contador

electrónico de partículas, ou de um colorímetro ou espectofotómetro que medem a concentração através da absorvância da luz, variável com a densidade óptica.

No hemocitómetro, a concentração é determinada pela contagem microscópica do número de espermatozóides contidos numa câmara com volume conhecido e provenientes dum ejaculado com diluição também conhecida (Chemineau *et al.*, 1991; Bearden e Fuquay, 1997d).

A contagem por espectofotómetro é mais rápida, e neste caso a densidade óptica (a comprimento de onda de 540 a 550 nm) é medida, comparando-a com um padrão sem espermatozóides (Chemineau *et al.*, 1991). Nas espécies como o carneiro em que o sémen é muito concentrado, é necessário fazer uma diluição de 1:100 a 1:400 com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% com 0,02% de formalina (Artiga *et al.*, 1995; Parkinson, 2001b).

O método mais rigoroso de avaliação da concentração é o contador electrónico de partículas, que se ajusta para o tamanho da partícula que se pretende contar (neste caso espermatozóides), sendo as células contadas ao passarem por um eléctrodo (Bearden e Fuquay, 1997d). Apesar de ser um muito bom método, não é utilizado por rotina devido ao seu elevado custo.

A concentração normalmente encontrada para o sémen de carneiro varia, de acordo com os autores de 1 a  $4 \times 10^9$  (Nelson e Lin, 1983), 2 a  $6 \times 10^9$  (Evans e Maxwell, 1987), 2 a  $10 \times 10^9$  (Chemineau *et al.*, 1991), ou 3,5 a  $5,5 \times 10^9$  espermatozóides/ml (Artiga *et al.*, 1995). O sémen de boa qualidade tem concentração de 3,5 a  $6 \times 10^9$  espermatozóides/ml (Evans e Maxwell, 1987).

#### **1.3.2.2 Mobilidade massal e individual**

A avaliação da mobilidade deve ser feita em duas fases; em primeiro lugar estima-se a mobilidade massal e depois a mobilidade individual.

Para determinação da mobilidade massal retira-se uma gota do ejaculado e coloca-se directamente numa lâmina aquecida, observando-se de seguida, sem a cobrir, com baixa ampliação: 10 a 100× (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Artiga *et al.*, 1995). Por ser muito concentrado, consegue-se observar no sémen ovino um característico



movimento em turbilhão, denominado correntemente movimento de onda, que é classificado de 0 a 5 de acordo com o referido na Tabela 1-2.

Escala	Nelson e Lin, 1983	Evans e Maxwell, 1987	Chemineau <i>et al.</i> , 1991 Mylne <i>et al.</i> , 1997	
	Descrição	Descrição	Classificação	Descrição
5	Movimento vigoroso, agitado e em turbilhão. Movimentos podem ser vistos “a olho desarmado”	Denso, movimentos de onda muito rápidos. Espermatozóides não se conseguem observar individualmente. > 90% de espermatozóides activos	Muito bom	Movimento de onda rápido e em espiral.
4	Movimentos de massa activos, sem o vigor de 5).	Movimentos vigorosos, mas as ondas não são tão rápidas como em 5). Cerca de 70 a 85% dos espermatozóides estão activos.	Bom	Movimento de onda rápido mas não espiral.
3	Movimentos massivos lento, sem turbilhão.	Movimentos de onda pequenos e lentos. Observam-se espermatozóides individuais. 45 a 65% de espermatozóides activos.	Normal	Movimento de onda geral, com ondas de pouca amplitude.
2	Movimento individual, pouco movimento de massa	Sem movimento de onda mas visível movimento dos espermatozóides. 20 a 40% de espermatozóides activos.	Pobre	Movimento muito lento.
1	Muito sémen mas essencialmente não há movimento	Só cerca de 10% dos espermatozóides mostram sinais de vida, com movimento fraco.	Muito pobre	Movimento individual.
0	Sem sémen	Todos os espermatozóides estão imóveis	Morto	Imobilidade total.

**Tabela 1-2: Sistema de classificação para mobilidade massal do sémen ovino (adaptado de Nelson e Lin, 1983; Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Mylne *et al.*, 1997).**

Para estimativa da mobilidade individual, por outro lado, retira-se uma gota de sémen com uma pipeta de *Pasteur*, coloca-se numa lâmina e adiciona-se na outra extremidade da lâmina uma gota de lactato de *Ringer*, solução tampão de citrato de sódio a 2,9% ou solução de cloreto de sódio a 0,9% (Nelson e Lin, 1983; Parkinson, 2001b), após o que se mistura um pouco do sémen recorrendo a um canto de uma lâmina, de modo a obter uma diluição de 1:1 (Chagas e Silva, 1992). Cobre-se o sémen assim diluído com uma lamela e avalia-se a mobilidade individual com ampliação de 100 a 400× em vários campos (Ax *et al.*, 2000a; Kaya *et al.*, 2001; Sharkey *et al.*, 2001).

Para ser avaliada correctamente a mobilidade individual é necessário que o sémen esteja suficientemente diluído e que a técnica de colheita tenha sido correcta, uma vez que a mobilidade é muito afectada por factores como o choque térmico, contaminação por urina ou por outras substâncias (Sharkey *et al.*, 2001). Considera-se uma mobilidade aceitável quando 40% dos espermatozóides observados apresentam progressão (Kimberling e Marsh, 1997),

não devendo ser considerados nesta contagem os movimentos de rotação, circulares, oscilantes ou convulsivos (Evans e Maxwell, 1987).

O valor preditivo da fertilidade de um carneiro pelo valor de mobilidade individual é limitado. Resultados de Wierzbowski e Kareta (1993) demonstraram que apenas os animais com mobilidade individual inferior a 10% apresentam diferenças significativas de fertilidade em relação às categorias superiores, o que não acontece aos animais com valores acima de 10%.

Os sistemas automáticos de avaliação da mobilidade existentes na actualidade, mais rigorosos, permitem medir a quantidade de espermatozóides móveis, através da leitura de variações na densidade do ejaculado quando este é atravessado por um feixe de luz, que são depois interpretadas por uma célula fotométrica (Correa *et al.*, 1997a).

### **1.3.2.3 Testes de funcionalidade**

Têm sido efectuados vários testes que aferem a qualidade do sémen através da sua resistência a determinadas condições. A prova mais vulgar é a termoresistência, colocando o sémen a determinada temperatura (geralmente 4 a 40°C ou a 37°C) e avaliando as amostras ao longo de períodos sucessivos de uma hora ou mais (Chemineau *et al.*, 1991; Mylne *et al.*, 1997; Parkinson, 2001b). Este teste também pode servir como auxiliar de outras provas para prever a capacidade fecundante do sémen congelado (Nadal da Luz, 2000).

Outros testes avaliam componentes do sémen como o ATP (adenosina trifosfato) e transaminases e outros ainda simulam *in vitro* a funcionalidade, tal como a capacidade de penetração no muco cervical, a fertilização *in vitro* (FIV) ou a penetração em oócitos de hamster (Zavos e Cohen, 1980; Correa e Zavos, 1994; Correa *et al.*, 1997a)

Embora ainda não esteja muito vulgarizado para sémen ovino, pode avaliar-se a funcionalidade do acrosoma, essencial para que se mantenha o potencial de fertilidade. Neste âmbito, pode recorrer-se à microscopia electrónica, microscopia óptica em campo escuro, colorações duplas ou triplas, microscopia de fluorescência usando lecitinas, microscopia de fluorescência usando anticorpos, fluorescência da clortetraciclina, citometria de fluxo e ARIC (*acrosome reaction following ionophore challenge*) (Pérez *et al.*, 1996a; Sukardi *et al.*, 1997; Zeginiadou *et al.*, 2000; Risopatrón, 2001). Essencialmente, estas provas visam detectar se os

espermatozóides conseguem ou não desenvolver a reacção do acrossoma, nalguns casos em condições de indução dessa reacção.

#### **1.3.2.4 Coloração vital**

A coloração vital avalia a capacidade da eosina-Y penetrar nas membranas, o que será indicador de alterações morfológicas, devido a danos ou morte das células (Jeyendran *et al.*, 1984). A distinção é feita entre células eosinofílicas e não-eosinofílicas, que se visualizam num fundo escuro corado com um corante secundário que geralmente é a nigrosina (Dott e Foster, 1972).

A técnica consiste em juntar uma gota de sémen a uma gota de corante, colocado numa lâmina pré-aquecida a 37°C, deixar repousar uns segundos e fazer um esfregaço, que se seca de imediato. Depois, com uma ampliação de 400×, conta-se o número de espermatozóides que aparecem corados na cabeça (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991). Se contarmos também os espermatozóides que apresentam a cauda corada teremos uma estimativa mais precisa dos não-viáveis (Nagy *et al.*, 1999). No carneiro normal, assume-se que a percentagem de células coradas seja inferior a 20 ou 30% (Chemineau *et al.*, 1991).

#### **1.3.2.5 Teste de endosmose**

Para testar a viabilidade dos espermatozóides não basta avaliar a permeabilidade da membrana espermática como se faz no teste de coloração vital. É importante além disso verificar a funcionalidade dessa mesma estrutura, essencial na capacitação espermática, na reacção do acrossoma e na ligação do espermatozóide com a superfície do oócito aquando da fecundação (Jeyendran *et al.*, 1984; Vazquez *et al.*, 1997).

O sémen ovino apresenta uma osmolaridade de cerca de 300 mOsm/kg, o que permite que as células mantenham a sua integridade. Jeyendran *et al.* (1984) descreveram uma técnica para avaliar a integridade funcional da membrana espermática, que se baseia na alteração que os espermatozóides sofrem quando são submetidos a uma solução de baixa osmolaridade. A este método chamamos teste de endosmose, ou abreviadamente HOST (*hypoosmotic swelling test*), que se fundamenta no facto de haver entrada de água através da membrana espermática quando os espermatozóides são submetidos a um meio hipotónico, numa tentativa de

equilibrar a osmolaridade dos meios intra e extracelular. Isto provoca o aumento do volume celular, levando à dilatação da membrana espermática e consequente enrolamento do flagelo no seu interior. A cauda do espermatozóide é muito susceptível, e quando a membrana está funcional sofre um enrolamento helicoidal e, neste caso, dizemos que a reacção é positiva (Artiga *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2001). As alterações da cauda podem ser facilmente observadas com um microscópio de contraste de fase, sendo suficiente contar 100 espermatozóides para validar o teste (Jeyendran *et al.*, 1984; Artiga, 1994; Rota *et al.*, 2000). Para obter valores mais rigorosos devem subtrair-se aos valores de caudas enroladas registadas no teste as que se observam nas alterações morfológicas dos espermatozóides, estimando-se as alterações sofridas por choque osmótico ou choque térmico (Correa *et al.*, 1997b).

A osmolaridade da solução que se utiliza pode ser variada, e têm sido empregues soluções com as mais diversas osmolaridades, em diferentes espécies animais, e com diversos tempos de incubação, sendo vários os resultados obtidos (Correa e Zavos, 1994). Rota *et al.* (2000) referem que a osmolaridade da solução empregue deve ser suficiente para provocar o máximo efeito, sem provocar a lise da membrana celular. Trabalhos em bovinos demonstraram que a solução com melhores resultados em sémen descongelado apresenta 100 mOsm/kg (Muñoz *et al.*, 1993; Correa e Zavos, 1994). Em suínos e ovinos os ensaios com vários tempos e osmolaridade mostraram que a maior percentagem de espermatozóides positivos foram conseguidas com osmolaridades de 50 a 150 mOsm/kg ( $100 \pm 30$  mOsm/kg para ovinos) e tempo de incubação de 30 minutos (Vazquez, 1980, citado por Artiga *et al.*, 1995; Vazquez *et al.*, 1997). Em caprinos, a técnica deve empregar uma solução de 100 mOsm/kg, durante 20 minutos (Cortes *et al.*, 1993).

Artiga (1994) afirma que a utilização do teste de endosmose reflecte a sensibilidade da membrana plasmática à passagem de água, pelo que pode também reflectir as diferenças que encontramos entre espécies quando avaliamos a sua capacidade de sobrevivência à congelação. Esta afirmação baseia-se nos trabalhos de Watson *et al.* (1992, citados por Artiga, 1994) que, ao realizarem o teste de endosmose com uma solução a 100 mOsm/kg, obtiveram percentagens de espermatozóides com membrana intacta de 100, 80, 60, 40 e 38%, respectivamente para galo, homem, touro, varrasco e carneiro, correspondentes às proporções de sucesso quando se congela sémen destas espécies.

Os resultados obtidos pela prova de endosmose têm vindo a ser utilizados para inferir a qualidade de determinado sémen e também para avaliar a capacidade de fecundação dos espermatozóides (Jeyendran *et al.*, 1984; Hauser *et al.*, 1992; Neild *et al.*, 2000). Contudo, estudos mais recentes indicam que é necessário combinar os valores de HOST com outras provas, podendo o HOST funcionar como um parâmetro adicional (Correa *et al.*, 1997b; Van der Ven *et al.*, 1986, McClure e Tom, 1991, citados por Petrounkina *et al.*, 2000). Rota *et al.* (2000) referem que em bovinos não foi ainda estabelecida uma correlação entre o teste de endosmose e a fertilidade *in vitro*, por poder haver neste caso, possivelmente, outros factores implicados.

Técnicas mais sofisticadas podem também ser usadas para avaliar a integridade da membrana plasmática, sendo a mais comum a coloração fluorescente com corantes como o iodeto de propidium e o carboxi-fluoresceinacetato (Valcárcel *et al.*, 1994; Petrounkina *et al.*, 2000). É possível também recorrer a um teste de endosmose modificado, que mede populações maiores de células (5000-50000), permitindo resultados mais relacionados com a qualidade do ejaculado (Petrounkina *et al.*, 2000).

Em ensaios em suínos, Vazquez *et al.* (1997) referem valores de espermatozóides positivos ao teste de endosmose inferiores aos valores de outros testes, nomeadamente coloração vital (menos 25%) e fluorescência (menos 10%), o que é lógico se pensarmos que o HOST avalia não só a permeabilidade da membrana mas também a sua funcionalidade. Artiga (1994) refere resultados coincidentes, com maior número de espermatozóides a reagir positivamente ao teste de coloração vital que ao HOST. De qualquer maneira, o mesmo autor, comparando várias técnicas de avaliação de sémen de carneiro encontrou a máxima correlação ( $r=0,78$ ) entre as provas de coloração vital e endosmose; Espinosa *et al.* (1993) registaram correlações de 0,43 entre as duas provas. Por estas razões, considera-se esta prova mais fidedigna que a coloração vital (Vazquez *et al.*, 1997; Tamuli e Watson, 1992, citados por Neild *et al.*, 1999).

Trabalhos com sémen de suínos a várias osmolaridades mostraram que espermatozóides imóveis podem possuir a membrana funcional, o que revela que a membrana plasmática persiste íntegra, mesmo depois de afectados os mecanismos responsáveis pela motilidade, entre os quais a funcionalidade das mitocôndrias (Fraser *et al.*, 2001).

### 1.3.2.6 Morfologia

Com uma ampliação de 1000×, com objectiva de imersão, podem ser observadas alterações à morfologia normal dos espermatozóides. Normalmente utiliza-se a mesma técnica de coloração que é usada para o teste de coloração vital, embora algumas anomalias necessitem de colorações ou microscopia específicas (Parkinson, 2001b). As alterações podem localizar-se na cabeça, porção intermédia ou cauda do espermatozóide.

A nível da cabeça as anomalias mais frequentes são as cabeças destacadas (Kimberling e Marsh, 1997), mas podem também observar-se tamanhos anormais (microcefalia e macrocefalia), morfologias anormais (cabeças piriformes, arredondadas, assimétricas), e alterações do acrossoma. Cabeças destacadas surgem geralmente quando há degenerescência testicular, por causas como a infecção por *Brucella ovis*, ou quando os animais estão muito tempo sem ejacular (Kimberling e Marsh, 1997; Parkinson, 2001b). As cabeças aparecem isoladas no campo visual.

Na porção intermédia e cauda várias alterações têm sido descritas, algumas de origem genética, mais frequentes em determinadas raças, outras com génese durante a formação do espermatozóide, mas todas têm em comum a alteração da forma normal da cauda, que aparece enrolada em graus variáveis. Contudo, as alterações da cauda podem também ter origem no meio já que, como destacado anteriormente, a cauda é muito susceptível a alterações quando exposta a modificações de temperatura ou osmolaridade que ocorrem, por exemplo, por contaminação com água (Nelson e Lin, 1983).

Um outro tipo de defeito na porção intermédia consiste na persistência da gota citoplasmática ou protoplasmática, estrutura que surge na altura de formação da cauda e que normalmente desaparece na passagem do espermatozóide pelo epidídimo. A sua existência pressupõe que o processo de maturação não está completo (Parkinson, 2001b). Existem dois tipos de gotas citoplasmáticas: proximais e distais. As primeiras indicam um estado de maturação menor, já que o desaparecimento da gota citoplasmática se faz no sentido distal e ocorrem devido ao excesso de utilização reprodutiva, imaturidade ou períodos de actividade hormonal baixa (Kimberling e Marsh, 1997; Parkinson, 2001b). Os animais jovens produzem ejaculados com

maior número de formas anormais, que se manifestam por anomalias da cabeça e gota citoplasmática proximal (López, 1991; Lopez-Brea *et al.*, 1995).

Técnicas mais sofisticadas de análise morfológica assistida por computador (ASMA: *automated sperm morphology analysis*), desenvolvidas para humanos, têm sido usadas já em algumas espécies domésticas (vários, citados por Boersma *et al.*, 2001), entre elas os ovinos (Gravance *et al.*, 1998), com a grande vantagem de diminuir a subjectividade da avaliação, o que aumenta a precisão dos resultados.

## **1.4 Anatomia e fisiologia reprodutiva na ovelha**

Na fêmea a produção de gâmetas (oócitos) ocorre no córtex do ovário, passando depois esses oócitos para o tracto reprodutor, nomeadamente para a âmpola do oviducto, local onde ocorrerá a fecundação (Chemineau *et al.*, 1991; Hafez e Hafez, 2000a). Se se formar um embrião, este segue depois para o útero, local onde se processará a gestação.

O oócito é unicelular e está colocado num folículo, rodeado de camadas concêntricas que são a zona pelúcida, formada por mucopolissacáridos e que têm papel fundamental na fertilização, a *corona radiata* e o *cumulus oophorus*, formados por células da granulosa. Na altura em que a fêmea atinge a puberdade, o número de folículos passíveis de sofrer ovulação está já definido, sendo para o caso dos ovinos cerca de 50 000, que se encontram latentes, numa fase inicial da meiose (Chemineau *et al.*, 1991; Hafez e Hafez, 2000a). Por intermédio das alterações endócrinas que ocorrem ao longo de cada ciclo reprodutivo, vai haver estimulação para a diferenciação desses folículos, nas etapas sucessivas de recrutamento folicular, selecção e finalmente dominância. Só alguns folículos chegam à fase de ovulação, já que muitos deles sofrem degenerescência durante o processo. Após a ovulação forma-se o corpo lúteo essencialmente por luteinização das células da granulosa.

### **1.4.1 Endocrinologia na ovelha**

Nos ovinos, os ciclos reprodutivos fazem alternar as várias fases, definidas em pró-estro, estro, metaestro, diestro e anestro (Bearden e Fuquay, 1997b; Noakes, 2001a). Um ciclo reprodutivo normal nos ovinos dura em média 16 a 17 dias (Ward, 1986; Sebastian, 1989a; Chemineau *et al.*, 1991; Bearden e Fuquay, 1997b; Stellflug *et al.*, 1997; Hafez e Hafez,

2000b; Noakes, 2001a). Se considerarmos as estruturas presentes no ovário, observamos duas fases que se sucedem: uma fase folicular (dominada pela presença de um folículo funcional que produz estrogénios, principalmente estradiol-17 $\beta$ ), que precede o estro, e uma fase luteínica, com início aquando da formação do corpo lúteo, responsável pela secreção de progesterona (Sebastian, 1989a). A duração do estro é variável entre espécies e nos ovinos dura, de acordo com vários autores, 36 horas (Ward, 1986), entre 31 e 53 horas (Chemineau *et al.*, 1991), 24-48 horas (Stellflug *et al.*, 1997), 24-36 horas (Bearden e Fuquay, 1997b; Hafez e Hafez, 2000b) ou 32-40 horas (Hafez e Hafez, 2000b). A ovulação ocorre 25 a 30 horas (Chemineau *et al.*, 1991) ou 30 a 36 horas após o início do cio (Hafez e Hafez, 2000b).

Tal como foi referido para o macho, também na fêmea o controlo endócrino da reprodução se localiza em dois centros principais: hipotálamo-hipófise e ovários. A regulação dos fenómenos reprodutivos é mais ou menos complexa e envolve sobretudo a estimulação da gónada pelas gonadotrofinas hipofisárias, FSH e LH, cuja libertação é estimulada pela GnRH produzida no hipotálamo. Nas fêmeas sazonais como a ovelha, a libertação de GnRH é maior nas épocas em que aumenta a actividade reprodutiva, modificando-se a libertação pulsátil de LH. Em ovelhas adultas, em época reprodutiva, os níveis basais de LH aumentam, assim como a frequência dos pulsos que passam a 1 por hora (Noakes, 2001a). Vários factores intervêm no aumento de libertação de GnRH e um dos mais importantes é o fotoperíodo, conforme veremos adiante.

O desenvolvimento do folículo é estimulado pela LH e FSH, embora seja esta última hormona a única capaz de induzir o recrutamento e diferenciação folicular inicial, havendo resposta à LH apenas após a maturação das células da granulosa, que passam a ter receptores de membrana para a hormona (Sebastian, 1989a; Chemineau *et al.*, 1991; Noakes, 2001a). Os estrogénios libertados pelo folículo são normalmente inibidores da secreção de GnRH. Nesta altura porém, a libertação de estrogénios do folículo em desenvolvimento leva a um *feed-back* positivo no hipotálamo com estimulação da hipófise, que é responsável pelo pico de LH que, por sua vez, induz a ovulação e que ocorre cerca de 24 horas antes desta (Evans e Robinson, 1980). Este *feed-back*, agora positivo, dos estrogénios deve-se à diminuição simultânea da progesterona e julgava-se que actuasse num centro pré-ovulatório do hipotálamo (Reeves, 1987; Hafez *et al.*, 2000). Neste momento admite-se que actue devido ao aumento de receptores de GnRH a nível hipofisário durante a fase folicular (Tobin *et al.*, 2001).



A inibina e folistatina são hormonas proteicas segregadas pelas células da granulosa do folículo que inibem a libertação de FSH da adenohipófise, sem aparentes efeitos na libertação de LH; por outro lado a activina, hormona proteica das células da granulosa, aumenta a secreção de FSH (Hafez *et al.*, 2000). Estas hormonas que controlam a libertação de FSH podem justificar a diferença de libertação que se observa entre FSH e LH, já que não pressupõem que o controlo seja feito unicamente pela GnRH (Bearden e Fuquay, 1997a).

Aquando da ovulação, liberta-se o ócito, restabelece-se a meiose, e o folículo transforma-se, pela acção da LH, em corpo lúteo, que será responsável pela produção de progesterona que atinge valores sanguíneos de 2,5 a 4 ng/ml (Noakes, 2001a). A progesterona, por sua vez, inibe a libertação de GnRH pelo hipotálamo, o que concomitantemente reduz a libertação de gonadotrofinas (Hafez *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001).

O corpo lúteo que entretanto surgiu mantém-se funcional até que haja indução da sua lise, por uma outra substância, a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), produzida no endométrio do corno uterino ipsilateral, cuja libertação pulsátil, por sua vez, é estimulada pela ocitocina produzida no corpo lúteo (Sebastian, 1989a; Hafez *et al.*, 2000). A manutenção do corpo lúteo só é possível se houver fertilização, já que neste caso o embrião começa a produzir, entre os dias 10 e 12, uma proteína, inicialmente denominada proteína trofoblástica ovina (TP-1) ou trofoblastina e agora identificada como interferão tau ( $IFN-\tau$ ), que inibe a expressão dos receptores uterinos de ocitocina, inibindo indirectamente a síntese de  $PGF_{2\alpha}$ . (Chemineau *et al.*, 1991; Noakes, 2001b). A prolactina segregada pela adenohipófise desempenha também função na manutenção do corpo lúteo, embora na ovelha esse papel não seja tão importante como noutras espécies, sendo mais importante como indutora do comportamento materno, na mastogénese e lactogénese (Delois *et al.*, 1980, citados por Ortavant *et al.*, 1985; Reeves, 1987; Hafez *et al.*, 2000).

Há vários factores que modificam também a actividade reprodutiva, entre os quais o mais importante parece ser o fotoperíodo conforme já referido. Outros factores intervenientes são o estado nutricional, a temperatura ambiente e factores sociais (Chemineau *et al.*, 1991).

De facto, verifica-se que o incremento nutricional durante 2 ou 3 semanas antes da cobrição aumenta a taxa de ovulação devido ao menor número de folículos que sofrem atresia, e a esta manipulação chamamos *flushing* (Keisler e Buckrell, 1997). Referem-se aumentos de 0,8 na

taxa de ovulação em ovelhas alimentadas com regimes duas vezes superiores aos de manutenção (Chemineau *et al.*, 1991). Por outro lado, a interacção de ovelhas com machos provoca a estimulação destas, por acção de feromonas masculinas, fenómeno que se conhece como “efeito-macho” (Ax *et al.*, 2000b). Assim, pode estimular-se a actividade sexual durante o período de transição para a época reprodutiva, nas fêmeas, por intermédio de machos vasectomizados ou machos e fêmeas castrados tratados com androgénios, o que provoca um aparecimento precoce e sincronizado do estro (Hafez, 1987).

É útil fazer a estimulação da actividade reprodutiva recorrendo ao “efeito-macho”, já que a exposição a um macho vasectomizado durante 48 horas ou mais, induz aumento de secreção de LH, o que leva a uma ovulação que se diz silenciosa. O corpo lúteo formado tem duração de 4 a 6 dias, ou tem a duração habitual, iniciando-se um novo ciclo éstrico que é normal neste último caso. Nas ovelhas com corpo lúteo de curta duração ocorre nova ovulação silenciosa, de que resulta um corpo lúteo de duração normal, ocorrendo o cio cerca de 17 dias depois (Sharkey *et al.*, 2001). Assim, vamos observar dois picos de actividade éstrica, 18 e 24 dias após a introdução dos machos (Keisler e Buckrell, 1997) ou 20-25 dias (Chemineau *et al.*, 1991). Se a introdução dos machos se fizer próximo da época normal de reprodução há uma grande percentagem de fêmeas que desenvolvem corpo lúteo normal e cio normal e o uso de progestagénios antes da introdução dos machos aumenta a sincronização dos cios, de tal forma que há apenas um pico de actividade éstrica em quase 100% das fêmeas (Chemineau *et al.*, 1991; Sharkey *et al.*, 2001). Para o “efeito macho” ser mais efectivo é necessário que as fêmeas não estejam lactantes e que se apresentem com uma boa condição corporal (Sharkey *et al.*, 2001). Por outro lado, é necessário que as ovelhas estejam afastadas de contacto visual, auditivo e olfactivo do macho durante aproximadamente 30 dias (Keisler e Buckrell, 1997). Para que se obtenha estimulação máxima da ovulação é necessário que os machos estejam em total contacto físico com as ovelhas quando são juntos (Pearce e Oldham, 1988).

## **1.5 Sazonalidade reprodutiva em pequenos ruminantes**

### **1.5.1 Modulação da actividade reprodutiva nos ovinos pelo fotoperíodo**

Nas várias espécies animais, as épocas reprodutivas variam de acordo com a altura mais favorável ao nascimento das crias que é a Primavera. Esta variabilidade entre Estações é marcada nas denominadas espécies sazonais, em que as fêmeas apresentam um período de

anestro sazonal manifesto. Assim, em espécies em que a gestação dura apenas umas semanas ou próximo de um ano (como é o caso dos roedores ou dos equídeos), a época de reprodução favorável é a Primavera, classificando-se estas espécies em espécies “de dias longos”, ao passo que nas espécies em que a gestação dura aproximadamente seis meses (caso dos pequenos ruminantes), a época mais favorável é o Outono, e classificam-se como espécies de “dias curtos” (Sebastian, 1989b; Gerlach e Aurich, 2000). Nos machos, apesar de não existir anestro reprodutivo, notam-se alterações nos parâmetros reprodutivos dependentes da época do ano.

Em qualquer das espécies domésticas, o período de luminosidade diário ou fotoperíodo é o factor ambiental utilizado para regular a actividade reprodutiva ao longo do ano (Ortavant *et al.*, 1985; Chemineau *et al.*, 1991; Malpaux *et al.*, 1996; Fitzgerald, 1997; Gerlach e Aurich, 2000; Hafez e Hafez, 2000b). No caso específico dos pequenos ruminantes os dias curtos são estimuladores da actividade sexual, e os dias longos são inibidores desta actividade, não existindo um período de luminosidade constante que permita a manutenção da reprodução ao longo do ano ou um período que permita a sua inibição (Chemineau *et al.*, 1996).

Nas raças ovinas existentes em latitudes mais baixas, as parições podem ocorrer em várias épocas do ano (caso do Merino na Austrália), ou mesmo durante todo o ano, caso dos climas temperados e tropicais em África (Chemineau *et al.*, 1991), daí que não haja uma marcada sazonalidade. Nos ovinos, existem ainda variações estacionais intra-raciais, já que há diferenças assinaláveis na amplitude de dias em que as várias raças se mantêm sexualmente activas. Esta sazonalidade ocorre sobretudo quando os animais vivem em latitudes médias/altas (superiores a 35° Norte e 34° Sul), sendo manifesta em latitudes superiores a 40°, em ambos os sexos (Ortavant *et al.*, 1985; Sebastian, 1989b; Chemineau *et al.*, 1991; Stellflug *et al.*, 1997; Forcada *et al.*, 2000a). A sazonalidade é mais marcada nas raças ovinas originárias do Norte da Europa, onde as variações anuais do fotoperíodo são maiores, do que nas raças do Sul da Europa (Bodin *et al.*, 1999). Especificamente nas latitudes mediterrânicas, existe uma grande variabilidade entre raças e dentro da mesma raça na presença, duração e profundidade do anestro que, contudo, é mais curto (Sebastian, 1989b; Silva, 1991; Pelletier *et al.*, 2000). O clima temperado da região mediterrânea e a diferença reduzida entre o dia mais curto (9-10 horas de luz) e o dia mais longo (14-15 horas) fazem com que haja uma certa flexibilidade nas épocas reprodutivas (Forcada *et al.*, 2000a). Silva e Calheiros (1980)

referem, para a raça Merina Branca em Portugal, actividade reprodutiva máxima entre Junho e Outubro, com valores mínimos em Fevereiro. Rodrigues *et al.* (1989) e Barbas *et al.* (1991) obtiveram fertilidade elevada, durante a Primavera, em ovelhas Merino da Beira Baixa e Serra da Estrela. Bettencourt e Fialho (1992) referem que, para as raças Merino Branco, Merino Precoces e Île-de-France, não existe propriamente um anestro no Sul de Portugal, já que uma proporção considerável de fêmeas se mantém sexualmente activa durante todo o ano, apesar de se notar uma ligeira sazonalidade na Île-de-France. O mesmo é referido por Alonso de Miguel e Cognié (1980, citados por Chemineau, 1992), que afirmam que 50% das ovelhas de raça Aragonesa apresentam ciclicidade ovárica durante a Primavera.

Podemos distinguir raças ditas de “estação reprodutiva longa” ou “curta”, de acordo com o número de dias que estão sexualmente activas. Hafez (1952, citado por Hafez e Hafez, 2000b) refere, por exemplo, para as raças Dorset Horn e Border Leicester, respectivamente 223 e 131 dias de actividade reprodutiva. Geneticamente a característica de épocas longas é dominante, pelo que todos os cruzamentos com a raça Merina, que é uma raça de “estação longa”, apresentam estações de reprodução mais prolongadas (Hafez e Hafez, 2000b). Estas variações sazonais que se observam entre fêmeas de determinada raça ocorrem também nos machos dessa raça, já que se observa uma evolução sazonal semelhante entre o anestro feminino e os valores mínimos de diâmetro testicular, assim como diferenças na resposta ao fotoperíodo entre raças, em ambos os sexos (Islam e Land, 1977; Poulton e Robinson, 1987; Martin *et al.*, 1999).

### **1.5.2 Sazonalidade reprodutiva em ovinos machos**

Especificamente nos machos, embora não haja cessação de produção espermática, notam-se alterações em determinados parâmetros, tais como o perímetro testicular, níveis de testosterona, produção espermática e comportamento reprodutivo, que estão diminuídos na época menos favorável (Boland *et al.*, 1985; Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1992; Gerlach e Aurich, 2000; Hafez e Hafez, 2000b). Esta diminuição manifesta-se mesmo em climas sub-tropicais (Gastel *et al.*, 1995). Schanbacher e Lunstra (1976) e Dufour *et al.* (1984) referem variações sazonais na actividade sexual e características reprodutivas, com melhores *performances* no Outono e mais baixas no Verão, embora outros autores não tenham observado diferenças significativas na fertilidade do sémen colhido durante os vários meses do ano (Hill *et al.*, 1998). Da mesma forma, Bettencourt (1999) refere aumento da produção

de sémen no início da estação reprodutiva, simultaneamente com concentrações elevadas de testosterona, para as raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça.

Segundo alguns autores, o decréscimo de actividade na Primavera, com piores resultados reprodutivos, tem a ver com o aumento das anomalias espermáticas que podem chegar aos 70% em alguns meses e que provocam mesmo esterilidade temporária dos animais (Baptista e Mascarenhas, 1977; Chemineau *et al.*, 1991; López, 1991). Colas (1980), afirma também que as anomalias são importantes na Primavera e que as gotas citoplasmáticas proximais só aparecem nos ejaculados quando a luminosidade é crescente, sendo específicas da acção da luz e traduzindo uma certa perturbação dos fenómenos de maturação no epidídimo. Em carneiros Saloios, Cruz e Silva (1991) refere valores de espermatozóides anormais mais elevados de Janeiro a Maio do que de Agosto a Novembro. Colas (1980) refere valores máximos de anomalias morfológicas de meados de Fevereiro até fim de Maio e o mesmo autor (Colas, 1981) encontrou uma alta correlação ( $r=-0,83$ ) entre as anomalias espermáticas e a fertilidade do ejaculado na Primavera, que desaparece no Outono. Face a isto, a avaliação deste parâmetro na Primavera pode ser preditivo da fertilidade dos carneiros, o que está de acordo com as considerações de Guerin (1990), que considera ser particularmente importante efectuar um controlo rigoroso da qualidade dos espermatozóides na Primavera, para avaliar a percentagem de células mortas e, sobretudo, a de formas anormais.

As alterações na *performance* dos carneiros manifestam-se também noutros parâmetros. Em animais Île-de-France o peso testicular passa de 200g em Maio para 300g em Agosto (Chemineau *et al.*, 1991) e a produção espermática diária é quatro vezes maior no Outono que na Primavera (Dacheux *et al.*, 1981). Sharkey *et al.* (2001) e Kimberling e Marsh (1997) referem diminuição de 2 a 3 cm no perímetro testicular e sémen de inferior qualidade à medida que aumenta o período de luminosidade na Primavera e início do Verão. A nível histológico, Hochereau-de-Reviers *et al.* (1985) registaram alterações sazonais nas células de Sertoli e de Leydig, associadas à eficiência de espermatogénese que foi maior quando os animais foram expostos a dias curtos. Parkinson (2001b) afirma que o perímetro testicular está muito dependente da Estação do ano, havendo uma variação de 25 a 35%, e Chemineau *et al.* (1992) referem que o peso testicular é normalmente mínimo na Primavera e máximo no final do Verão. Em latitudes elevadas, as variações sazonais no perímetro testicular são bem evidentes, com valores mais elevados no Outono, seguidos do Inverno e Verão e valores mais

baixos na Primavera (Dýrmundsson *et al.*, 1981). Em Portugal, em trabalhos com a raça Saloia, os valores mínimos de perímetro testicular aparecem em Maio, decrescendo os valores de Fevereiro a Maio, voltando a subir para atingir o máximo em Outubro (Cruz e Silva, 1991).

Rescalvo *et al.* (1993), em trabalhos com a raça Manchega, obtiveram variações sazonais de volume de ejaculado, com os valores mais altos no Verão e Outono, e de concentração, com valores mais elevados na Primavera; em relação à mobilidade massal e individual, estas foram mais elevadas respectivamente no Verão/Outono e Primavera/Verão. Os mesmos autores não encontraram, no entanto, variações significativas no número total de espermatozóides. Na raça Merina foram registados valores de concentração dos ejaculados máximos entre Agosto e Março e valores mínimos entre Abril e Junho, sendo o mês de Maio o mês com o valor mais baixo ( $2,57 \times 10^9$  espermatozóides/ml; López, 1991). Ibrahim (1997), por outro lado, encontrou variações no volume de ejaculado, com o menor volume no Outono; a mobilidade massal foi maior no Outono e Inverno e a concentração maior no Verão.

Cruz e Silva (1991), em carneiros Saloios, observou volumes de ejaculados colhidos por electroejaculação que diminuíram de Janeiro a Abril, aumentando depois, com máximo em Agosto/Setembro. Nos mesmos animais, registaram-se decréscimos nas concentrações de Janeiro a Abril/Maio e aumento gradual até Agosto/Setembro. Quanto à mobilidade massal, tendeu a diminuir de Janeiro a Abril/Maio, para depois subir até Outubro/Novembro, voltando de seguida a descer para os valores de Janeiro.

Colas (1981) refere capacidade fecundante do esperma menor na Primavera (Março-Abril) que no Outono (Setembro) e não encontrou correlação entre a fertilidade e a percentagem de células positivas à coloração vital, nas duas épocas.

Em carneiros jovens da raça Serra da Estrela, considerada uma raça menos sazonal, os níveis de testosterona variaram entre 22,4 e 40,83 ng/ml entre os meses de Abril a Novembro e entre 21,15 e 23,4 ng/ml de Dezembro a Março. Nos mesmos animais, notou-se um aumento de concentração espermática de Agosto ( $2,7 \times 10^9$  espermatozóides/ml) a Fevereiro ( $5,9 \times 10^9$  espermatozóides/ml), observando-se uma diminuição destes valores de Março a Julho (Baptista e Mascarenhas, 1977). Em relação aos níveis de LH, eles são maiores na estação

reprodutiva e este aumento é manifesto quando os animais transitam para esta estação, ocorrendo simultaneamente aumento da testosterona. Também neste caso há variações interracialis, já que em todas as raças se observa esta situação, mas a manifestação varia com a raça (Pelletier *et al.*, 1982).

### **1.5.3 Regulação hormonal da sazonalidade reprodutiva**

Descoberta em 1958 por A. E. Lerner (Universidade de Yale, U.S.A.; Forcada e Abecia, 2000), a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), hormona sintetizada principalmente na glândula pineal ou epífise (*glandula pinealis*) de todos os mamíferos a partir do triptofano e da serotonina, é o mensageiro que regula a actividade sazonal, permitindo a percepção dia/noite (Wayne *et al.*, 1988; Deveson *et al.*, 1992; Hafez *et al.*, 2000). Esta regulação está relacionada com um ritmo de libertação de melatonina pela pineal que, actuando quase exclusivamente ao nível do hipotálamo mediobasal, leva à libertação de GnRH no sistema porta hipotálamo-hipofisário (Thimonier, 1996; Lincoln e Clark, 1998). Consequentemente, há também aumento de libertação de LH e FSH (Webster *et al.*, 1991; Karsch *et al.*, 1984, citados por Malpoux *et al.*, 1996). A acção da melatonina faz-se pela duração do período de libertação e não pela amplitude ou quantidade total de melatonina libertada (Wayne *et al.*, 1988a, citados por Deveson *et al.*, 1992).

As informações fotoperiódicas captadas pela retina chegam à pineal através de uma via polineural do núcleo supraquiasmático do hipotálamo que termina através de fibras noradrenérgicas originárias nos gânglios cervicais superficiais, e induz a expressão de um gene (CREM: *cAMP responsive element modulator*) numa proteína (ICER: *inductible cAMP early repressor*) que é um poderoso inibidor dos genes activados pelo AMPc. A produção de melatonina é controlada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (NAT) que é dependente do AMPc. A proteína ICER pode portanto inibir a transcrição do gene da NAT (Yellon *et al.*, 1992; Pévet, 1996; Forcada *et al.*, 2000a; Zarazaga *et al.*, 2000).

Inicialmente postulou-se que a melatonina actuava nos receptores existentes na *pars tuberalis* da hipófise, mas trabalhos mais recentes demonstraram que esses receptores estão ligados à inibição de libertação de prolactina, cujos níveis são inversos aos da melatonina, isto é, aumentam quando aumenta o fotoperíodo (Poulton e Robinson, 1987; Pelletier *et al.*, 1990;

El-Alamy *et al.*, 2001) e são suprimidos por acção da melatonina (Gerlach e Aurich, 2000). A inibição de libertação de prolactina parece ser modulada pela acção da melatonina e de um mediador parácrino, denominado tuberalina, na *pars tuberalis* da hipófise, desenvolvendo-se um estado refractário a essa inibição a partir de determinada altura (Lincoln e Clarke, 1997; Lincoln e Clarke, 1998; Pang, 1998; Lincoln e Clarke, 2000). A prolactina não tem qualquer efeito inibidor na libertação de GnRH e é incapaz de inibir o ciclo reprodutivo (Sebastian, 1989b; Lincoln e Tortonese, 1999).

A secreção de melatonina processa-se durante a noite, sendo a duração da produção tanto maior quanto menor a duração de luminosidade do dia. A melatonina tem libertação contínua, ampliada por uma secreção episódica, de um pulso cada 15 a 20 minutos (Forcada *et al.*, 2000b). Os níveis plasmáticos encontrados variam de espécie para espécie. No caso dos ovinos os níveis nocturnos são bastante elevados, encontrando-se variações entre 100 e 500 pg/ml (Malpaux *et al.*, 1987, citados por Malpaux *et al.*, 1996), ou 27 a 981 pg/ml (Bodin *et al.*, 1999), que são alcançados dez minutos após o início da noite (Forcada e Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b). Os níveis diurnos são inferiores a 5 pg/ml, que é o valor mínimo detectável pelos métodos radioimunológicos, já que a hormona é rapidamente metabolizada no fígado em 6-hidroxi-melatonina e excretada por via urinária na forma sulfatada ou glucoronada (Committee for Veterinary Medicinal Products, s/ data; Yu *et al.*, 1993, citados por Malpaux *et al.*, 1996; Forcada e Abecia, 2000). A heritabilidade do nível de secreção de melatonina é elevado nos ovinos ( $h^2=0,45$ ), o que pode explicar em parte a maior sazonalidade de algumas raças ovinas (Bodin *et al.*, 1999). As diferenças entre animais parecem dever-se ao número de pinealócitos da glândula pineal, o que é determinado por genes (Gómez-Brunet *et al.*, 2000, citado por Zarazaga *et al.* 2000).

#### **1.5.4 Manipulação da actividade reprodutiva pela luminosidade**

A estação sexual pode ser modificada, ou mesmo revertida, por iluminação artificial (Yeates *et al.*, 1949). Esta constatação conduziu à utilização do factor luminosidade para manejo reprodutivo em ovinos.

As alterações típicas nos carneiros, quando o período de luminosidade decresce naturalmente ou é diminuído artificialmente, são: o aumento do perímetro testicular, o aumento dos níveis de FSH, LH e testosterona, enquanto os de prolactina decrescem (Sanford *et al.*, 1977;



Lincoln *et al.*, 1978; Regisford e Katz, 1993; El-Alamy *et al.*, 2001). Apesar dos dias curtos serem estimuladores da actividade reprodutiva nesta espécie, esta pode cessar quando os animais são expostos a este fotoperíodo prolongadamente. Ovelhas submetidas a fotoperíodo curto durante 100 dias apresentam diminuição de actividade sexual, e dizemos que os animais se tornaram refractários aos dias curtos (Chemineau, 1992; Chemineau *et al.*, 1992).

Guerin *et al.* (2000) afirmam que no desencadear de actividade reprodutiva em ovinos estão envolvidos dois sinais sequenciais, um de dias longos (Primavera/Verão) e outro de dias curtos (Outono/Inverno) e estes sinais têm que coincidir com uma fase sensitiva do sistema circadiano que ocorre ao entardecer. Assim, a alternância entre dias longos e dias curtos, que existe naturalmente, é essencial para que se processe o fenómeno de percepção da duração dos dias, isto é, não é só a duração do período luminoso em si que importa, mas também o aumento ou diminuição da luminosidade, bem como a regulação do processo por períodos determinados (Robinson e Karsh, 1987; Forcada *et al.*, 2000a; Gorman e Zucker, 1995a, citados por Gelach e Aurich, 2000). Por exemplo, o desencadear de actividade no final do Verão não se deve só à diminuição da duração dos dias, mas também à existência de um período regulador que corresponde aos dias longos da Primavera (Malpaux *et al.*, 1989, Malpaux e Karsch, 1990, Wayne *et al.*, 1990, Woodfill *et al.*, 1991, citados por Malpaux, 1996; Barrell *et al.*, 2000; Woodfill *et al.*, 1994, citado por Gerlach e Aurich, 2000). Karsch *et al.* (1989, citados por Deveson *et al.*, 1992) referem que o ciclo anual de 365 dias em ovelhas pinealectomizadas pode ser regulado por um período de infusão de melatonina que simule dias longos durante 70 dias. Segundo alguns autores, o papel dos dias curtos seria mais manter a actividade reprodutiva do que induzi-la (Malpaux e Karsch, 1990). No entanto, os trabalhos de Robinson e Karsch (1984, citados por Deveson *et al.*, 1992) mostraram que ovelhas às quais foi prolongada a duração de dias curtos (10L:14E) entraram em anestro na mesma altura que aquelas que se mantiveram em fotoperíodo natural de dias crescentes. Neste caso tornaram-se ambas refractárias aos dias curtos.

Assim, a exposição dos ovinos a um sistema de 8 horas de luz e 16 horas de escuridão (8L:16E) induz actividade reprodutiva durante a estação de anestro, se for precedido por várias semanas de fotoperíodo longo que sensibilize o sistema (Bearden e Fuquay, 1997b) e nas fêmeas os dias curtos induzem ovulação a partir dos 50 dias (Chemineau, 1992).

O fenómeno, que inicialmente parecia mais simples, possibilita a manifestação de um ritmo sazonal endógeno que não corresponde aos 12 meses do ano e em que não há sincronia entre os animais do grupo (Karsch *et al.*, 1989, citados por Malpaux, 1996; Grubbaugh *et al.*, 1982, Jansen e Jackson, 1993, Woodfill *et al.*, 1994, citados por Gerlach e Aurich, 2000). O período deste ciclo endógeno varia geralmente entre os 8 e os 10 meses (Malpaux *et al.*, 1996). Howles *et al.* (1982) encontraram diferenças nesta periodicidade em função do período de luminosidade constante aplicado; o grupo exposto a dias longos manifestou periodicidade de 35 a 40 semanas, enquanto no grupo submetido a dias curtos a periodicidade foi variável. Wayne *et al.* (1988a, citados por Deveson *et al.*, 1992) referem que ovelhas pinealectomizadas a que foi administrada melatonina continuamente de modo a simular dias longos tornaram-se refractárias após 150 dias e os níveis plasmáticos de LH aumentaram. A referência a este ritmo endógeno não é aceite por alguns autores que afirmam que a ciclicidade que se observa em animais mantidos durante longos períodos a fotoperíodo constante pode dever-se a outros factores, nomeadamente a nutrição, interacções sociais e à temperatura (Lincoln *et al.*, 1982, Bronson e Heideman, 1994, citados por Langford *et al.*, 1999). Jackson *et al.* (1990, citados por Langford *et al.*, 1999), num estudo em que mantiveram ovelhas durante 3 anos em ambiente controlado de temperatura e fotoperíodo fixo (12L:12E) notaram manutenção de actividade reprodutiva, sem alterações durante todo o ano. Martin *et al.* (1999), referem também que a disponibilidade nutricional e outros factores como a temperatura e interacções sociais podem influenciar o eixo reprodutivo nos carneiros, mas que o fotoperíodo é o factor mais importante neste controlo.

Como referido anteriormente, a exposição a dias longos é necessária para que haja posteriormente resposta aos dias curtos. Contudo, a exposição a um fotoperíodo longo não exige presença de luz durante todo o período, dito luminoso, já que se conseguem obter os mesmos efeitos com a exposição luminosa por curtos períodos, durante a fase de escuridão. A partição do período luminoso num período de luz principal de 7 horas e um segundo período de 1 hora, 16 a 17 horas após o amanhecer é interpretado pelo animal como um dia longo de 16 horas de luz (Chemineau *et al.*, 1992).

Os períodos refractários, como já referido, são aqueles em que não há resposta à secreção de melatonina, por existência de um fotoperíodo constante inibidor ou indutor da reprodução, sem que haja modificação da secreção de melatonina (Thimonier, 1996). Para evitarmos que

se instale um estado refractário, podem fazer-se tratamentos de alternância de um mês de dias longos e um mês de dias curtos, em que os carneiros mostram actividade testicular alta continuamente durante dois anos e meio (Chemineau *et al.*, 1996; Pelletier e Almeida, 1987, citados por Gerlach e Aurich, 2000). No carneiro parece que estes estados refractários não são tão manifestos como nas fêmeas, já que eles respondem ao fotoperíodo mesmo após períodos prolongados de luminosidade constante (Langford *et al.*, 1999). Nota-se que após o início de libertação de LH por estimulação com dias curtos, os níveis de testosterona só se elevam algumas semanas depois e nessa altura há queda dos valores de LH, possivelmente por um mecanismo de *feedback* negativo. A exposição a pequenos períodos alternantes de dias longos e curtos permite manter níveis elevados de LH, sem que se atinjam os níveis elevados de testosterona responsáveis pela inibição (Chemineau *et al.*, 1992). Almeida e Pelletier (1988) indicam que tratamentos luminosos com regimes de 2 meses permitem máximo peso testicular devido a estimulações curtas, mas frequentes, pela LH, mas sem os efeitos de sobreestimulação de testosterona que podem inibir subsequentemente a libertação de LH por retrocontrolo negativo.

A modulação da actividade reprodutiva pelo fotoperíodo intervém também na maior ou menor precocidade com que os animais atingem a puberdade, sendo visíveis diferenças no desenvolvimento testicular, variáveis com a raça (Colas *et al.*, 1987). Em borregos nascidos na Primavera, a diminuição do período de luminosidade após o solstício de Verão é o sinal para início da puberdade (Gerlach e Aurich, 2000). Se os animais forem criados em condições de fotoperíodo constante, a puberdade tem um atraso de pelo menos seis meses (Wood e Foster, 1992, Herbosa *et al.*, 1994, citados por Gerlach e Aurich, 2000). A exposição de borregos em crescimento a dias longos atrasa a manifestação de comportamento sexual, comparativamente à exposição a dias curtos e, em qualquer dos casos, o desenvolvimento testicular é superior aos animais sujeitos a fotoperíodo natural (Howles *et al.*, 1980). É por estas razões que alguns centros de inseminação artificial recorrem aos tratamentos fotoperiódicos para conseguir uma puberdade precoce nos machos, reduzindo assim o intervalo entre gerações, nos programas de melhoramento genético (Thimonier, 1996). Além disto, em dois estudos efectuados, os borregos submetidos a tratamentos luminosos conseguiram produzir mais 115% e 29% doses de sémen (Chemineau *et al.*, 1988, citados por Chemineau *et al.*, 1992) e a fertilidade deste sémen é superior (Belloc *et al.*, dados não publicados, 1991, citados por Chemineau *et al.*, 1992).

Como a idade à puberdade parece ser mais afectada pelo fotoperíodo em fêmeas do que em machos (Kennaway e Gilmore, 1985), Piketty (2001) estudou se este dimorfismo se devia aos locais de ligação da melatonina na *pars tuberalis* da hipófise, não tendo observado diferenças entre os dois sexos.

Em animais adultos, a utilização de tratamentos com fotoperíodo curto em instalações controladas permitiu obter, em quatro raças de carneiros, um aumento médio de 145% de sémen produzido sobre o grupo controlo, mantido em condições naturais (Pézavent e Chemineau, dados não publicados, 1990, citados por Chemineau *et al.*, 1992). Também a exposição a períodos de dias curtos aumenta a actividade sexual e permite melhores fertilidades na cobrição de ovelhas sincronizadas (Schanbacher, 1979). Por outro lado, Boland *et al.* (1985) não observaram diferenças no volume, mobilidade e percentagem de células anormais e no perímetro testicular quando os animais foram sujeitos a tratamentos luminosos, notando contudo diferenças entre Estações para os mesmos parâmetros. Em relação à influência na fertilidade após aplicação de sémen congelado em várias épocas do ano, os trabalhos diferem (vários, citados por Salamon e Maxwell, 1995b). De qualquer maneira, parece que tratamentos com “dias curtos” melhoram a fertilidade do sémen congelado (Fiser e Batra, 1984, Fiser e Fairfull, 1983, 1986, Zheltobryuk *et al.*, 1990, citados por Salamon e Maxwell, 1995b).

### **1.5.5 Manipulação da sazonalidade reprodutiva com recurso à melatonina**

É possível mimetizar “dias curtos” através da administração de melatonina, injectável, por via oral ou por sistemas de libertação constante: implantes, dispositivos intra-ruminais, esponjas vaginais, etc. (Chemineau *et al.*, 1992; Chemineau, 1996; Thimonier, 1996). A administração por via oral é efectiva, apesar de ter uma absorção mais lenta (Committee for Veterinary Medicinal Products, s/ data; Stellflug *et al.*, 1988). A forma de administração de eleição tem sido a de implantes subcutâneos (2 x 4 mm), colocados na base da orelha, que contêm 18 mg de melatonina, permitindo induzir níveis plasmáticos entre 100 e 300 pg/ml de melatonina durante 100 dias (Forcada e Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b). Esta administração mantém os níveis de estimulação hipotalâmica e alterações reprodutivas semelhantes aos obtidos com exposição a dias curtos (Lincoln e Ebling, 1985; Hanif e Williams, 1991) e os níveis

plasmáticos que se obtêm não alteram a secreção endógena nocturna de melatonina, que se mantém (Lincoln e Ebling, 1985; Deveson *et al.*, 1992).

A elevação dos níveis de melatonina com implantes em ovelhas permite obter estimulação da secreção de LH 40 a 60 dias após a colocação dos implantes (Viguié *et al.*, 1995, citado por Forcada *et al.*, 2000a; Bittman *et al.*, 1985, citados por Forcada *et al.*, 2000b). Staples *et al.* (1992) e Chemineau (1996) indicam que em ovelhas, a duração óptima do tratamento com implantes é de 70 dias, sendo necessário um período de tratamento superior a 40 dias para obtenção de resposta. Stellflug *et al.* (1988) referem valores melhorados de fertilidade com tratamentos durante 40 dias antes da época reprodutiva menos favorável e Williams *et al.* (1992) indicam que o tratamento com melatonina deve ser iniciado 30 a 40 dias antes da introdução dos machos, que é o período mínimo para obtenção de ciclicidade normal (Forcada *et al.*, 2000b).

De qualquer modo, os pulsos de LH passam de 1 em 6 horas com dias longos para 10 em 6 horas com a utilização de implantes (Viguié *et al.*, 1995a, citados por Malpaux *et al.*, 1996). Este tempo de acção da melatonina faz reforçar a ideia de que a acção, na libertação de GnRH, é indirecta e nela participam interneurónios e neuromoduladores como a dopamina, a noradrenalina, a serotonina e ácidos aminados excitadores, além da interacção destes com as hormonas tiroideias (Malpaux *et al.*, 1996; Gerlach e Aurich, 2000), as quais intervêm na modulação da actividade reprodutiva, nomeadamente no final desta época e início do anestro (Parkinson e Follett, 1994; Forcada *et al.*, 2000a,b; Dahl *et al.*, 1995, Thrun *et al.*, 1996, citados por Gerlach e Aurich, 2000).

A melatonina estimula um aumento dos níveis séricos de testosterona 45 dias após a colocação dos implantes, sendo estes valores mais elevados no Outono do que na Primavera (Chemineau *et al.*, 1992; Kokois *et al.*, 2000). O efeito dos implantes de melatonina e consequente aumento da testosterona permitem incrementar a actividade da enzima acrosina dos espermatozóides, tanto no Outono (maior actividade) como na Primavera, podendo aumentar a fertilidade desse sémen (Kokois *et al.*, 2000).

Estas variações de *performance* reprodutiva fazem com que alguns centros de inseminação artificial recorram aos tratamentos luminosos para evitar as variações sazonais de produção qualitativa e quantitativa de esperma ovino (Thimonier, 1996). Em França os centros de

inseminação artificial utilizam dois tipos de manipulações: condicionamento luminoso, com alternância de dias longos e dias curtos, ou *flashes* luminosos durante 2-2,5 meses para simulação de dias longos e aplicação de implantes de melatonina, sendo que este último tratamento, quando feito com 3 a 6 implantes, apresenta melhores resultados relativamente a volume testicular e produção de espermatozóides (Brice e Chemineau, 1996). Estes factos confirmam as constatações de vários autores (citados por Chemineau, 1992) que referem que os tratamentos com melatonina em carneiros provocam um incremento importante da produção de sémen.

A involução dos testículos, quando os animais são submetidos a períodos prolongados de dias curtos, parece dever-se à instalação de um estado de refracção aos dias curtos e à melatonina (Lincoln e Ebling, 1985) e Fitzgerald e Stellflug (1991) referem que a melatonina estimula o crescimento testicular após a regressão fisiológica. Tekpetey e Amann (1988, citados por D'Occhio e Suttie, 1992) testaram o efeito de infusões diárias de melatonina no tamanho testicular, sob condições naturais, começando no final da Primavera, não tendo observado diferenças entre animais tratados e controlo. Continuando a administração, observaram aumento no tamanho testicular no grupo controlo, enquanto o grupo tratado se tornou refractário. A colocação de implantes de melatonina bloqueia o efeito dos dias longos (como por exemplo a estimulação de secreção de prolactina) e durante, longos períodos, torna os carneiros irresponsíveis a dias longos ou curtos, isto, é os animais tornam-se não-fotoperiódicos (Lincoln e Ebling, 1985). Os implantes de melatonina não conseguem manter um nível reprodutivo estável, pois os carneiros tratados apresentam alterações cíclicas a longo prazo (Lincoln e Ebling, 1985).

As raças existentes em latitudes mais baixas, como é o caso da Península Ibérica apresentam menor sazonalidade reprodutiva (Bettencourt e Fialho, 1992), pelo que os tratamentos com melatonina são mais efectivos quando aplicados perto do equinócio de Primavera (Março-Abril), ao contrário do que acontece em latitudes superiores em que os tratamentos são vantajosos próximos do solstício de Verão (Forcada e Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b). Em qualquer dos casos, há necessidade de fornecer um período prévio de dias longos antes dos implantes para suprimir o ritmo estabelecido pelas modificações naturais dos dias e a necessidade deste período depende da altura em que se processa o tratamento em relação ao aumento natural de luminosidade do solstício de Inverno ao solstício de Verão (Hanif e

Williams, 1991). Chemineau (1992) refere que a exposição a dias crescentes após o solstício de Inverno tem que durar, pelo menos, dois meses para restituir plenamente o efeito estimulante da melatonina. Entretanto, Rosa *et al.* (2000) mostraram que a aplicação de implantes de melatonina aumenta a actividade sexual nos carneiros e que, se esta aplicação se fizer no final da Primavera, não é necessário tratamento com dias longos antes. Tal facto justifica-se porque os animais foram já submetidos a vários meses de dias longos, o que antecipa o aumento de secreção de LH, tal como se verifica na antecipação do desenvolvimento testicular de Outono, com uso de implantes de melatonina (Webster *et al.*, 1991).

Guérin *et al.* (dados não publicados, 1991, citados por Chemineau *et al.*, 1992) aplicaram implantes de melatonina a carneiros Île-de-France que haviam sido submetidos a dias longos de 5 de Janeiro a 11 de Março e observaram aumentos de peso testicular no grupo tratado 2 a 3 semanas após a aplicação dos implantes e valores equivalentes aos da estação reprodutiva favorável 5 semanas após o tratamento. Em tratamentos mais prolongados é possível manter mais elevados os valores de peso testicular dos animais com implantes do que dos controlo (Trinquier *et al.*, 1990, dados não publicados, citados por Chemineau *et al.*, 1992). Kaya *et al.* (2000) conseguiram melhorar a mobilidade individual do sémen e diminuir a percentagem de formas anormais fora da estação reprodutiva com implantes de melatonina, mas referem que na época de reprodução não conseguiram melhorias em nenhum dos parâmetros.

Em Espanha, trabalhando com carneiros de raça Lacha sujeitos a uma colheita de sémen semanal, foi possível melhorar as *performances* reprodutivas com colocação de implantes no dia 2 de Abril (Beltrán de Heredia, 1995, citado por Forcada *et al.*, 2000b). Neste caso, a avaliação das características espermáticas ao longo de 15 semanas, permitiu detectar, a partir da semana 9, aumento no volume e concentração dos ejaculados, sem alteração nos parâmetros de qualidade do sémen. No mesmo país, utilizando carneiros de raça Manchega, Azcona *et al.* (2001), utilizaram implantes de melatonina a partir de 14 de Abril, durante 14 semanas, não tendo encontrado diferenças significativas entre grupos para as características do sémen. Estes autores sugerem que a ausência de diferenças poderá ser justificada pela menor sazonalidade desta raça em relação a outras.

Nas fêmeas, onde está mais difundido o tratamento com melatonina, é possível melhorar os resultados produtivos, já que o recurso aos implantes de melatonina permite obter um aumento de fertilidade nos rebanhos testados e também da prolificidade (Haresign *et al.*, 1990; Goddard, 1991; Rekik *et al.*, 1991; Anguita *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2001). Tejero *et al.* (2001) obtiveram 88,2% de fertilidade em ovelhas tratadas com melatonina *versus* 75,7% do grupo controlo e aumento de 28 borregos por cada 100 ovelhas tratadas. Forcada e Abecia (2000) referem aumentos de 15% de prolificidade em rebanhos testados, sendo a resposta a este tratamento maior em ovelhas com menor quantidade de reservas corporais na época de reprodução. O aumento da prolificidade parece dever-se à melhoria na taxa de ovulação, como consequência de menor taxa de atresia nos estadios finais de desenvolvimento folicular (Forcada *et al.*, 1995, Bister *et al.*, 1999, citados por Forcada *et al.*, 2000b). Por outro lado, Abecia *et al.* (1999, citados por Forcada *et al.*, 2000b) mostraram que, em ovelhas subnutridas, a melatonina consegue diminuir *in vitro* a secreção de PGF<sub>2α</sub> pelo endométrio 15 dias após a cobrição, que é o momento crítico na determinação de maior sobrevivência embrionária. Carlson (s/ data) refere também aumentos na fertilidade com uso de implantes de melatonina se for feita a sincronização do cio com progesterona .

Além destes efeitos, nas fêmeas o tratamento pode ser usado para antecipar a época reprodutiva, devendo nesse caso o tratamento ser iniciado 60 dias antes da data que se espera o primeiro cio, isto é, no início do Verão (English *et al.*, 1986; Haresign *et al.*, 1990; Wheaton *et al.*, 1990; Deveson *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1992). Esta utilização para antecipar a época reprodutiva mostra-se interessante em programas de intensificação de parições (Kusakari e Ohara, 1999). Chemineau *et al.* (1996) referem antecipações na época reprodutiva de 50 a 52 dias. A antecipação da época reprodutiva está contudo associada a uma época de menor duração (Staples *et al.*, 1992) e para se conseguir a sincronização das ovelhas torna-se necessário utilizar o “efeito macho” ou tratamentos hormonais (Staples *et al.*, 1992). Em fêmeas, melhores resultados são obtidos, crescentemente, pela seguinte ordem: ausência de tratamento, tratamento unicamente com melatonina, tratamento só com dias longos, tratamento com melatonina a seguir a dias longos, embora, nas ovelhas de climas mediterrâneos que são normalmente cobertas na Primavera, seja possível usar a melatonina sem prévios tratamentos luminosos nesta altura (Chemineau *et al.*, 1992). Riocerezo *et al.* (2001) conseguiram, inclusivamente, melhorar os resultados reprodutivos de ovelhas na Primavera com aplicação de implantes de melatonina no final de Janeiro.



## **1.6 Conservação de sémen e outras tecnologias reprodutivas em ovinos**

A conservação do sémen e o recurso a tecnologias reprodutivas como a inseminação artificial (IA), têm permitido manipular favoravelmente a reprodução, com vantagens óbvias para a produção animal. Por um lado, é possível que o sémen de um determinado macho seja utilizado num elevado número de fêmeas e, no caso do sémen congelado, a esta vantagem acrescenta-se a possibilidade de conservar os espermatozóides com capacidade fecundante durante longos períodos de tempo. O recurso à congelação permite mesmo utilizar sémen de animais mortos ou com incapacidade reprodutiva, o que é tão mais importante em raças em vias de extinção, em que se pode “refrescar a população” com sémen proveniente de *pools* genéticos armazenados.

Para realizar a inseminação artificial, utiliza-se o sémen recolhido pelas técnicas já descritas anteriormente, que pode ser aplicado directamente, alguns minutos apenas após a colheita (sémen fresco), ou então processá-lo para posterior aplicação. A primeira alternativa, apesar de permitir bons resultados de fertilidade (Bettencourt *et al.*, 1997), é pouco praticável, pois exige que os machos e as fêmeas estejam próximos (Chemineau *et al.*, 1991), além de permitir um pequeno número de doses por ejaculado (Chagas e Silva, 1992). Devido a estas limitações opta-se, normalmente, pela preparação do sémen na forma refrigerada ou congelada.

### **1.6.1 Sémen refrigerado**

O sémen refrigerado é aquele que se utiliza imediatamente após a colheita, devendo ser mantido a 15 ou 5°C, após a diluição e utilizado até 8 a 12 horas depois (Chemineau *et al.*, 1991; López, 1991; Parkinson, 2001c). Há autores que referem que deve ser utilizado no prazo de 1 hora (Mylne *et al.*, 1997). O sémen refrigerado a 5°C conserva-se durante mais tempo, mas nunca se deve ultrapassar o limite de 24 horas, que é o limite em que os níveis de fertilidade ainda são aceitáveis na inseminação cervical, já que a fertilidade se reduz em 15 a 35% por cada dia que passa (Evans e Maxwell, 1987; Salamon e Maxwell, 2000). Além disso, a mortalidade embrionária aumenta à medida que se prolonga o período de conservação do sémen (Maxwell e Salamon, 1993). Apesar destas observações, Salamon *et al.* (1979, citados

por Maxwell e Salamon, 1993) verificaram capacidade fecundante de sémen conservado a 5°C durante 10 dias, quando aplicado por via intrauterina.

Para o sémen ser conservado, adiciona-se um diluidor em proporção que permita obter uma quantidade final de  $320-350 \times 10^6$  espermatozóides viáveis por palhinha (Guerin, 1990; Colas e Gueren, 1979, citados por López, 1991) ou  $400 \times 10^6$  (Chemineau *et al.*, 1991). O acondicionamento do sémen diluído pode ser feito em palhinhas de 0,25 ou 0,5 ml (Chagas e Silva, 1992).

Os diluidores que se utilizam constituem um meio nutritivo para os espermatozóides, além do efeito tampão e manutenção da osmolaridade. Os melhores resultados são obtidos com osmolaridades de 300 a 350 mOsm/kg, isto é, próximo do valor normal dos solutos orgânicos (Vazquez *et al.*, 1989). O diluidor mais prático de usar é o leite de vaca, UHT (*ultra-high-temperature*) ou tratado durante 8 a 10 minutos a 92-95°C para inactivar a lactenina que é tóxica para os espermatozóides (Mylne *et al.*, 1997; Salamon e Maxwell, 2000). A fracção proteica do leite funciona como tampão, é quelante para metais pesados e protege do choque de arrefecimento (Salamon e Maxwell, 2000). Outra alternativa é o uso de diluidores sintéticos, de que são exemplos os que incluem na composição frutose ou glicose como fonte de energia, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) ou citrato como tampões e gema de ovo como protector do choque térmico. A gema de ovo protege a membrana plasmática do choque de arrefecimento, possivelmente devido ao seu conteúdo em fosfolípidos e, além disso, reduz as perdas de enzimas acrossómicas e previne alterações degenerativas do acrossoma (Quinn *et al.*, 1980; Guerin, 1990; Salamon e Maxwell, 2000). López *et al.* (1999) não encontraram diferenças entre conservação do sémen refrigerado a 5°C usando como diluidor leite, TRIS ou citrato de sódio durante 2 dias; após este tempo obtiveram melhores resultados com o diluidor à base de citrato de sódio. Qualquer que seja a composição empregue, é feita uma pré-diluição, logo após a chegada do sémen, fazendo-se a diluição definitiva depois. O diluidor deve ser adicionado ao sémen à mesma temperatura deste e lentamente (Chemineau *et al.*, 1991; Mylne *et al.*, 1997).

Além do diluidor deve ser adicionado um antibiótico, por exemplo penicilina e estreptomicina ou sulfamidas para prevenir o desenvolvimento bacteriano e infecções vaginais (Salamon e Maxwell, 2000; López, 1991; Evans e Maxwell, 1987). Também se podem utilizar antioxidantes de que são exemplo o superóxido-dismutase (SOD), catalase, citocromo-C, e

peroxidase glutatiónica, que melhoram a sobrevivência dos espermatozóides, a integridade do acrossoma e a fertilidade (Maxwell e Stojanov, 1996).

Após a diluição procede-se ao enchimento das palhinhas, aplicando vácuo à extremidade que contém um tampão; a outra extremidade é selada por ultra-sons, por calor, com vidro ou plástico colorido ou com tampão de pó de álcool polivinílico. A refrigeração faz-se em recipiente-termo ou frigorífico e deve ser progressiva (1 a 1,5 horas para 15°C e 2 a 3 horas para 5°C), já que o sémen é muito susceptível a variações térmicas, especialmente entre os 18 e os 5°C (Evans e Maxwell, 1987).

### **1.6.2 Sémen congelado**

O sémen conservado em azoto líquido (-196°C) pode ser mantido durante vários anos sem prejuízo da sua qualidade. Salamon *et al.* (1996, citados por Sharkey *et al.*, 2001) referem que o sémen congelado pode manter fertilidade durante pelo menos 27 anos. A tecnologia de congelação de sémen é obviamente mais complexa e também os resultados obtidos são inferiores aos conseguidos com sémen refrigerado (Maxwell e Watson, 1996). A redução do número de espermatozóides viáveis ocorre nas várias fases envolvidas no processo, essencialmente refrigeração, desidratação, congelação e descongelação.

Devido aos baixos resultados de fertilidade, a aplicação de sémen congelado de carneiro deve ser intrauterina, apesar de Donovan *et al.* (2001) referirem fertilidades de 25 a 65% com este sémen, utilizando a via cervical. Windsor (1997) verificou existirem bastante diferenças entre ejaculados congelados de um mesmo animal quando aplicados por via cervical, além das diferenças entre animais. Essa diferença será devida mais a aspectos essencialmente ambientais, enquanto a diferença entre carneiros será de origem genética, pelo que é preferível a selecção dos animais com base nestas últimas diferenças. Além disso, a variação entre animais é maior que entre ejaculados (Quintana Casares *et al.*, 1991, citados por Eppleston e Maxwell, 1995).

Neste tipo de conservação, os diluidores usados têm a mesma finalidade referida para o sémen refrigerado, a que se soma a necessidade de crioprotecção, isto é, proteger o espermatozóide dos efeitos deletérios da congelação (Parkinson, 2001c). O glicerol continua a ser o melhor e

mais usado crioprotector de sémen de carneiro (Maxwell e Watson, 1996; Medeiros *et al.*, 2002) e deve ser usado em concentração de 4 a 6%, dependendo esta concentração da proporção de componentes do diluidor e, em particular, da sua pressão osmótica (Fiser e Fairfull, 1986; Salamon e Maxwell, 2000). O efeito do glicerol é exercido por estimulação osmótica da desidratação celular, que diminui a quantidade de água disponível no interior da célula para congelação (Watson, 1990; Medeiros *et al.*, 2002). A adição do glicerol pode fazer-se juntamente com o diluidor ou separadamente, não havendo evidência de vantagens do segundo método sobre o primeiro (Salamon e Maxwell, 2000). Em qualquer dos casos, é necessário um período de arrefecimento até 2-5°C, cuja duração varia normalmente entre uma e três horas (Salamon e Maxwell, 1995a). Embora as excelentes propriedades crioprotectoras do glicerol tornem necessário o seu uso, há que ter em atenção alguns efeitos deletérios que ocorrem na fase de equilíbrio (30 a 0°C), como sejam alterações na estrutura e integridade bioquímica dos espermatozóides e aceleração da reacção do acrossoma. É por esta razão que alguns autores recomendam a adição do glicerol pouco tempo antes da fase de congelação (Salamon e Maxwell, 2000), havendo inclusivamente outros que referem que os espermatozóides mantêm poder fertilizante na ausência de glicerol (Abdelhakeam *et al.*, 1991a,b). Fahy (1986, citado por Salamon e Maxwell, 1995a) afirma que a toxicidade inerente ao uso do glicerol depende da velocidade de arrefecimento e congelação, composição do diluidor e método de adição do próprio glicerol. Outros crioprotectores possíveis de utilizar são: dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, albumina, polióis de baixo peso molecular e compostos poliméricos (Salamon e Maxwell, 2000).

Várias composições têm sido formuladas para diluidores de sémen congelado, que são empregues com diluições que geralmente vão de 2 a 6 (v/v). As que apresentam melhores resultados são o meio TRIS-glucose-gema de ovo (Evans e Maxwell, 1987), o leite-frutose-gema de ovo (Gil *et al.*, 2000), o leite-lactose-gema de ovo, ou o TRIS-frutose-gema de ovo (D'Alessandro *et al.*, 2001). Além do seu poder tampão, a gema de ovo é o agente mais eficaz de protecção dos espermatozóides do choque térmico (Salamon e Maxwell, 1995a; Watson, 1995); para congelação em minipalhinhas, pode ser adicionada em proporções de 1,5% a 3%, com menos lesões do acrossoma com o primeiro valor (Watson e Martin, 1975a, citados por Salamon e Maxwell, 1995a). Diluentes hipertónicos à base de açúcares são usados também para contrariar a diminuição da pressão osmótica induzida pelo glicerol e para diminuir a água intracelular sujeita a cristalização (Salamon e Maxwell, 1995a; Aisen *et al.*, 2002). Os

açúcares com moléculas maiores são melhores crioprotectores, sendo em ordem decrescente: rafinose, sacarose, lactose, frutose e glucose (Salamon e Maxwell, 1995a, 2000). Ultimamente, têm sido tentadas novas variações na composição dos diluidores para resultados mais promissores. El-Alamy e Foote (2001), por exemplo, descrevem adição de sódio e lauril sulfato de trietanolamina (STLS), possibilitando melhorias na aplicação de sémen congelado por via cervical.

As proteínas do leite e os fosfolípidos e LDL (*low density lipoproteins*) da gema de ovo têm um papel de crioproteção da membrana (Parks e Graham, 1992; Watson, 1976, citado por Watson, 1995; Gil *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2002), desempenhando um papel semelhante ao das proteínas do líquido seminal que são adsorvidas à membrana plasmática, podendo ser portanto adicionadas aos diluidores para melhorar a capacidade de preservação (Barrios *et al.*, 2000; Pérez-Pé *et al.*, 2001a). O líquido seminal, apesar deste efeito, é deletério para os espermatozóides, pelo que alguns autores desenvolveram técnicas de remoção deste, por centrifugação ou por filtração. Pérez-Pé *et al.* (2001b) mostraram que o método que se utiliza na remoção do líquido seminal altera a função de crioproteção das proteínas do líquido seminal.

Alguns métodos prevêm também a centrifugação do sémen diluído para aumentar a concentração nas palhinhas, o que não é nada prático porque, desta forma, cada ejaculado permite apenas um número reduzido de doses, além de que pode mesmo piorar os resultados de fertilidade (Salamon e Maxwell, 1995b; Gil *et al.*, 2000; D'Alessandro *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2002).

O choque no arrefecimento provoca alterações na disposição dos constituintes da membrana, com consequentes modificações nas funções metabólicas que, após a descongelação, predispõem a alterações da permeabilidade à água e solutos (Medeiros *et al.*, 2002). Este choque térmico, é mais severo entre os 2 e os 12°C (Watson, 1981, citado por Watson, 1995).

Durante o processo de congelação, a membrana plasmática do espermatozóide sofre alterações que comprometam a sua integridade (Barrios *et al.*, 2000). A lesão da membrana deve-se à reorganização dos seus lípidos durante o arrefecimento e descongelação, que provoca distúrbios na associação lípido-lípido e lípido-proteína, necessários para o

funcionamento normal (Parks e Graham, 1992). Além da membrana plasmática, também a membrana acrossómica externa e as membranas mitocondriais são lesadas (Watson, 1995; Windsor e White, 1995). Assim, o arrefecimento deve ser, por um lado lento para permitir a desidratação da célula, mas por outro deve ser suficientemente rápido para evitar a exposição à hipertonidade do meio durante a cristalização do gelo, com efeitos importantes sobretudo entre os  $-10$  e  $-25^{\circ}\text{C}$  (Colas, 1985; Watson, 1990; Salamon e Maxwell, 1995a; Holt, 2000). A velocidade de arrefecimento entre os  $-5^{\circ}\text{C}$  e os  $-45^{\circ}\text{C}$  deve estar situada entre  $-10$  e  $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Watson, 1995).

Para acondicionamento do sémen congelado podem-se usar palhinhas com 0,5 ou 0,25 ml como para o sémen refrigerado, minitubos de 0,25 ml, ou *pellets*. Neste último método faz-se uma congelação rápida, utilizando dióxido de carbono sólido ( $-79^{\circ}\text{C}$ ), vapores de azoto ( $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-100^{\circ}\text{C}$ ), ou placas metálicas frias, transferindo-se depois o congelado para azoto líquido (Evans e Maxwell, 1987; Maxwell *et al.*, 1995; Salamon e Maxwell, 1995a). Maxwell *et al.* (1995) obtiveram melhores resultados de motilidade com sémen congelado em *pellets*, apesar de não haver diferenças de fertilidade entre este sémen e o conservado em minitubos; em qualquer dos casos os resultados foram superiores aos obtidos com o acondicionamento em palhinhas. A congelação em *pellets* caiu em desuso devido à dificuldade de identificação das doses e no processo de descongelação, além de ser fácil a contaminação das mesmas. Manso *et al.* (1997) verificaram que não existem diferenças entre os dois tipos de palhinhas aquando da descongelação, excepto no valor da endosmose positiva que foi significativamente menor nas de 0,5 ml, mas que não comprometem a taxa de fertilidade. As palhinhas são cheias como referido para o sémen refrigerado, simplesmente neste caso é necessário deixar uma câmara de ar na extremidade que se sela para evitar que as palhinhas quebrem durante a congelação.

O método de diluição é semelhante ao descrito para o sémen refrigerado, sendo mais simples fazer esta operação num só passo a  $30^{\circ}\text{C}$ . De facto, actualmente, a diluição única utilizando um meio com glicerol é a mais usada e recomenda-se arrefecimento até  $5^{\circ}\text{C}$  durante 1,5 a 2 horas (Evans e Maxwell, 1987; Salamon, 1976, citado por Salamon e Maxwell, 1995a). Note-se que, neste caso, a descida de temperatura é um pouco acelerada relativamente ao sémen refrigerado porque se assegura a protecção dos espermatozóides pela inclusão do glicerol no diluidor (Evans e Maxwell, 1987).

A segunda etapa de congelação pode ser feita automaticamente, através de programação da velocidade de refrigeração (com melhores resultados a velocidade de  $-5$  a  $-7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; Byrne *et al.*, 2000), ou manualmente, colocando as palhinhas num suporte em contacto com vapores de azoto líquido ( $-75$  a  $-125^{\circ}\text{C}$ ; Salamon e Maxwell, 2000), a 3-6 cm (Evans e Maxwell, 1987; Maxwell *et al.*, 1995; Salamon e Maxwell, 2000) ou mesmo 20 cm (Chemineau *et al.*, 1991) acima do nível do líquido. Deixam-se assim durante 7 a 8 minutos, após o que se transferem para azoto líquido devidamente acondicionadas em *canisters* utilizando *goblets* (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991). Na congelação manual a velocidade de refrigeração pretendida é de  $-15$  a  $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Watson, 2000).

O sémen congelado, por razões ainda não totalmente esclarecidas, apresenta a membrana num estado de maturação mais avançado, que se assemelha à capacitação (Watson, 1995; Pérez *et al.*, 1996b; Gillan *et al.*, 1997). Watson (2000) comparando os dois fenómenos refere que um é a versão desorganizada do outro. O sémen fresco, para atingir o mesmo estadio, necessita de um período de incubação. É por esta razão que o sémen que já está capacitado, ao ser colocado no tracto reprodutivo da fêmea, sofre uma reacção do acrossoma prematura, o que explica a grande diferença na fertilidade, obtida por inseminação cervical com sémen fresco e congelado, que pode diminuir se a inseminação for intra-uterina (Maxwell e Watson, 1996; Gillan *et al.*, 1997; Gillan e Maxwell, 1999; Salamon e Maxwell, 2000). Thundathil *et al.* (1999) demonstraram o mesmo em bovinos, concluindo ainda que a proporção de sémen não capacitado existente no sémen está correlacionada positivamente com a fertilidade. Quando a reacção do acrossoma ocorre, os espermatozóides têm uma duração de não mais de 2 a 4 horas (Sukardi *et al.*, 1997), daí a menor sobrevivência dos espermatozóides congelados no tracto reprodutor feminino.

O processo de capacitação envolve alterações da membrana em que há peroxidação dos ácidos gordos insaturados existentes na membrana e libertação de radicais livres (ROS: *reactive oxygen species*) que induzem a peroxidação lipídica, pelo que a adição de antioxidantes ou quelantes melhora a mobilidade e fertilidade do sémen congelado (Maxwell e Watson, 1996; Salamon e Maxwell, 2000). O mesmo efeito protector tem o líquido seminal, que pode ser adicionado ao diluidor, inibindo a peroxidação dos lípidos e atrasando a capacitação, permitindo mesmo obter resultados satisfatórios na inseminação cervical com sémen congelado (Maxwell *et al.*, 1999; Perez-P *et al.*, 2001).

### 1.6.2.1 Descongelção do sémen

Esta fase é tão ou mais importante que a congelação, já que o sémen que sobreviveu a este processo necessita ainda resistir às temperaturas críticas, entre  $-15^{\circ}\text{C}$  e  $-60^{\circ}\text{C}$  (Salamon e Maxwell, 1995a). A descongelção do sémen pode ser feita a várias temperaturas mas, deverá ser tanto mais celere, regra geral, quanto mais rápida tiver sido a velocidade de congelação (Evans e Maxwell, 1987). A descongelção rápida, usando temperaturas superiores é aconselhada porque evita a recristalização do gelo intracelular presente no espermatozóide (Salamon e Maxwell, 2000). Este fenómeno parece ser um dos factores responsáveis pelos danos que ocorrem, principalmente entre os 2 e os  $30^{\circ}\text{C}$  (Holt *et al.*, 1992, citados por Watson, 1995). A temperatura de descongelção deverá ser da ordem dos  $37$  a  $42^{\circ}\text{C}$  para minipalhinhas (em banho-maria) e de  $35$  a  $80^{\circ}\text{C}$  para *pellets* (Evans e Maxwell, 1987; Salamon e Maxwell, 1995a, 2000). No primeiro caso aplica-se a temperatura durante 30 segundos ou durante 2 a 3 minutos (Evans e Maxwell, 1987; Guerin, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Salamon e Maxwell, 2000). É mais seguro usar temperaturas da ordem dos  $38^{\circ}\text{C}$  porque a temperaturas superiores, basta 1 ou 2 segundos de demora na remoção do banho-maria para matar os espermatozóides (Guerin, 1990). Jondet (1976), em trabalhos com sémen bovino, encontrou mesmo melhores resultados utilizando as palhinhas de 0,25 ml directamente do que efectuando uma descongelção de 7 segundos a  $35^{\circ}\text{C}$ , afirmando que existe uma descongelção *in vivo*. A aplicação do sémen deve ser feita num período máximo de 15 minutos após a descongelção (Evans e Maxwell, 1987).

### 1.6.2.2 Avaliação do sémen à descongelção

Apesar de muitos espermatozóides (40 a 60%) apresentarem mobilidade individual após descongelção, apenas 20 a 30% estão funcionalmente íntegros (Salamon e Maxwell, 1995b, 2000). Os restantes apresentam lesões ultraestruturais da membrana plasmática e acrossómica, do acrossoma, das mitocôndrias e do axonema, o que se vai reflectir também em alterações bioquímicas (Salamon e Maxwell, 2000). Watson (1995, 2000) refere que na maioria das espécies só 40 a 50% dos espermatozóides sobrevivem à criopreservação. A estimativa de mobilidade individual é pois apenas um indicador, mas não muito fidedigno, já que muitos dos espermatozóides que se apresentam móveis após descongelção perdem a mobilidade em poucas horas, quando incubados a  $37^{\circ}\text{C}$ , sugerindo-se que as lesões de membrana são a causa



principal de perda de viabilidade (Valcárcel *et al.*, 1994). A membrana plasmática e o acrossoma são mais sensíveis à congelação que o núcleo e a componente motora (Salamon e Maxwell, 1995b).

Fitzgerald e Stellflug (1998) referem máximo de células anormais de 19 a 15% e perdas no processo congelação/descongelação de 40-50%, pelo que afirmam que, neste caso, o número de células por dose deve ser duplicado. Segundo estes autores, os ejaculados de boa qualidade apresentam 50 a 65% de células viáveis após descongelação e 20 a 50% das células podem não sobreviver ao processo de congelação, independentemente do método usado. Nadal da Luz *et al.* (2000) verificaram fertilidade elevada (68,07%) na inseminação intrauterina laparoscópica quando o sémen apresentava na descongelação mobilidade progressiva superior a 40%.

Após ser descongelado, o sémen deve ser colocado num tubo aquecido a 37°C, que é a temperatura que simula o ambiente de inseminação e pode ser avaliado num microscópio com platina aquecida a 37°C. Observa-se a mobilidade individual que deve ser superior a 40% (Evans e Maxwell, 1987). Pode mesmo ver-se mobilidade massal, com movimentos de onda, se a diluição não foi muito grande. A viabilidade das células pode ser avaliada através de coloração com eosina-nigrosina e a quantidade de espermatozóides não-viáveis não deve exceder os 70% (Evans e Maxwell, 1987). Neste caso, a presença de glicerol aumenta a penetração da eosina nas células, dando uma estimativa exagerada de células mortas (Parkinson, 2001b).

Uma técnica, que se pode utilizar também, é o teste de termorresistência, que consiste em incubar o sémen descongelado a 38°C numa solução de citrato de sódio a 250 mOsm/kg e avaliar a percentagem de espermatozóides móveis ao fim de três horas, a qual deverá ser superior a 15-20% (Guerin, 1990). Encontrou-se correlação entre os vários parâmetros que avaliam a mobilidade do sistema motor do espermatozóide à descongelação. Assim, existe correlação entre percentagem de espermatozóides vivos, percentagem de móveis, móveis progressivos, endosmose e termorresistência 1 hora depois (Aisen e Medina, 1992).

O teste de endosmose efectuado após congelação do sémen parece não ser tão correcto na estimativa da fertilidade, já que o processo de congelação afecta a membrana espermática e a

sua resposta ao meio hipoosmótico, apesar de não afectar as propriedades da membrana envolvidas no processo de fertilização (Hauser *et al.*, 1992). Para avaliar o sémen congelado com o teste de endosmose, evitando o choque osmótico causado pelo meio de criopreservação hipertónico, Correa *et al.* (1997b) sugerem, para sémen de bovino, a remoção deste meio, processamento do sémen a 21°C e HOST a 37°C. Rodrigues (2001), utilizando a prova de endosmose sem remoção do meio, não encontrou diferenças entre este teste e o teste de fluorescência quando avaliada a viabilidade espermática após descongelação, tendo mesmo determinado correlações entre este último teste e as provas de endosmose ( $r=0,7$ ), coloração vital ( $r=0,61$ ) e mobilidade individual ( $r=0,5$ ).

Há ainda outras provas, mais sofisticadas, possíveis de utilizar. Podemos citar, como exemplos, a CASA (*computer automated semen analyzers*), em que são avaliadas a concentração, mobilidade e morfologia do sémen por equipamentos electrónicos (Bearden e Furquay, 1997d), e a fertilização *in vitro* de oócitos de hamster (Choudhry *et al.*, 1995). É possível também avaliar a integridade da membrana e estado de capacitação após descongelação por ensaio com clortetraciclina (Maxwell e Watson, 1996; Gil *et al.*, 2000).

### **1.6.3 Sincronização deaios para inseminação artificial**

Para que a aplicação do sémen por inseminação artificial seja efectiva, é vantajoso recorrer à indução e sincronização do cio, para garantir que o sémen é aplicado na altura correcta em relação à ovulação. Por outro lado, devido à dimensão de alguns efectivos, esta prática é útil porque permite inseminar várias fêmeas com horas de cio muito aproximadas (Anel, 1992). As hormonas que se utilizam são variadas, mas caem dentro de um dos seguintes grupos: gonadotrofinas e seus substitutos, progestagénios e prostaglandinas.

As gonadotrofinas LH e FSH são difíceis de obter e mais caras, pelo que se utilizam substitutos, nomeadamente eCG (*equine chorionic gonadotrophin*), também chamada PMSG (*pregnant mare serum gonadotrophin*), ou a hCG (*human chorionic gonadotrophin*). A eCG tem uma acção similar à da LH e FSH, embora predomine a desta última (Reeves, 1987; Hafez *et al.*, 2000). A hCG tem mais actividade luteotrópica e pouca actividade FSH (Hafez *et al.*, 2000). Talvez por esta razão, Fukui *et al.* (2001) utilizando sincronização com hCG

conseguiram estimular o corpo lúteo, aumentando os níveis de progesterona, mas não melhoraram os valores de fertilidade.

A utilização destes produtos visa estimular o crescimento folicular, associando-se a tratamentos prévios com progestagénios, permitindo aumentar os índices reprodutivos (Langford *et al.*, 1982, 1983; Vázquez *et al.*, 2001). A eCG é mundialmente a hormona mais utilizada com este fim (Keisler e Buckrell, 1997; Sharkey *et al.*, 2001) e alternativamente pode ser usada a hCG. A FSH é usada mais em programas de superovulação, sendo aplicada cada 12 horas em várias administrações (Forcada e Abecia, 2000).

Dentro dos progestagénios, os mais usados em ovinos são o acetato de fluorogestona (FGA) e o acetato de medroxiprogesterona (MAP), geralmente incorporados em esponjas vaginais (Fukui *et al.*, 1999) e o acetato de melengesterol, por via oral. Alternativamente às esponjas vaginais há também os dispositivos de libertação intravaginal ou CIDR (*controlled internal drug-release dispenser*) e a aplicação de implantes subcutâneos auriculares de norgestomet (3 mg em ovinos; Keisler e Buckrell, 1997; Sharkey *et al.*, 2001).

A utilização do progestagénio tenta simular a presença de um corpo lúteo funcional, promovendo um retrocontrolo negativo na adenohipófise e consequente supressão de actividade reprodutiva, por inibição de secreção de gonadotrofinas, passando a frequência de pulsos de LH a 1 por mais de três horas (Sebastian *et al.*, 1995). O implante deve ser mantido entre 10 a 14 dias, correspondendo à duração aproximada de um corpo lúteo (Fitzgerald e Stellflug, 1998; Sharkey *et al.*, 2001). A estimulação do sistema nervoso central pelos progestagénios é essencial para que haja depois manifestação de cio por acção dos estrogénios, razão porque a ovulação não precedida de progesterona é muitas vezes denominada silenciosa (Reeves, 1987; Chemineau *et al.*, 1991). Quando o dispositivo é retirado, a actividade reprodutiva reinicia-se (Noakes, 2001a) e o cio surge geralmente 24 a 56 horas depois (Sharkey *et al.*, 2001), ocorrendo a ovulação 48 a 72 horas após essa remoção (Hafez *et al.*, 2000).

Os progestagénios usam-se mais frequentemente durante 12 a 14 dias, administrando-se 400 a 800 UI de eCG, 48 ou 24 horas antes, ou na altura da retirada da esponja (Fitzgerald e Stellflug, 1998; Jainudeen *et al.*, 2000; Sharkey *et al.*, 2001). A posologia da eCG deve ser

ajustada ao peso do animal, à raça e à Estação do ano, na medida em que um aumento da dose pode aumentar a taxa de ovulação a níveis não pretendidos. De facto, existe maior resposta à eCG na época mais favorável à reprodução e a resposta ovárica acompanha a dose de eCG (Evans e Robinson, 1980; Gherardi e Lindsay, 1980; McDonald, 1986; Sebastian *et al.*, 1995). Doses acima de 800 UI são contraproducentes porque afectam os mecanismos responsáveis pela libertação de LH (Evans e Robinson, 1980). Hill *et al.* (1998) obtiveram melhor fertilidade com aplicação de 300 UI de eCG e Gerardi (1980, citado por Hill *et al.*, 1998) refere que uma dose de 400 UI promove aumento da taxa de ovulação, com consequente aumento dos partos múltiplos. Marines *et al.* (1988) conseguiram os melhores resultados de fertilidade utilizando 60 mg de MAP e 400 UI de eCG, em ovelhas fora da época reprodutiva favorável. Por outro lado, na inseminação laparoscópica, Eppleston e Roberts (1986, citados por Salamon e Maxwell, 1995b) obtiveram os melhores resultados em ovelhas sincronizadas com FGA.

Sharkey *et al.* (2001) referem não haver vantagem em administrar eCG antes da retirada da fonte de progestagénio, a não ser em programas de superovulação ou sincronização de receptoras de embriões. Em ovelhas tratadas com progestagénio durante 12 dias e em que foram administradas várias posologias de eCG, o valor com melhor manifestação de estro (97%) foi obtido com doses de 400 UI, tendo-se observado também nestes animais o menor intervalo ( $40,4 \pm 10,3$  horas) entre o tratamento e início do estro (Dias *et al.*, 2001).

Maxwell e Hewitt (1986) descrevem sincronização em ovelhas com esponjas impregnadas com progestagénios durante 12 dias, administração de 400 UI de PMSG na altura de retirada da esponja, sendo colocados os carneiros vasectomizados até à altura da inseminação. Em fêmeas tratadas hormonalmente com progestagénios e eCG, a introdução dos machos leva à concentração das ovulações que permite o uso de inseminação artificial com sémen congelado a hora precisa que, de acordo com Lucidi *et al.* (2001), é de 50 horas após remoção das esponjas. Fitzgerald e Stellflug (1998) e Jainudeen *et al.* (2000), por seu lado, referem que a inseminação artificial deve ser realizada respectivamente 52 a 56 horas ou 48 a 60 horas após retirada da esponja. Anel *et al.* (1992) indicam um período bem mais amplo de aplicação do sémen: 48 a 80 horas após a retirada da fonte de progestagénio. Mylne *et al.* (1997) recomendam a utilização do progestagénio durante 12 a 14 dias, sendo aplicadas 300 a 500 UI de eCG na altura da retirada das esponjas e 24 horas depois colocados os carneiros

vasectomizados. Segundo os mesmos autores, a inseminação artificial deve ser realizada 48 horas (sémen fresco) ou 53-58 horas (sémen congelado) após a retirada das esponjas.

Fukui *et al.* (1999) não encontraram diferenças na fertilidade à inseminação laparoscópica com sémen congelado usando vários tipos de progestagénios intravaginais (MAP, FGA, CIDR, progesterona), embora tenham registado tempos diferentes de início de estro e pico de LH, recomendando que, tendo em conta este parâmetro, se deve antecipar a inseminação quando se usa CIDR ou progesterona.

As prostaglandinas,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e seus análogos, actuam por acção luteolítica, tornando-se essencial a existência de um corpo lúteo para serem efectivos. Por esta razão, só podem ser administrados a fêmeas cíclicas, enquanto os progestagénios podem ser usados nas cíclicas e nas que estejam em anestro (Keisler e Buckrell, 1997; Forcada e Abecia, 2000; Jainudeen *et al.*, 2000). O corpo lúteo é sensível às prostaglandinas 4 a 5 dias após o estro e novo estro é observado 30 a 48 horas após a administração do fármaco (Keisler e Buckrell, 1997; Sharkey *et al.*, 2001). Para obviar a necessidade de existência de um corpo lúteo funcional, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pode ser usada em combinação com progestagénios, com resultados efectivos quando estes são usados durante apenas 7 dias, afectando menos a função ovárica (Fitzgerald *et al.*, 1985; Fitzgerald e Stellflug, 1998). Outro método de administração da prostaglandina, com perto de 100% de eficácia em ovelhas cíclicas é a administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  com um intervalo de 9 a 11 dias (Keisler e Buckrell, 1997; Fitzgerald e Stellflug, 1998; Jainudeen *et al.*, 2000; Sharkey *et al.*, 2001).

#### **1.6.4 Métodos de inseminação artificial**

Na ejaculação, aquando da cópula, pretende-se que o sémen seja colocado de forma a possibilitar a fecundação do ócito, que se dá no oviducto da fêmea. O local de deposição do sémen varia de espécie para espécie e nos pequenos ruminantes a deposição natural faz-se na vagina anterior (Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Maxwell e Salamon, 1993). Em qualquer dos casos, em monta natural o número de espermatozóides colocados pelo macho é da ordem de  $3\text{-}5 \times 10^9$ , enquanto na inseminação artificial o número utilizado é muito inferior (Courot, 1979; Paulenz *et al.*, 2002). Chemineau *et al.* (1991) referem que é necessário serem depositados um mínimo de  $60 \times 10^6$  espermatozóides para que a fertilidade

seja máxima e Evans e Maxwell (1987) referem  $20 \times 10^6$ . No entanto, na prática, utiliza-se normalmente mais de metade desta quantidade (Eppleston e Maxwell, 1995). López (1991) refere que doses de sémen constituídas pela mistura de sémen de vários machos têm mais sucesso e que as raças prolíficas apresentam melhores resultados que as não-prolíficas.

Como, durante a inseminação artificial, há uma quebra no número de espermatozóides viáveis que podem chegar até ao local de fecundação (âmpola do oviducto) e esta quebra é maior, por exemplo quando utilizamos sémen congelado, o local de deposição deve ser escolhido em função do tipo de sémen a aplicar. A inseminação artificial pode ser feita pelas vias vaginal, cervical, transcervical ou intrauterina.

#### **1.6.4.1 Inseminação vaginal**

Na via vaginal, conforme o nome sugere, o sémen é depositado na vagina. Utiliza-se esta técnica somente para aplicação de sémen fresco, já que a taxa de fertilidade com sémen congelado é inaceitável (Mylne *et al.*, 1997; Parkinson, 2001c). O número de espermatozóides a aplicar, para melhores resultados, deve ser de 150 a  $300 \times 10^6$ , contidos num volume de 0,30-0,50 ml (Evans e Maxwell, 1987; Paulenz *et al.*, 2002). Anel *et al.* (1995) indicam doses de  $100 \times 10^6$  para sémen fresco diluído e  $400 \times 10^6$  espermatozóides para sémen refrigerado, aplicadas 54 a 58 horas após retirada das esponjas de progestagénio. O método é simples, sendo a fêmea contida em estação e o sémen aplicado na vagina, sem uso de espéculo e sem tentativa de localizar a entrada do cérvix. Por esta razão, tem as grandes vantagens de envolver menos perícia, menos *stress* para as ovelhas, permitindo inseminação em larga escala com sémen fresco (Maxwell, 1986). Uma desvantagem desta via é que, como a quantidade de espermatozóides a aplicar é grande, cada ejaculado só permite inseminar 3 a 5 fêmeas (Mylne *et al.*, 1997).

#### **1.6.4.2 Inseminação cervical**

A via cervical é aquela em que aplicamos o sémen no orifício cervical e pode ser utilizada com sémen fresco, refrigerado ou mesmo congelado. A aplicação do sémen é feita com a ovelha posicionada com a parte caudal mais elevada e com auxílio de um espéculo e fonte de luz. Esta técnica tem a grande vantagem de ser rápida e não invasiva (Donovan *et al.* 2001).

Consegue-se uma boa taxa de fertilidade na inseminação cervical com doses de sémen fresco contendo  $100 \times 10^6$  espermatozóides (Mylne *et al.*, 1997), que é o valor mínimo de segurança referido por Evans e Maxwell (1987), sendo a sua aplicação limitada para sémen congelado (Angulo *et al.*, 1995; Salamon e Maxwell, 1995a; Maxwell e Watson, 1996). Por esta razão, Evans e Maxwell (1987) referem doses de 100, 150 ou  $180 \times 10^6$  espermatozóides para sémen fresco, refrigerado ou congelado, respectivamente. Paulenz *et al.* (2002), aplicando doses contendo  $150 \times 10^6$  e  $75 \times 10^6$  espermatozóides, não obtiveram diferenças utilizando a via cervical ou a vaginal, mas conseguiram melhores resultados com a dose contendo mais espermatozóides. Langford *et al.* (1982) afirmam não obter melhoria na fertilidade utilizando dupla inseminação após sincronização, pelo que a utilização de uma inseminação única é preferível e permite aumentar o número de ovelhas inseminadas.

Apesar das limitações encontradas, estão descritos nalguns casos, resultados satisfatórios de fertilidade à inseminação cervical (25 a 65%), mesmo com sémen congelado (Donovan *et al.*, 2001). Evans e Maxwell (1987) referem valores de fertilidade máximos de 50 a 55% com sémen congelado, enquanto com sémen refrigerado se conseguem valores de 65 a 75%. Ritar e Ball (1993), por outro lado, indicam 33,3% e 47,2% de fertilidade com sémen refrigerado e congelado, respectivamente.

#### **1.6.4.3 Inseminação transcervical**

O cérvix das ovelhas tem cerca de 7 cm de comprimento e apresenta uma série de 4 a 8 anéis que obliteram a comunicação utero-vaginal e tornam a inseminação transcervical muito difícil (Anel, 1992; Mylne *et al.*, 1997). Além disto, regista-se uma diminuição do número de espermatozóides aplicados na zona do cérvix quando as ovelhas são sincronizadas (Hawk *et al.*, 1981). Anel (1992) considera que a técnica óptima de inseminação artificial deve permitir aceder ao útero por via vaginal. Uma forma de ultrapassarmos o obstáculo criado pela anatomia do cérvix ovino na inseminação é utilizar a via transcervical, em que o sémen é aplicado com auxílio de *forceps* que se colocam no espéculo vaginal e seguram e retraem o cérvix (Halbert *et al.*, 1990a). Depois é possível introduzir um *pistolet* de inseminação que, por movimentos de rotação, se faz passar através dos anéis do cérvix. A deposição do sémen faz-se no corpo do útero. A técnica é relativamente rápida, demorando uma média de 5,8 minutos (Buckrell *et al.*, 1994). Com este método, podemos conseguir penetrar o cérvix de

88% das ovelhas (Buckrell *et al.*, 1994), o que pode ser facilitado se utilizarmos ocitocina para relaxamento do cérvix (Kalifa *et al.*, 1992). Contudo, está referido que o uso desta hormona reduz as taxas de fertilidade e de prolificidade (Stellflug *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos da inseminação transcervical com sémen congelado têm sido inferiores aos da inseminação laparoscópica intra-uterina (Halbert *et al.*, 1990b; Windsor *et al.*, 1994). No entanto, os factores que condicionam a maior ou menor penetração do cérvix, como sejam o intervalo ao último parto e a experiência do técnico, podem melhorar estes resultados, já que quanto maior a penetração conseguida, melhores os resultados (Husein *et al.*, 1998; Halbert *et al.*, 1990b; Buckrell *et al.*, 1994; Salamon e Maxwell, 1995b; Windsor, 1995). O mesmo é referido por Eppleston *et al.* (1994), que afirmam haver um aumento de 7 a 12% na fertilidade por cada centímetro de penetração cervical. Também a quantidade de espermatozóides por dose pode influenciar a fertilidade, estando indicados valores de  $200 \times 10^6$  para sémen congelado (Husein *et al.*, 1998). Referem-se valores de fertilidade utilizando esta via de 40-80% para sémen fresco e de 30-70% para sémen congelado (Mylne *et al.*, 1997). Windsor *et al.* (1994), utilizando uma técnica de inseminação transcervical intrauterina conseguiram resultados similares aos da inseminação laparoscópica intrauterina com sémen congelado.

#### **1.6.4.4 Inseminação intrauterina**

Nos casos em que o número de espermatozóides viáveis que vamos colocar é menor, ou em que necessitamos aumentar as possibilidades de êxito, devemos recorrer à via intrauterina, isto é, fazer a deposição do sémen directamente no lúmen do útero, perto do local onde ocorre a fecundação. A laparoscopia pode ser considerado o método mais seguro de inseminação intrauterina (Salamon e Maxwell, 2000). Além disso, reduz os problemas de mortalidade embrionária associados à inseminação por laparotomia (Miller, 1986).

Esta técnica é a que se utiliza quando o valor do sémen é maior e quando se quer aplicar sémen congelado em ovinos, devido aos baixos valores de fertilidade que se conseguem com outras vias nesta espécie (Armstrong e Evans, 1984). É uma técnica cirúrgica invasiva, mas que pode ser aplicada perfeitamente em condições de campo, com riscos mínimos para a fêmea, com cadências de 2 a 3 minutos por fêmea (Anel *et al.*, 1992), permitindo inseminar 300 ou mais fêmeas por dia (Mylne *et al.*, 1997). Hill *et al.* (1998) referem que o aumento da



velocidade de inseminação laparoscópica não está associado ao aumento dos erros pelo operador, já que o aumento dos tempos pode significar maiores dificuldades na técnica (animais gordos, bexigas cheias, etc.) ou no manejo dos animais. Referem também que uma estratégia para aumentar a velocidade de inseminação intrauterina por laparoscopia consiste em inseminar só um corno uterino (Hill *et al.*, 1998).

Devem aplicar-se doses de  $20-40 \times 10^6$  espermatozóides, com sémen fresco, refrigerado ou congelado, inseminando-se uma dose de 0,05 a 0,10 ml por corno uterino (Evans e Maxwell, 1987; López, 1991; D'Alessandro *et al.*, 2001). Anel *et al.* (1995) referem mesmo que se podem aplicar doses de 0,025 ml por corno uterino sem afectar a fertilidade. A aplicação de doses com quantidades de espermatozóides móveis superiores a 20 ou  $40 \times 10^6$  não permite aumentar a taxa de fertilidade (Salamon *et al.*, 1985, Valée *et al.*, 1987, citados por Salamon e Maxwell, 1995b). Também a utilização de duas inseminações não melhora a taxa de fertilidade e, se houver melhorias, devem-se essencialmente à maior quantidade de espermatozóides que se utiliza (Salamon e Maxwell, 1995b, 2000).

Esta técnica permite boas taxas de fertilidade, mesmo com sémen congelado. Fitzgerald e Stellflug (1998) referem valores de 70-85% com doses de 70 a  $100 \times 10^6$  espermatozóides móveis e outros autores indicam fertilidade de 55-85% (vários, citados por Anel, 1992), ou 60-75% (Evans e Maxwell, 1987). Hill *et al.* (1998) registaram fertilidades de 82,2% e 71,6% na inseminação intrauterina por laparoscopia, usando sémen fresco e congelado, respectivamente e Anel *et al.*, (1992) conseguiram 63% de fertilidade em ovelhas de raça Churra em Castilla León aplicando sémen congelado por laparoscopia *versus* 38% através de inseminação cervical com sémen refrigerado.

O momento da deposição do sémen é vital quando este se utiliza congelado, já que o tempo de sobrevivência deste tipo de sémen é menor que quando se utiliza sémen fresco. Os espermatozóides encontram-se num estado de maturação mais avançado no trato genital da fêmea, no caso do sémen congelado devido à reacção do acrossoma e capacitação estarem completas, conforme já referido (Gillan *et al.*, 1999). Por outro lado, quando há desfazamento entre o tempo de vida do espermatozóide e do oócito, aumenta a mortalidade embrionária (Schleicher and Brückner, 1973, Maxwell *et al.*, 1984a,b, Maxwell, 1986a, citados por Salamon e Maxwell, 1995b). Nas técnicas que se praticam com sémen não congelado é

necessário um tempo de espera para capacitação. Garde *et al.* (1993) referem que este facto pode ser responsável por se conseguirem melhores resultados de fertilidade na inseminação intrauterina com sémen congelado (67,58%) do que na inseminação cervical com sémen refrigerado (51,75%), o que é referido também por Anel *et al.* (1992) e por Salamon e Maxwell (1995a). A inseminação intrauterina permite uma sincronização entre o momento de ovulação e a colocação dos espermatozóides no útero, reduzindo a quantidade necessária de sémen e colocando uma maior proporção de espermatozóides capacitados com poder fecundante.

Walker *et al.* (1989, citados por Hill *et al.*, 1998) referem inseminação intrauterina com sémen congelado 48 a 56 h após retirada das esponjas de progestagénio, que é a altura média de ocorrência da ovulação. Salamon e Maxwell (2000) indicam que a altura óptima está compreendida entre 48 e 65 horas após retirada das esponjas, o que está de acordo com a referência de Maxwell e Hewitt (1986) que indicam 60 horas após retirada das esponjas e administração de eCG. Também Findlater *et al.* (1988) referem este tempo com o mesmo tipo de tratamento hormonal (conseguindo fertilidade de 63% e fecundidade de 195%), tendo os animais ovulado às  $61,8 \pm 0,67$  horas após a retirada das esponjas. Eppleston e Roberts (1986) afirmam que os resultados de inseminação entre as 48 e 60 horas podem variar de acordo com o tipo de progestagénio usado, tendo o uso de MAP conseguido melhores resultados mais próximo das 60 horas. Como se verifica, pode existir uma grande amplitude de horário para aplicação do sémen congelado por via laparoscópica e a sua aplicação pode ser mesmo mais efectiva após a ovulação (Maxwell, 1986), já que a fertilidade do oócito se mantém 15 a 24 horas após a ovulação (Dzuik, 1965, citado por Maxwell, 1986; Chemineau *et al.*, 1991). Por outro lado, diferenças que se verificam podem ser justificadas pela variabilidade na altura de ovulação nas várias raças e localizações geográficas (Salamon e Maxwell, 1995b).

#### **1.6.4.4.1 Técnica de inseminação laparoscópica**

Para realização desta técnica, necessita-se principalmente do material de laparoscopia que consiste num endoscópio ou laparoscópio (normalmente de 7 a 10 mm), ligado a uma fonte de luz fria por um cabo de fibra óptica e duas cânulas com trocárter, uma para introduzir a pipeta de inseminação e outra para o laparoscópio. É necessário ainda uma fonte de gás (CO<sub>2</sub> ou ar

filtrado), para causar pneumoperitoneu, que facilita a técnica. (Evans e Maxwell, 1987; Anel *et al.*, 1995; Fitzgerald e Stellflug, 1998).

Para reduzir o conteúdo ruminal e vesical, as ovelhas devem estar em jejum 12 a 24 horas antes da cirurgia (Chemineau *et al.*, 1991; Mylne *et al.*, 1997), podendo mesmo as fêmeas secas realizar jejum de 36 horas (Anel *et al.*, 1995).

As ovelhas são sedadas, com 5 a 10 mg de acepromazina I.M. ou com 5 mg de diazepam I.V. e preparadas para a cirurgia por tricotomia, 10 a 15 cm cranialmente ao úbere, sendo a zona desinfetada com solução iodada e álcool (Mylne *et al.*, 1997; Fitzgerald e Stellflug, 1998). São depois colocadas em mesas de laparoscopia com uma inclinação de 40 a 45° (Chemineau *et al.*, 1991; Mylne *et al.*, 1997). A inclinação dos animais e a insuflação com ar vão permitir um deslocamento das vísceras cranialmente, o que facilita o acesso ao aparelho reprodutor (Anel *et al.*, 1995). O local de incisão deve ser infiltrado com anestésico local, sendo depois colocados os trocarteres, um para a óptica e outro para uma pinça e pipeta de inseminação, que deve ser colocados 5 a 7 cm cranialmente ao úbere e 3 a 4 cm lateralmente à linha branca (Mylne *et al.*, 1997).

Após visualização do aparelho reprodutor, coloca-se a pipeta de inseminação através do trocarter e deposita-se o sémen no útero, entre a junção utero-tubal e a bifurcação do útero, não devendo haver resistência ao empurrar o êmbolo da pipeta. A aplicação do sémen pode ser distribuída pelos dois cornos uterinos (Evans e Maxwell, 1987), embora resultados mais recentes indiquem que a aplicação unilateral do sémen não apresente diferenças na fertilidade em relação à aplicação bilateral (Perkins *et al.*, 1996). Eppleston *et al.* (1994), além disto, indicam que não há diferenças entre a aplicação do sémen no corno uterino ou no corpo. Podem observar-se também as estruturas presentes nos ovários (Anel *et al.*, 1995).

Para finalizar, retiram-se os trocarteres, expulsa-se o gás e suturam-se os locais de punção, podendo ser então efectuada antibioterapia profilaticamente (Chemineau *et al.*, 1991). As ovelhas devem ficar estabuladas para recuperação durante 2 ou 3 horas, administrada comida e água, não devendo ser transportadas antes de 48 horas (Evans e Maxwell, 1987; Fitzgerald e Stellflug, 1998).

### 1.6.5 Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes

O diagnóstico de gestação é útil porque permite determinar precocemente qual o resultado a obter aquando das parições. É possível conhecer a fertilidade mais cedo, o que permite, por exemplo, estipular o manejo alimentar segundo o estado fisiológico, ou preparar novas cobrições das ovelhas não gestantes. Os métodos que se utilizam podem incluir, entre outros, o doseamento de hormonas sexuais, a ultrassonografia, a radiografia e mesmo a laparoscopia, embora os mais comumente usados sejam os dois primeiros (Evans e Maxwell, 1987; Jainudeen e Hafez, 2000; Noakes, 2001b).

Os níveis séricos de progesterona no dia 18 ou 19 após inseminação são muito superiores nas ovelhas gestantes, que se consideram positivas quando o valor é superior a 1 ng/ml (Chemineau *et al.*, 1991; Cunningham e Marsh, 1997). Este método tem uma fiabilidade de 90%, já que podem ocorrer casos de ovelhas com níveis de progesterona inferiores a 1 ng/ml que estejam grávidas. Não permite também distinguir um animal gestante de um em fase lútea do ciclo (Halbert *et al.*, 1990b; Chemineau *et al.*, 1991). É possível que ocorra morte embrionária precoce ou que haja ovelhas que são inseminadas sem estarem em cio (Halbert *et al.*, 1990b). Outro método hormonal a que se pode recorrer é o doseamento de estrogénios, produzidos pela placenta. É muito rigoroso (99% de certeza), mas é algo tardio, já que se realiza a partir dos dias 40 a 50 após inseminação (Chemineau *et al.*, 1991; Jainudeen e Hafez, 2000).

A necessidade de efectuar um diagnóstico de gestação, conduziu ao estabelecimento de técnicas recorrendo aos ultra-sons. Desenvolveram-se fundamentalmente três tipos, um recorrendo ao efeito *Doppler*, em que há amplificação de sons característicos como o batimento cardíaco, e outras duas recorrendo ao efeito ecográfico dos ultra-sons quando atravessam meios de diferente densidade (Noakes, 2001b). O método ecográfico pode ser unidimensional (modo A: modo de amplitude), ou bidimensional (modo B: modo contraste). Este último método permite imagem em tempo real e tornou-se de eleição para o diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes, já que permite uma cadência de 250 a 300 ovelhas por hora e precisão de 95 a 98%, para operadores treinados (Russel e Goddard, 1995; Cunningham e Marsh, 1997; Jainudeen e Hafez, 2000; Noakes, 2001b; Sharkey *et al.* 2001).

Os ecógrafos do tipo B consistem essencialmente de um gerador de pulso, um transdutor (sonda), um conversor e um écran, e trabalham com pulsos de milisegundos de altas frequências (3,5 a 7,5 MHz), o que permite a formação de ultrasons e consequentemente de imagem quando o eco chega ao transdutor (Jainudeen e Hafez, 2000). Quanto menor a frequência usada, maior a penetração que se consegue nos tecidos, diminuindo contudo a definição. Normalmente utilizam-se frequências de 3,5 MHz para ecografias transabdominais e 7,5 MHz para ecografias transrectais, embora os transdutores de 5 MHz possam ser mais versáteis e por isso muito utilizados em pequenos ruminantes (González de Bulnes *et al.*, 1999a). As sondas utilizadas podem ser lineares ou sectoriais (com ângulos de 75° a 180°), sendo as lineares mais versáteis, permitindo também o uso transrectal (Cunningham e Marsh, 1997; Sharkey *et al.*, 2001). Um terceiro tipo de sondas, menos difundido, é composto pelas sondas anulares, com vários anéis concêntricos que permitem melhorar as características das anteriores (González de Bulnes *et al.*, 1999a).

Nos ovinos, para execução da técnica transabdominal a fêmea deve estar em jejum há 12 a 24 horas em estação, colocando-se o operador caudalmente (González de Bulnes *et al.*, 1999b; Sharkey *et al.*, 2001). Depois lubrifica-se a sonda e a zona de contacto com um gel lubrificante, de modo a garantir que se mantém o contacto, já que as ondas sonoras propagam-se mais facilmente pelo gel do que pelo ar. A zona de eleição é a zona glabra inguinal, adjacente ao úbere, embora se melhore a precisão retirando o pêlo alguns centímetros cranialmente ao úbere (Russel e Goddard, 1995; Cunningham e Marsh, 1997). Na técnica transrectal a ovelha é colocada em estação ou em decúbito dorsal, e a sonda lubrificada é inserida até ser observada a bexiga. Depois movimenta-se a sonda em arco, de modo a varrer o abdómen caudal. O útero localiza-se dorsalmente à bexiga até aos 21 dias de gestação; após esta altura vai descendo ventralmente e em fases mais avançadas de gestação é difícil de visualizar com o animal em estação. (Chemineau *et al.*, 1991; Jainudeen e Hafez, 2000). Gearhart *et al.* (1988) referem que dos dias 25 a 50 se consegue detectar mais correctamente o estado de gestação pela abordagem transabdominal (89,8%) do que pela transrectal (64,8%) e garantem mesmo que a primeira técnica permite uma precisão de 100% a partir do dia 46 de gestação. Fowler e Wilkins (1984) referem que dos 46 aos 106 dias a precisão é de 99,4%. Estas afirmações condizem com o referido por Buckrell (1988), que indica os 45-50 dias como o tempo ideal para fazer este diagnóstico.

Há vários sinais positivos de gestação que devemos tentar observar, de acordo com o número de dias de gestação. A vesícula embrionária é a primeira estrutura que pode ser observada, logo desde os 21 dias transrectalmente; as estruturas embrionárias ecogénicas notam-se desde os dias 23 a 30, podendo ser contados os fetos aos 30-40 dias (Sharkey *et al.*, 2001). No entanto, quando se efectua o diagnóstico de gestação precocemente, a precisão é mais elevada (90%) dos dias 32 a 34 (García *et al.*, 1993). Mais tardiamente (dos 22 aos 44 dias) notam-se os placentomas, com uma forma típica de C, e o esqueleto do feto, mais facilmente visível a partir do 45º dia (Sharkey *et al.*, 2001). A observação do feto e placentomas transabdominalmente, a partir dos 45-50 dias, permite uma precisão de diagnóstico de 100% (Jainudeen e Hafez, 2000), apesar de haver autores que referem a mesma precisão logo aos 24 dias com sondas de 7,5MHz (Santiago Moreno *et al.*, 1995a, Martíñez *et al.*, 1998, citados por González de Bulnes *et al.*, 1999c). Para estimativa do número de fetos, a ecografia deverá ser realizada dos 50 aos 100 dias de gestação (Russel e Goddard, 1995). Embora esta contagem possa ser feita logo desde os dias 35-40, a precisão é baixa e a partir dos 90 dias a contagem torna-se difícil devido ao aumento do tamanho dos fetos e do útero (Cunningham e Marsh, 1997; González de Bulnes *et al.*, 1999c). Gearhart *et al.* (1988) referem que no dia 75 se consegue um diagnóstico sem falhas quando pretendemos diferenciar ovelhas com um ou dois fetos, mas a distinção de números superiores já não é tão correcta (Fowler e Wilkins, 1984).

## **2. EFEITO DO TRATAMENTO COM IMPLANTES DE MELATONINA EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE CARNEIROS DA RAÇA MERINA PRETA E CAMPANIÇA**

### **2.1 Resumo**

As raças ovinas Merina Preta e Campaniça, existentes sobretudo no Sul de Portugal são tradicionalmente utilizadas em reprodução durante a Primavera, que é uma época considerada menos favorável à reprodução nesta espécie, sobretudo em latitudes mais elevadas. Esta sazonalidade é condicionada pelo fotoperíodo e, recorrendo a tratamentos com melatonina, associada ou não a tratamentos luminosos, é possível simular as condições fotoperiódicas da época mais favorável na qual se notam melhores *performances* em carneiros.

Neste estudo pretendemos determinar se a administração contínua de melatonina, a machos das duas raças autóctones referidas, causa alterações em características reprodutivas durante a Primavera. Para isso, utilizaram-se 12 carneiros de raça Merina Preta, dos quais 6 controlo (GPC; n=6) e 6 tratados com a hormona (GPT; n=6) e ainda carneiros de raça Campaniça (GCT; n=7), também tratados. O tratamento iniciou-se em Março pela colocação de 3 implantes subcutâneos de melatonina a cada animal, avaliando-se os carneiros durante 13 semanas consecutivas em relação a características morfológicas (perímetro testicular) e a vários parâmetros de avaliação de sémen (volume, concentração, mobilidade individual, coloração vital, teste de endosmose, percentagem de anomalias).

Analisando os dados, por comparação entre os vários grupos, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para qualquer dos caracteres entre animais tratados e não tratados com melatonina (GPT *vs.* GPC) e entre as duas raças (GPT *vs.* GCT). Notaram-se diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre algumas semanas de colheita para perímetro testicular, concentração, mobilidade individual e coloração vital. A ausência de diferenças estatísticas entre animais tratados ou não com melatonina e entre as raças, poderá dever-se à menor sazonalidade destas raças ovinas na latitude do Sul de Portugal.

Avaliaram-se também acessoriamente as correlações entre os vários caracteres, com o valor significativo ( $p < 0,001$ ) mais elevado obtido entre a mobilidade individual e o teste de coloração vital ( $r = 0,64$ ), o que está de acordo com o esperado.

Concluimos que o tratamento de carneiros das raças Merina Preta e Campaniça com melatonina não causa alteração nas características reprodutivas desses animais durante a Primavera, devido à menor sazonalidade reprodutiva destas espécies na latitude do Sul de Portugal.

**Palavras-chave:** Campaniça, Carneiro, Melatonina, Merina Preta, Sazonalidade, Sémen.

## 2.2 Introdução

Na espécie ovina, a manifestação de sazonalidade é um dos factores que condicionam a produtividade desta espécie, já que pode restringir a época reprodutiva a períodos determinados, variáveis com a latitude e com as várias raças ovinas (Ortavant *et al.*, 1985; Sebastian, 1989b; Chemineau *et al.*, 1991; Stellflug *et al.*, 1997; Forcada *et al.*, 2000a). No caso do carneiro, foi demonstrada alguma sazonalidade em raças autóctones (Baptista e Mascarenhas, 1977; Cruz e Silva, 1991; Bettencourt, 1999). Este facto pode fazer diminuir o desempenho sexual em épocas menos favoráveis, como a Primavera, conforme foi demonstrado também noutras latitudes, nas quais os machos são utilizados, tanto em cobrição natural como recorrendo à inseminação artificial (Colas, 1981; Boland *et al.*, 1985; Evans e Maxwell, 1987; Guerin, 1990; Chemineau *et al.*, 1992; Gerlach e Aurich, 2000; Hafez e Hafez, 2000b).

Em trabalhos anteriores encontraram-se diferenças entre Estações, para vários parâmetros reprodutivos, com resultados geralmente inferiores na Primavera. Podem-se referir, nomeadamente, variações nos níveis de testosterona (Baptista e Mascarenhas, 1977; Pelletier *et al.*, 1982; Bettencourt, 1999), no perímetro testicular (Dýrmundsson *et al.*, 1981; Cruz e Silva, 1991; Kimberling e Marsh, 1997; Parkinson, 2001b; Sharkey *et al.*, 2001), na produção espermática (Dacheux *et al.*, 1981), no volume (Cruz e Silva, 1991; Rescalvo *et al.*, 1993; Ibrahim, 1997), na concentração (Baptista e Mascarenhas, 1977; Cruz e Silva, 1991; López, 1991; Rescalvo *et al.*, 1993; Ibrahim, 1997), na mobilidade massal (Cruz e Silva, 1991) e na



percentagem de anomalias espermáticas (Baptista e Mascarenhas, 1977; Colas, 1980, 1981; Guerin, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Cruz e Silva, 1991; López, 1991).

Para contrapor a este factor natural, têm-se procurado técnicas de manejo reprodutivo que contornem a sazonalidade, baseadas no conhecimento de que o fotoperíodo é o principal elemento responsável por estas variações (Ortavant *et al.*, 1985; Chemineau *et al.*, 1991; Malpaux *et al.*, 1996; Fitzgerald, 1997; Gerlach e Aurich, 2000; Hafez e Hafez, 2000b). Assim, foi possível melhorar os desempenhos reprodutivos de carneiros quer submetendo-os a restrições de luminosidade (Schanbacher, 1979; Pézavent e Chemineau, dados não publicados, 1990, citados por Chemineau *et al.*, 1992; Thimonier 1996), quer fazendo alternar períodos de “dias longos” e “dias curtos” (Almeida e Pelletier, 1988; Chemineau *et al.*, 1992, 1996; Pelletier e Almeida, 1987, citados por Gerlach e Aurich, 2000).

A descoberta da modulação da sazonalidade pela melatonina (Wayne *et al.*, 1988; Deveson *et al.*, 1992; Hafez *et al.*, 2000) e a efectividade do uso de implantes sub-cutâneos para simular um fotoperíodo curto (Lincoln e Ebling, 1985; Hanif e Williams, 1991), perfila a utilização desta hormona como potencial para melhorar as *performances* reprodutivas de ovinos em alturas menos favoráveis. A aplicação dos implantes deve ser feita algumas semanas antes de pretendidos os efeitos, já que a sensibilização do sistema neuro-endócrino é demorada. Em fêmeas nota-se estimulação da secreção de LH 40 a 60 dias após a aplicação dos implantes (Viguié *et al.*, 1995, citados por Forcada *et al.*, 2000a; Bittman *et al.*, 1985, citados por Forcada *et al.*, 2000b), sendo referidos 70 dias como duração óptima do tratamento (Staples *et al.*, 1992; Chemineau *et al.*, 1996). Em machos, nota-se aumento da secreção de testosterona 45 dias após a colocação dos implantes (Kokois *et al.*, 2000). Os implantes colocados mantêm os níveis de melatonina elevados durante 100 dias (Forcada e Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b).

Por outro lado, vários autores indicam que para se conseguirem efeitos é necessário submeter os animais a um fotoperíodo crescente antes do tratamento, já que é essencial a alternância entre um maior e menor fotoperíodo (Robinson e Karsh, 1987; Bearden e Fuquay, 1997b; Gorman e Zucker, 1995a, citados por Gerlach e Aurich, 2000). A necessidade deste período depende da altura do ano em que se aplicam os implantes, em função do aumento de luminosidade que existe entre o solstício de Inverno e de Verão (Hanif e Williams, 1991).

Para o sistema de exploração de ovinos em Portugal, um método que não exija confinamento dos animais para tratamento luminoso, seria preferível, por facilitar o maneio de explorações essencialmente extensivas (Conduto, 1996; Matos, 2000), além de reduzir as repercursões económicas. Por outro lado, a situação geográfica do Sul de Portugal (latitude moderada) e a exposição a dias crescentes durante algumas semanas após o solstício de Inverno, fazem supôr a possibilidade de utilização do tratamento com melatonina antes da Primavera, sem necessidade de tratamento luminoso artificial prévio. Alguns autores (*Rosa et al.*, 2000) referem que se o tratamento for efectuado no final da Primavera não é necessária estimulação luminosa prévia porque os animais foram já sujeitos a um longo período de dias crescentes e Chemineau (1992) indica que este período deve durar no mínimo dois meses. Forcada e Abecia (2000) afirmam que os tratamentos com melatonina na latitude da Península Ibérica são mais vantajosos perto do equinócio de Primavera (Março-Abril) e Chemineau *et al.* (1992) referem que em ovelhas em climas mediterrâneos pode utilizar-se a melatonina nesta altura, sem tratamentos luminosos prévios. De facto, Beltrán de Heredia (1995, citado por Forcada *et al.*, 2000b) conseguiu melhorias nas características espermáticas avaliadas durante 15 semanas, colocando os implantes de melatonina no dia 2 de Abril e, em ovelhas, os tratamentos sem prévia exposição luminosa foram mesmo efectivos no final de Janeiro (Riocerezo *et al.*, 2001).

No presente trabalho pretendemos verificar as diferenças em parâmetros reprodutivos na Primavera quando os carneiros são tratados com implantes de melatonina, aplicados entre o solstício de Inverno e o solstício de Verão. Foram avaliados parâmetros morfológicos (perímetro testicular) e de avaliação seminal (volume, concentração, mobilidade individual, coloração vital, teste de endosmose e percentagem de anomalias).

## **2.3 Materiais e métodos**

Os trabalhos realizaram-se no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), situado na herdade da Abóbada, Serpa, Portugal (latitude 37° 57' N, longitude 7° 26' W, altitude 242 m). As instalações utilizadas foram um laboratório existente para o efeito e pavilhões e parques de maneio anexos.

O período do ensaio decorreu de 25 de Fevereiro de 2002 a 3 de Junho de 2002, correspondendo à data formação dos grupos e à data da última recolha de sémen.

Utilizaram-se 12 machos de raça Merina Preta e 7 de raça Campaniça, existentes no CEBA, com idades compreendidas entre os 17 meses e os 7 anos para a raça Merina Preta e entre 18 meses e 8 anos para a Campaniça. No início dos trabalhos os pesos dos carneiros estavam compreendidos entre os 66 e os 105 kg e entre 53 e 75 kg para os animais de raça Merina Preta e Campaniça, respectivamente. Nesta altura foi também avaliada a condição corporal, que oscilava entre 3 e 4,5 para a raça Merina Preta e entre 2,5 e 3,5 para a raça Campaniça, numa escala de 1 a 5 (Caldeira, 1992).

Os animais encontravam-se estabulados, num pavilhão com luz natural contíguo ao laboratório, onde se mantiveram até ao final dos trabalhos, com alimentação à base de feno de aveia *ad libitum* e concentrado comercial.

No dia 14 de Março de 2002 foram colocados três implantes de 18 mg de melatonina (*Melovine*<sup>®</sup>) em cada um dos machos de raça Campaniça e em metade dos de raça Merina Preta, escolhidos aleatoriamente. Assim, constituíram-se três grupos: um grupo de raça Merina Preta controlo, sem qualquer tratamento (GPC; n=6), um grupo de raça Merina Preta tratado com implantes de melatonina (GPT; n=6) e um grupo de raça Campaniça, também tratado com melatonina (GCT; n=7). A colocação dos implantes fez-se com aplicador próprio, subcutaneamente, na região caudal da base da orelha direita. O peso vivo médio em cada grupo constituído no início dos trabalhos foi de 93,2 kg, 78,8 kg e 60,6 kg, para os grupos GPC, GPT e GCT, respectivamente.

O ensaio decorreu durante 13 semanas, sendo todos os animais submetidos a duas colheitas de sémen semanais, durante 9 semanas, reduzindo-se a frequência nas restantes 4 semanas para uma colheita semanal. Durante todo o período foi feita a medição do perímetro testicular, uma vez por semana, e em cada dia de recolha de sémen procedeu-se a avaliação deste através das seguintes provas: volume, cor, cheiro, consistência, concentração, mobilidade massal, mobilidade individual, coloração vital, teste de endosmose e morfologia.

### **2 .3.1 Colheita de sémen**

No treino dos carneiros para colheita de sémen por vagina artificial, recorreu-se a uma fêmea colocada num tronco de imobilização, tratada com 3 mg de benzoato de estradiol (*Estrogeno Neosan*<sup>®</sup>). O treino foi realizado rotativamente entre machos, por dois operadores com esta tarefa. Refira-se que os machos já tinham sido utilizados em trabalhos anteriores, o que facilitou o processo de recolha. As colheitas de sémen iniciaram-se duas semanas após a data de início dos trabalhos. Todo o material estava em estufa, de forma a apresentar-se a cerca de 37°C na altura da colheita. Imediatamente a seguir à recolha de sémen o tubo colector graduado colocava-se em banho-maria a 32°C, após o que o ejaculado era avaliado relativamente aos parâmetros já referidos. Sempre que houve perda do ejaculado, por contaminação deste ou por outro imprevisto, fizemos nova colheita no final de todas as recolhas.

### **2 .3.2 Avaliação de parâmetros reprodutivos**

A medição foi realizada imediatamente após a ejaculação, com uma fita-métrica flexível de *nylon*, medindo os testículos na zona de maior diâmetro, segundo o método descrito por Regisford e Katz (1993).

O volume do ejaculado foi medido imediatamente após a colheita, por leitura do tubo de ensaio graduado aquando da sua colocação no banho-maria.

Os parâmetros cor, cheiro e consistência foram usados apenas como indicadores, por serem pouco rigorosos e sempre que apareceram alterados foi por motivo de contaminação do sémen por urina ou água, por exemplo, implicando a rejeição do ejaculado.

A avaliação da concentração foi efectuada num espectrofotómetro calibrado para sémen ovino, com leitura a 540 nm de comprimento de onda (*Hyperion Inc., Miami, USA*). Utilizaram-se *cuvettes* próprias, em que se fazia a diluição de 0,1 ml de sémen em 3,9 ml de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% com 0,02% de formalina. A leitura foi feita em duas vezes, separadas por alguns segundos, registando-se o segundo valor.

A avaliação da mobilidade massal efectuou-se logo após a colheita, colocando uma gota de sémen em lâmina aquecida e observando com grande ampliação (10-40×). Classificou-se numa escala de 0 a 5 (Nelson e Lin, 1983; Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Mylne *et al.*, 1997), tendo servido apenas como indicador momentâneo da qualidade do sémen.

De seguida foi feita a estimativa percentual da mobilidade individual por colocação de outra gota de sémen na lâmina a que se adicionou uma gota de soro fisiológico a 37°C. A observação efectuou-se em microscópio óptico com platina aquecida a 35°C, com uma ampliação de 100×.

Após avaliada a mobilidade massal e individual procedeu-se à estimativa da percentagem de espermatozóides vivos, fazendo um esfregaço corado com eosina-nigrosina segundo o método descrito por Evans e Maxwell (1987). As pipetas, lâminas e corante utilizados encontravam-se aquecidos a 37°C. Os esfregaços foram observados logo após a secagem do corante, contando-se um total de 100 espermatozóides em cada esfregaço e registando-se a percentagem de células não-coradas, com auxílio de um contador manual.

Ao mesmo tempo que se efectuava a coloração vital fazia-se a diluição do ejaculado em meio hipoosmótico para teste de endosmose. Esta prova foi realizada utilizando uma solução a 100 mOsm/kg, composta por citrato tri-sódico di-hidratado (1,04 g) e água destilada (100 ml), através da técnica descrita por Ferreira *et al.* (2001), que consistiu em diluir 0,1 ml do sémen colhido em 1 ml da solução hipoosmótica, incubando depois esta preparação durante 30 minutos a 32°C. Após este tempo, colocou-se uma gota da solução em lâmina aquecida e provocou-se a paragem da reacção de endosmose, por adição de uma solução de gluteraldeído a 2% em meio BL-1, cuja composição se indica na Tabela 2-1.

Reagente	Quantidade
Glucose	2,9 g
Citrato tri-sódico 2H <sub>2</sub> O	1 g
Bicarbonato de sódio	0,2 g
Água destilada	100 ml

**Tabela 2-1: Composição química do meio BL-1 (Pursel *et al.*, 1972, citado por Ferreira *et al.*, 2001).**

De seguida sobrepôs-se uma lamela, também aquecida, e observámos em microscópio de contraste de fase com uma ampliação de 400×, sendo contado um total de 100 espermatozóides, com auxílio de um contador manual, anotando-se a percentagem destes que apresentavam enrolamento de cauda (reacção positiva). Para maior precisão de estimativa do valor final, foi subtraído ao valor obtido a percentagem de espermatozóides com anomalias da cauda observados na avaliação da morfologia.

As lâminas preparadas para a prova de coloração vital foram depois observadas com ampliação de 1000x de forma a obter-se a percentagem total de anomalias observadas nos espermatozóides, tendo sido discriminadas várias categorias, nomeadamente: cabeças anormais, cabeças soltas, gotas citoplasmáticas proximais, gotas citoplasmáticas distais, caudas enroladas e outras. Como já referido, o valor de caudas enroladas foi utilizado para calcular o valor final do teste de endosmose.

### **2.3.3 Modelo estatístico**

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente recorrendo ao Proc Mixed do SAS (*SAS Institute Inc.*, 1999/2000).

No modelo estatístico delineado para os animais de raça Merina Preta (GPT vs. GPC), foram considerados como efeitos fixos o tratamento com melatonina (2 níveis) e a semana de colheita de sémen (13 níveis), e como efeitos aleatórios o carneiro e o erro ou resíduo.

Em relação à comparação dos carneiros das duas raças, todos tratados com melatonina (GPT vs. GCT), no modelo consideraram-se a raça (2 níveis) e a semana de colheita (13 níveis) como efeitos fixos e igualmente o carneiro e o resíduo como efeitos aleatórios.

Foram ainda calculadas as correlações entre os vários parâmetros, através do método de Pearson, recorrendo o Proc Corr do SAS. Utilizou-se a totalidade dos dados, independentemente da raça dos animais e do tratamento a que foram submetidos.

## 2.4 Resultados

Na avaliação dos factores que influenciaram os vários caracteres na raça Merina Preta (GPT vs. GPC), os valores variaram conforme referido na Tabela 2-2 e no modelo que comparava as duas raças (GPT vs. GCT), os valores variaram de acordo com os valores da Tabela 2-3.

Variável	n	Máximo	Mínimo	Média ± desvio padrão	Coeficiente de variação
<b>Perímetro testicular (cm)</b>	177	44	26,6	35,31±2,83	8,00
<b>Volume (ml)</b>	260	2,5	0,4	1,06±0,38	35,91
<b>Concentração (10<sup>9</sup> epz/ml)</b>	260	6,91	1,15	3,27±0,89	27,25
<b>Mobilidade individual (%)</b>	256	95	35	81,66±10,16	12,44
<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	258	98	42	83,93±10,46	12,46
<b>HOST (% positivos)</b>	256	97	22	70,19±15,70	22,37
<b>Morfologia (% anormais)</b>	256	24	0	2,82±3,55	125,98

**Tabela 2-2: Estatísticas descritivas para os vários parâmetros avaliados nos carneiros de raça Merina Preta, tratados e não-tratados com melatonina (GPT vs. GPC) durante as 13 semanas de ensaio.**

Variável	n	Máximo	Mínimo	Média ± desvio padrão	Coeficiente de variação
<b>Perímetro testicular (cm)</b>	189	40,00	26,6	33,85±2,57	7,58
<b>Volume (ml)</b>	278	2,00	0,30	0,89±0,31	35,38
<b>Concentração (10<sup>9</sup> epz/ml)</b>	278	6,91	1,13	3,29±0,96	29,13
<b>Mobilidade individual (%)</b>	277	95	5	78,32±15,87	20,27
<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	276	98	24	80,82±15,02	18,59
<b>HOST (% positivos)</b>	273	98	11	65,09±19,96	30,66
<b>Morfologia (% anormais)</b>	273	24	0	3,21±3,82	119,20

**Tabela 2-3: Estatísticas descritivas para os vários parâmetros avaliados nos carneiros tratados com melatonina das raças Merina Preta e Campaniça (GPT vs. GCT) durante as 13 semanas de ensaio.**

Os resultados dos vários modelos efectuados encontram-se nas Tabelas 2-4 a 2-7. Comparando os carneiros de raça Merina Preta (GPC vs. GPT), o tratamento com implantes de melatonina não provocou diferenças entre os dois grupos para qualquer dos parâmetros avaliados (ver Tabela 2-4). Por outro lado, entre semanas, as diferenças foram significativas ( $p<0,001$ ) no perímetro testicular, concentração, mobilidade individual e coloração vital, e também para o teste de endosmose ( $p<0,05$ ).

Comparando as duas raças (Tabela 2-5), não foram detectadas diferenças entre os dois grupos (GPT vs. GCT), havendo apenas diferenças significativas ( $p<0,001$ ) entre algumas semanas para o perímetro testicular, concentração, mobilidade individual e coloração vital.

Factores		Perímetro testicular (cm)	Volume (ml)	Concentração ( $\times 10^9$ epz/ml)	Mobilidade individual (%)	Coloração vital (% de vivos)	HOST (% positivos)	Morfologia (% anormais)
		n=177	n=260	n=260	n=256	n=258	n=256	n=256
	GL	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F
<b>Melatonina</b>	1	2,88	0,39	0,27	0,47	0,79	0,00	1,58
<b>Semana</b>	12	39,26***	0,61	4,76***	13,26***	15,79***	1,94*	1,06
<b>Var carneiro</b>		4,97	0,09	0,11	2,06	3,97	34,32	2,55
<b>Var resíduo</b>		0,71	0,07	0,60	64,59	62,80	209,92	10,19
<b>GL resíduo</b>		153	236	236	232	234	232	232

Significância \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

**Tabela 2-4: Graus de liberdade (GL), valores de F e respectiva significância para os vários parâmetros avaliados na raça Merina Preta (GPT vs. GPC), com base nos vários factores que, neste caso, são a presença ou não de implante de melatonina e a semana de colheita. Indica-se também a variância devida ao carneiro e ao resíduo e os graus de liberdade do resíduo.**

Factores		Perímetro testicular (cm)	Volume (ml)	Concentração ( $\times 10^9$ epz/ml)	Mobilidade individual (%)	Coloração vital (% de vivos)	HOST (% positivos)	Morfologia (% anormais)
		n=189	n=278	n=278	n=277	n=276	n=273	n=273
	GL	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F	valor de F
<b>Raça</b>	1	0,39	3,87	0,04	1,10	1,59	2,13	0,18
<b>Semana</b>	12	25,70***	0,99	6,75***	5,56***	11,58***	1,39	1,63
<b>Var carneiro</b>		4,91	0,04	0,29	125,28	95,14	126,87	2,95
<b>Var resíduo</b>		0,83	0,05	0,54	107,35	86,74	262,83	11,83
<b>GL resíduo</b>		164	253	253	252	251	248	248

Significância \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

**Tabela 2-5: Graus de liberdade (GL), valores de F e respectiva significância para os vários parâmetros avaliados em todos os animais tratados com implantes de melatonina (GPT vs. GCT), com base nos vários factores que, neste caso, são a raça e a semana de colheita. Indica-se também a variância devida ao carneiro e ao resíduo e os graus de liberdade do resíduo.**



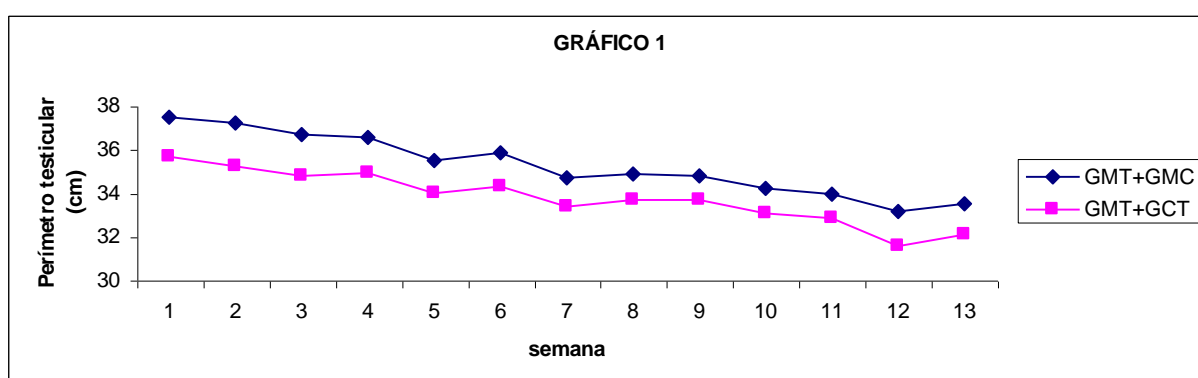
	Variável	Perímetro testicular	Volume	Concentração	Mobilidade individual	Coloração vital	HOST	Morfologia
<b>MELATONINA</b>	<b>GPC</b>	36,34±0,91	1,11±0,12	3,18±0,15	81,69±0,94	83,89±1,08	69,38±2,73	2,17±0,71
	<b>GPT</b>	34,15±0,91	1,00±0,12	3,29±0,15	82,58±0,93	85,23±1,08	69,64±2,73	3,43±0,71
<b>SEMANA</b>	<b>1</b>	37,49±0,67a	1,07±0,10	3,66±0,20ef	60,96±1,94	67,95±1,91	70,51±3,74ab	4,31±0,87
	<b>2</b>	37,19±0,69ab	1,09±0,10	3,45±0,19def	79,17±1,69a	77,27±1,75a	70,00±3,41ab	2,65±0,81
	<b>3</b>	36,67±0,69bc	1,00±0,10	3,86±0,19f	79,50±1,76ab	77,17±1,72a	71,35±3,53ab	3,61±0,82
	<b>4</b>	36,54±0,69bc	1,03±0,10	3,47±0,19def	81,67±1,69abcde	80,75±1,72ab	70,13±3,41ab	3,29±0,80
	<b>5</b>	35,46±0,69cd	1,13±0,10	3,48±0,19def	81,04±1,69abc	84,42±1,72bcd	64,79±3,41c	3,04±0,80
	<b>6</b>	35,82±0,69c	1,13±0,10	2,99±0,19abc	81,46±1,69abcd	82,38±1,72bc	70,38±3,41ab	2,42±0,80
	<b>7</b>	34,67±0,67ef	1,01±0,10	3,22±0,19de	83,75±1,69cdef	89,33±1,72e	77,92±3,41a	3,54±0,80
	<b>8</b>	34,86±0,69de	1,08±0,10	3,08±0,19bcd	84,38±1,69cdef	90,25±1,72e	70,04±3,41ab	1,75±0,80
	<b>9</b>	34,78±0,69ef	1,08±0,10	2,74±0,19ab	85,83±1,69def	90,42±1,72e	75,79±3,41a	2,17±0,80
	<b>10</b>	34,18±0,69fg	1,01±0,11	2,51±0,24a	87,08±2,36ef	92,83±2,36e	68,67±4,51abc	2,08±1,03
	<b>11</b>	33,92±0,69g	0,98±0,11	3,57±0,24ef	87,50±2,36f	88,33±2,36de	68,00±4,51abc	2,83±1,03
	<b>12</b>	33,16±0,69h	1,04±0,11	2,81±0,24abc	87,92±2,36f	91,58±2,36e	68,23±4,69abc	2,25±1,03
	<b>13</b>	33,47±0,69h	1,06±0,11	3,20±0,24bcde	87,50±2,37f	86,58±2,36cde	57,83±4,51c	2,42±1,03

**Tabela 2-6: Médias dos mínimos quadrados ± erro padrão para os vários caracteres em função do tratamento e da semana para os carneiros de raça Merina Preta, tratados e não tratados com melatonina (GPC vs. GPT). Médias com as mesmas letras não diferem significativamente (p<0,05).**

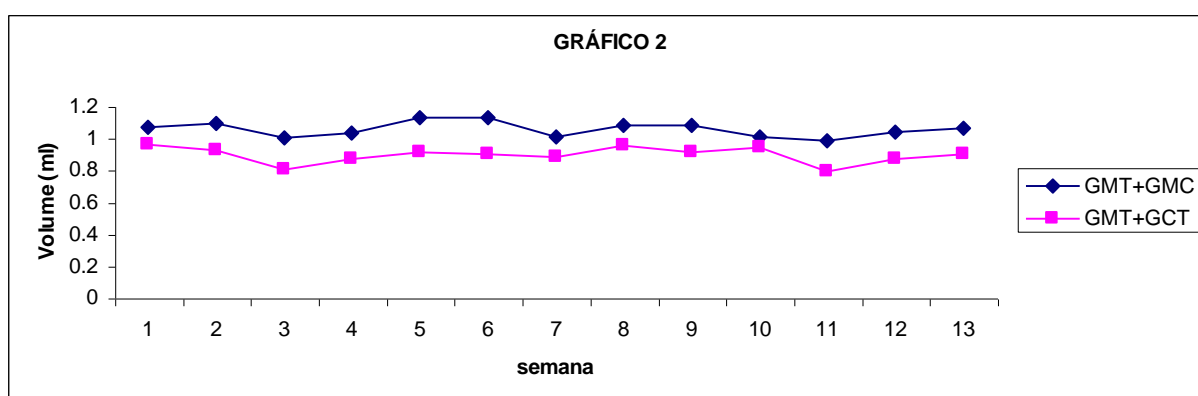
	Variável	Perímetro testicular	Volume	Concentração	Mobilidade individual	Coloração vital	HOST	Morfologia
<b>RAÇA</b>	<b>GPT</b>	34,16±0,91	1,01±0,08	3,30±0,23	82,57±4,66	85,19±4,07	69,85±4,83	3,50±0,77
	<b>GCT</b>	33,38±0,84	0,78±0,08	3,24±0,21	75,91±4,32	78,20±3,77	60,27±4,48	3,05±0,71
<b>SEMANA</b>	<b>1</b>	35,66±0,65a	0,96±0,08	4,03±0,22a	66,10±3,93	66,29±3,43	71,23±4,81	5,47±0,91
	<b>2</b>	35,22±0,67ab	0,92±0,07	3,54±0,21bc	75,26±3,77abc	74,27±3,37a	65,74±4,62	2,80±0,88
	<b>3</b>	34,79±0,67bc	0,80±0,07	3,83±0,21ab	72,95±3,72a	75,19±3,27ab	67,85±4,68	3,83±0,86
	<b>4</b>	34,89±0,67bc	0,87±0,07	3,43±0,21bcd	80,45±3,72bcde	78,35±3,27abc	69,14±4,46	2,98±0,83
	<b>5</b>	33,96±0,67d	0,91±0,07	3,24±0,21cde	75,06±3,72ab	78,31±3,27abc	64,37±4,46	4,13±0,83
	<b>6</b>	34,27±0,67cd	0,90±0,07	3,03±0,21def	78,91±3,72bcd	79,73±3,27bc	64,14±4,46	3,02±0,83
	<b>7</b>	33,35±0,64ef	0,88±0,07	3,37±0,21cde	83,91±3,72de	87,23±3,27d	68,33±4,46	3,56±0,83
	<b>8</b>	33,69±0,67de	0,95±0,07	3,02±0,21ef	82,56±3,72de	89,38±3,27d	62,33±4,46	1,90±0,83
	<b>9</b>	33,65±0,67de	0,91±0,07	2,69±0,21f	79,29±3,72bcde	86,85±3,27d	65,91±4,46	2,13±0,83
	<b>10</b>	33,06±0,67ef	0,94±0,08	2,63±0,25f	82,18±4,24cde	88,35±3,75d	64,83±5,48	3,09±1,07
	<b>11</b>	32,82±0,67f	0,79±0,08	3,68±0,25abc	86,03±4,24e	86,35±3,75d	61,52±5,48	3,86±1,07
	<b>12</b>	31,53±0,67g	0,87±0,08	2,88±0,25ef	84,87±4,24de	88,27±3,75d	68,45±5,48	2,32±1,07
	<b>13</b>	32,08±0,67g	0,92±0,08	3,14±0,25cdef	82,56±4,24de	83,50±3,75cd	51,91±5,48	3,48±1,07

**Tabela 2-7: Médias dos mínimos quadrados ± erro padrão para os vários caracteres em função da raça e da semana para os animais tratados com melatonina de raça Merina Preta e Campaniça (GPT vs. GCT). Médias com as mesmas letras não diferem significativamente (p<0,05).**

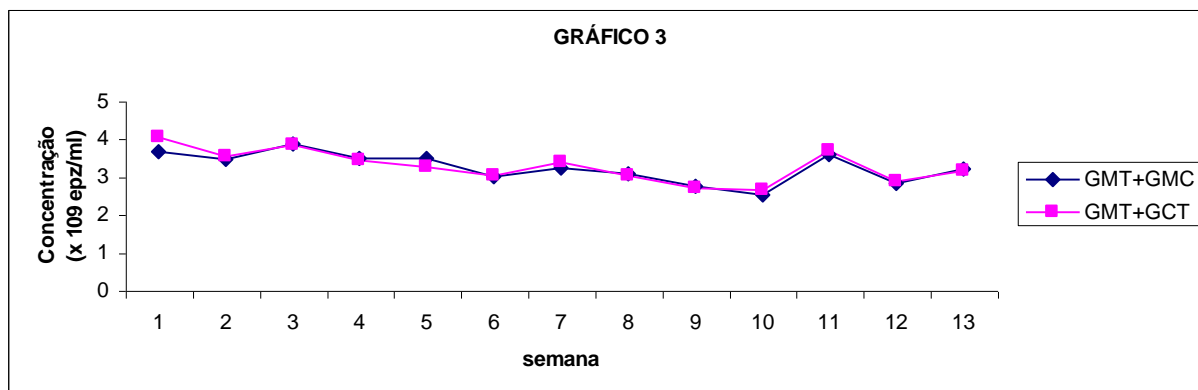
Quando analisamos as médias dos mínimos quadrados para os vários parâmetros nos dois modelos realizados (Tabela 2-6 e Tabela 2-7 e Gráfico 2-1 a Gráfico 2-7), verificamos, que, em termos globais, o perímetro testicular diminui e a mobilidade individual e coloração vital aumentam progressivamente ao longo das semanas, enquanto as outras características apresentam variações mais irregulares, quer quando comparamos os animais de raça Merina Preta entre si (GPC vs. GPT), quer quando comparamos as diferenças entre as duas raças (GPT vs. GCT). Relativamente aos parâmetros perímetro testicular, concentração, mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose, podemos também verificar as diferenças que existem entre as várias semanas ( $p < 0,05$ ), nos dois modelos (Tabela 2-6 e Tabela 2-7).



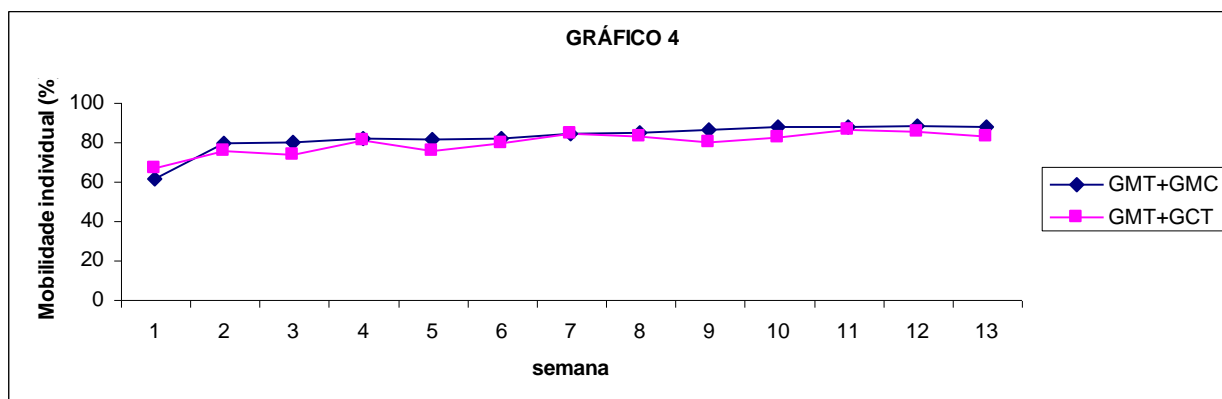
**Gráfico 2-1: Médias dos mínimos quadrados para o perímetro testicular ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7 .**



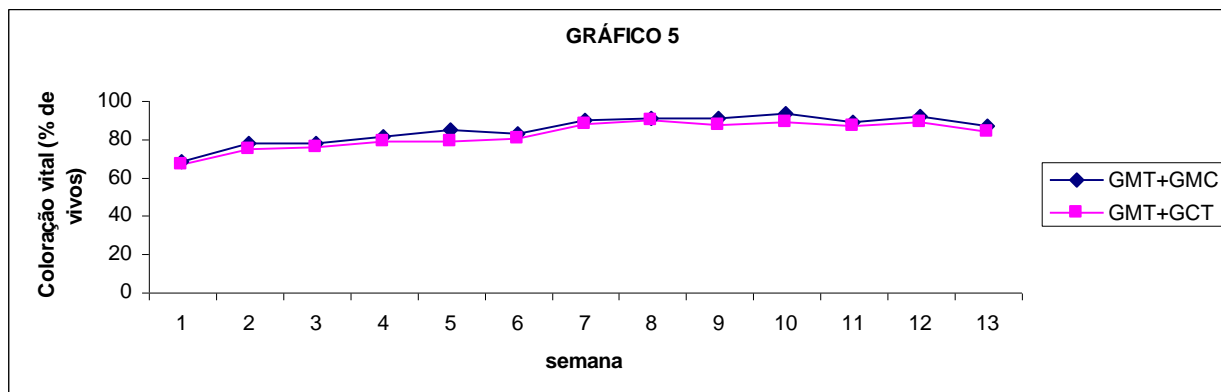
**Gráfico 2-2: Médias dos mínimos quadrados para o volume ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7.**



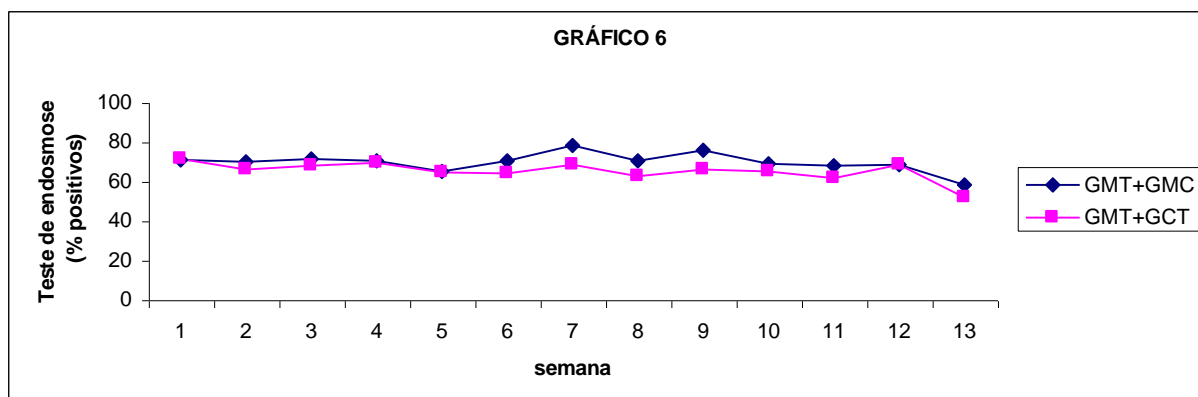
**Gráfico 2-3: Médias dos mínimos quadrados para a concentração ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT *vs.* GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT *vs.* GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7.**



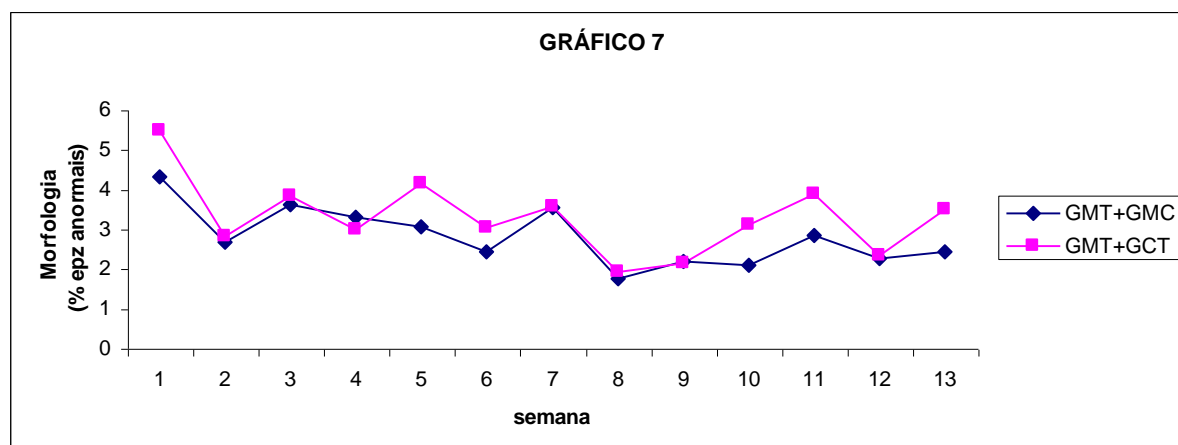
**Gráfico 2-4: Médias dos mínimos quadrados para a mobilidade individual ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT *vs.* GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT *vs.* GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7.**



**Gráfico 2-5: Médias dos mínimos quadrados para a coloração vital ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7.**



**Gráfico 2-6: Médias dos mínimos quadrados para o teste de endosmose ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7.**



**Gráfico 2-7: Médias dos mínimos quadrados para a percentagem de células anormais ao longo das 13 semanas de ensaio, nos carneiros comparados em função do tratamento (GPT vs. GPC) e nos carneiros comparados em função da raça (GPT vs. GCT), com base na Tabela 2-6 e Tabela 2-7.**

Se nos debruçarmos agora sobre os parâmetros, avaliados em todos os carneiros (GPC, GPT e GCT) durante os trabalhos, podemos ver como variaram os valores através da tabela Tabela 2-8.

Variável	N	Máximo	Mínimo	Média ± desvio padrão	Coefficiente de variação
<b>Perímetro testicular (cm)</b>	277	44	26,6	34,67±2,84	8,18
<b>Volume (ml)</b>	408	2,5	0,3	0,96±0,36	37,62
<b>Concentração (10<sup>9</sup> epz/ml)</b>	408	6,91	1,13	3,26±0,90	27,63
<b>Mobilidade individual (%)</b>	403	95	5	79,28±14,46	18,24
<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	405	98	24	81,61±13,60	16,66
<b>HOST (% positivos)</b>	401	98	11	66,72±18,88	28,29
<b>Morfologia (% anormais)</b>	401	24	0	2,89±3,44	118,83

**Tabela 2-8: Estatística descritiva para os vários parâmetros avaliados em todos os carneiros (GPT, GPC e GCT) durante as 13 semanas de ensaio.**

Quando analisamos as correlações entre eles (Tabela 2-9), detectamos uma correlação significativa ( $p < 0,001$ ) e positiva entre o perímetro testicular e o volume ( $r = 0,39$ ) e negativa entre o mesmo parâmetro e a mobilidade individual ( $r = -0,21$ ) e a coloração vital ( $r = -0,22$ ). O volume e concentração não apresentaram correlações significativas ( $p < 0,001$ ) para nenhum dos parâmetros, à excepção das já referidas entre o volume e o perímetro testicular.

A mobilidade individual, além da correlação com o perímetro testicular mostrou também uma correlação positiva significativa ( $p < 0,001$ ), com a coloração vital ( $r = 0,64$ ) e teste de endosmose ( $r = 0,31$ ) e uma correlação negativa ( $p < 0,001$ ) com o perímetro testicular ( $r = -0,21$ ) e percentagem de células com morfologia anormal ( $r = -0,22$ ).

Variável	Perímetro testicular (cm)	Volume (ml)	Concentração ( $\times 10^9$ epz/ml)	Mobilidade individual (%)	Coloração vital (% de vivos)	HOST (% positivos)	Morfologia (% anormais)
Perímetro testicular (cm)	1,0 n=277	0,39*** n=276	0,05 n=276	-0,21*** n=273	-0,22*** n=275	-0,03 n=272	-0,13* n=272
Volume (ml)	0,39*** n=276	1,0 n=408	-0,13** n=408	0,06 n=403	0,09 n=405	-0,06 n=401	-0,10* n=401
Concentração ( $\times 10^9$ epz/ml)	0,05 n=276	-0,13** n=408	1,0 n=408	0,05 n=403	-0,10* n=405	0,05 n=401	0,03 n=401
Mobilidade individual (%)	-0,21*** n=273	0,06 n=403	0,05 n=403	1,0 n=403	0,64*** n=401	0,31*** n=397	-0,22*** n=397
Coloração vital (% de vivos)	-0,22*** n=275	0,09 n=405	-0,10* n=405	0,64*** n=401	1,0 n=405	0,32*** n=399	-0,26*** n=399
HOST (% positivos)	-0,03 n=272	-0,06 n=401	0,05 n=401	0,31*** n=397	0,32*** n=399	1,0 n=401	-0,12 n=399
Morfologia (% anormais)	-0,13* n=272	-0,10 n=401	0,03 n=401	-0,22*** n=397	-0,26*** n=399	-0,12* n=399	1,0 n=401

**Tabela 2-9: Correlações entre os vários parâmetros avaliados em todos os carneiros (GPC, GPT e GCT) e número de observações (n). Indicam-se os valores estatisticamente significativos para  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*).**

Relativamente à coloração vital, além das já referidas, apresenta correlação positiva significativa ( $p < 0,001$ ) com o teste de endomose ( $r = 0,32$ ) e negativa ( $p < 0,001$ ) com a percentagem de formas anormais ( $r = -0,26$ ). O teste de endomose e a percentagem de células anormais, por sua vez, apresentam correlações altamente significativas ( $p < 0,001$ ), já referidas, com a mobilidade individual e coloração vital.

## **2.5 Discussão e conclusões**

Quando comparamos os vários grupos de carneiros, não se notam quaisquer diferenças entre animais tratados ou não com melatonina e entre as duas raças estudadas. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ) notam-se entre semanas, em ambos os modelos, para os caracteres perímetro testicular, concentração, mobilidade individual e coloração vital. Observaram-se, regra geral, aumentos graduais nos valores de mobilidade individual e coloração vital e diminuição do perímetro testicular, ao longo das 13 semanas de ensaio.

Ao colocarmos os implantes de melatonina entre o solstício de Inverno e o solstício de Verão, pretendemos que os animais fossem sujeitos a um fotoperíodo crescente prévio mínimo de dois meses, que é o referido na literatura (Chemineau, 1992). Em climas mediterrâneos a amplitude de variação da luminosidade é menor e as várias raças mostram-se menos sazonais (Forcada *et al.*, 2000a; Rodrigues *et al.*, 1989; Barbas *et al.*, 1991; Bettencourt e Fialho, 1992; Alonso de Gognié, 1980, citados por Chemineau, 1992). Por outro lado, pensa-se possível utilizar apenas a melatonina sem tratamentos luminosos se a aplicação dos implantes se fizer várias semanas após o solstício de Inverno já que, desta forma, há um período alargado de dias crescentes que fazem a necessária sensibilização do sistema regulador (Hanif e Williams, 1991; Chemineau, 1992). Em animais em latitudes mediterrânicas, os tratamentos com implantes de melatonina, podem ser antecipados em relação a esquemas que se utilizam em latitudes superiores, sendo realizados próximo do equinócio de Primavera (Forcada e Abecia, 2000). Há autores que referem inclusivamente tratamentos no final de Janeiro, em ovelhas, com resultados positivos (Forcada e Abecia, 2000; Riocerezo *et al.*, 2001), pelo que o tratamento simultâneo de machos poderá ser considerado. No presente trabalho, os implantes foram colocados sem tratamento luminoso



prévio, próximo do equinócio da Primavera (14 de Março), altura em que já havia decorrido um período de algumas semanas após o solstício de Inverno.

Em trabalhos anteriores, os tratamentos com melatonina em carneiros permitiram melhorar as características testiculares e espermáticas (Guérin *et al.*, dados não publicados, 1991, Trinquier *et al.*, 1990, dados não publicados, citados por Chemineau *et al.*, 1992; Brice e Chemineau, 1996; Kaya *et al.*, 2000). Fitzgerald e Stellflug (1991) referem que a melatonina estimula o crescimento testicular após regressão fisiológica. Béltran de Heredia (1995, citado por Forcada *et al.*, 2000b) conseguiu aumentar o volume e concentração dos ejaculados. Por outro lado, na Península Ibérica, ausência de diferenças entre animais tratados ou não haviam sido já encontradas anteriormente (Azcona *et al.*, 2001). Tais autores sugerem que estes resultados se poderão dever à menor sazonalidade dos animais em causa, o que pensamos poderá ter também acontecido neste caso, já que nas raças existentes no Sul de Portugal foi também demonstrada menor sazonalidade reprodutiva (Bettencourt e Fialho, 1992). Além disto, em trabalhos anteriores com as raças Merina Preta e Campaniça, não se notaram diferenças entre raças ao longo das várias Estações (Bettencourt, 1999), o que nos sugere que os animais tratados se comportaram como nas outras épocas do ano.

Quando nos debruçamos sobre as correlações entre as várias provas avaliadas, notam-se correlações positivas entre o perímetro testicular e o volume de ejaculado ( $r=0,39$ ), o que está de acordo com a bibliografia (Lapwood, 1986; Evans e Maxwell, 1987; Chemineau *et al.*, 1991; Fitzgerald, 1997; Sharkey *et al.*, 2001). A correlação significativa mais elevada foi encontrada entre a mobilidade individual e a coloração vital ( $r=0,64$ ), correlacionando-se ambas as provas com o teste de endosmose ( $r=0,31$  para a mobilidade individual e  $r=0,39$  para coloração vital). Resultados concordantes foram descritos por Espinosa *et al.* (1993), que encontraram correlações significativas de 0,83 entre mobilidade individual e coloração vital e de 0,40 entre esta última e HOST. Estas relações são esperadas, já que a coloração vital e a endosmose avaliam, respectivamente, a permeabilidade da membrana plasmática e a sua funcionalidade (Jeyendran *et al.*, 1984; Vazquez *et al.*, 1997) e alguns espermatozóides imóveis podem possuir a membrana funcional. Em relação ainda aos valores do teste de endosmose, eles foram inferiores aos da coloração vital, o que também é lógico, considerando que o primeiro avalia não só a permeabilidade da membrana plasmática, mas também a sua

funcionalidade, sendo por isso mesmo um indicador mais fidedigno que o teste de coloração vital (Vazquez *et al.*, 1997; Tamuli e Watson, 1992, citado por Neild *et al.*, 1999).

Podemos concluir que a aplicação de implantes de melatonina em carneiros de raça Merina Preta e Campaniça não provocou alterações nas características reprodutivas avaliadas, o que se deve à menor sazonalidade destas duas raças na latitude do Sul de Portugal. Encontrámos ainda correlações entre as várias provas realizadas, com a mais elevada entre a mobilidade individual e a coloração vital.

### **3. EFEITO DO TRATAMENTO COM IMPLANTES DE MELATONINA NA FERTILIDADE DE SÉMEN CONGELADO DE CARNEIROS DA RAÇA MERINA PRETA E CAMPANIÇA**

#### **3.1 Resumo**

Para utilização da inseminação artificial em ovinos, com sémen congelado, o ideal seria dispor de ejaculados em óptimas condições durante todo o ano. Estão, no entanto, descritas diferenças nas características seminais ao longo do ano. Nalguns casos torna-se necessário congelar sémen em épocas menos favoráveis, como é o caso das raças em vias de extinção, em que se dispõe de poucos animais para reprodução.

Pelo uso de tratamentos com melatonina é possível simular as condições fotoperiódicas da estação reprodutiva mais favorável (Outono), na qual o sémen apresenta geralmente melhor qualidade e, por esta razão, admite-se a possibilidade melhorar a fertilidade do sémen congelado, recorrendo a tratamentos com implantes desta hormona antes da Primavera.

No presente trabalho testámos se a aplicação de implantes de melatonina a carneiros de raça Merina Preta e Campaniça melhora a fertilidade do sémen congelado durante a Primavera, pela comparação de dois períodos de congelação, um antes e outro após a altura esperada do efeito dos implantes. Para tal, separámos os animais de raça Merina Preta em dois grupos, um tratado com implantes de melatonina (GPT; n=6) e um controlo, sem tratamento (GPC; n=6) e os animais de raça Campaniça num outro grupo, tratado com melatonina (GCT; n=7). Efectuaram-se três provas para avaliação do sémen (mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose), que foram realizadas na altura de colheita do sémen e após a descongelação.

Analisando os resultados obtidos, os carneiros tratados com implantes de melatonina não apresentaram melhorias na fertilidade, relativamente aos não-tratados, e não se encontraram diferenças entre as duas raças avaliadas. Em relação às provas realizadas, apenas a coloração vital, efectuada na altura de recolha, apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando

comparados os carneiros de raça Merina Preta tratados ou não com melatonina, relativamente à análise da fertilidade determinada por ecografia.

Quando se avaliaram as correlações entre as várias provas, as que apresentaram valores estatisticamente significativos ( $p < 0,001$ ) mais elevados ( $r = 0,67$ ) foram a mobilidade individual após a recolha e a coloração vital após descongelação. O teste de endosmose foi a prova com correlação significativa ( $p < 0,001$ ) mais elevada ( $r = 0,44$ ) quando efectuada ao sémen antes e após congelação.

Os resultados obtidos fazem-nos supor que a ausência de diferenças entre a fertilidade dos carneiros sujeitos ou não ao tratamento com melatonina, se poderá dever à menor sazonalidade das raças em questão, durante a Primavera, na latitude do Sul de Portugal.

**Palavras-chave:** Campaniça, Melatonina, Merina Preta, Sazonalidade, Sémen Congelado.

### 3.2 Introdução

A existência de épocas mais ou menos favoráveis à reprodução na espécie ovina, fazem condicionar o período durante o qual estes animais podem ser utilizados com melhores resultados. Na prática, na inseminação artificial, o sémen congelado mantém poder fecundante ao longo de vários anos (Salamon *et al.*, 1996, citados por Sharkey *et al.*, 2001). Apesar de, em ovinos, a fertilidade obtida com este tipo de sémen ser inferior à conseguida com outras espécies, o recurso a esta tecnologia apresenta inúmeras vantagens, entre as quais se podem referir as melhorias genéticas e a facilidade de utilização de machos distantes. A inseminação artificial permite também que o sémen armazenado seja utilizado quando ocorrem certas eventualidades como sejam determinadas doenças, a incapacidade reprodutiva e a estacionalidade (Angulo *et al.*, 1995).

De facto, alguns autores preconizam a congelação de sémen no auge da estação reprodutiva ou a utilização de raças pouco sazonais, como as mediterrânicas, para contornar as diferenças existentes ao longo do ano (Chagas e Silva, 1992). O sémen de carneiro criopreservado no Inverno e Primavera é de menor qualidade que o congelado durante o Outono (Ortavant *et al.*, 1985). Fiser e Faifull (1986, citados por Lopez-Brea *et al.*, 1995) indicam que o sémen congelado de carneiros sujeitos a fotoperíodo decrescente apresenta melhores resultados, à

descongelamento, do que quando é colhido em fotoperíodo crescente. Tal coincide com outros trabalhos em que se verificou aumento da fertilidade do sêmen congelado quando os animais foram sujeitos a “dias curtos” (Fiser e Batra, 1984, Fiser e Fairfull, 1983, 1986, Zheltobryuk *et al.*, 1990, citados por Salamon e Maxwell, 1995b). Colas (1980, 1981 citado por Anel *et al.*, 1995) obteve melhores taxas de fertilidade à inseminação artificial, por via vaginal, no Outono (68,4%) do que na Primavera (47,1%).

O princípio da utilização *ad eternum* do sêmen congelado faz ponderar cada vez mais a constituição de bancos de sêmen, de espécies e raças ameaçadas de extinção, com vista à manutenção da variabilidade genética actual (Matos e Bettencourt, 1996). A conservação criogénica é mais barata que a conservação genética de animais vivos e a variabilidade genética permanece inalterada durante o período de conservação (Matos, 1993). Na prática, a criação destas reservas genéticas de gâmetas tem toda a pertinência para preservação de raças ovinas autóctones em estado de extinção, tais como a Merina Preta e Campaniça (Matos e Bettencourt, 1996; Matos, 2000). Estas são pouco competitivas, em termos produtivos, comparativamente com outras exóticas que vão dominando os efectivos pecuários ovinos em Portugal. No ano de 1999 encontravam-se registadas no Livro Genealógico 6900 e 4607 fêmeas das raças Merina Preta e Campaniça, respectivamente, distribuídas por 15 e 14 criadores (Carolino, 1999). De acordo com a classificação estabelecida pela FAO (1992), as duas raças em questão são classificadas como rara (Merina Preta) e vulnerável (Campaniça). Como, nestas espécies, o número de carneiros é pequeno, torna-se necessário utilizá-los também durante a Primavera para constituição dos bancos de sêmen, embora esta época seja considerada menos favorável.

Em todas as espécies sazonais o fotoperíodo é o factor responsável pelas variações estacionais observadas e este comportamento é mais marcado em latitudes elevadas (Ortavant *et al.*, 1985; Sebastian, 1989b; Chemineau *et al.*, 1991; Malpoux *et al.*, 1996; Fitzgerald, 1997; Stellflug *et al.*, 1997; Bodin *et al.*, 1999; Forcada *et al.*, 2000a; Gerlach e Aurich, 2000; Hafez e Hafez, 2000b). A sazonalidade é modulada pela melatonina (Wayne *et al.*, 1988; Deveson *et al.*, 1992; Hafez *et al.*, 2000) produzida a nível da glândula pineal. Foram desenvolvidas formas de aplicação da hormona em implantes sub-cutâneos, que permitem simular um fotoperíodo curto, característico da época reprodutiva mais favorável, que é o Outono (Chemineau *et al.*, 1992; Chemineau *et al.*, 1996; Thimonier, 1996). Estes dispositivos

permitem o estabelecimento de níveis séricos elevados (100 a 300 pg/ml) de melatonina durante 100 dias (Forcada e Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b). Os tratamentos, para serem efectivos, necessitam ser precedidos por um período suficientemente longo de dias crescentes, sensibilizador do sistema, apontando-se um mínimo de dois meses de duração (Hanif e Williams, 1991; Chemineau, 1992; Rosa *et al.*, 2000). A estimulação do sistema neuro-endócrino que decorre dos implantes de melatonina verifica-se só algumas semanas após a aplicação destes pelo que, para se conseguirem efeitos na Primavera, é necessário iniciar o tratamento algures entre o solstício de Inverno e o solstício de Verão. Em fêmeas está referida a estimulação de libertação de LH 40 a 60 dias após colocação dos implantes, sendo a duração ideal do tratamento de 70 dias (Chemineau *et al.*, 1996; Vigué *et al.*, 1995, citado por Forcada *et al.*, 2000a; Bittman *et al.*, 1985, citados por Forcada *et al.*, 2000b). Em machos ocorrem aumentos significativos nos níveis de testosterona 45 dias após a aplicação do impante (Kokois *et al.*, 2000).

Os ovinos mantidos em regiões mediterrânicas estão sujeitos a um clima moderado e a pequena diferença entre o dia mais curto (9 a 10 horas de luz) e o dia mais longo (14 a 15 horas), condicionando uma certa flexibilidade nas épocas reprodutivas (Forcada *et al.*, 2000a). Para além disto, as raças existentes nestas regiões são menos afectadas pela sazonalidade (Sebastian, 1989b; Bettencourt e Fialho, 1992; Alonso de Miguel e Cognié, 1980, citados por Chemineau, 1992; Bodin *et al.*, 1999; Pelletier *et al.*, 2000). Na latitude do Sul de Portugal, preconiza-se que a aplicação de implantes de melatonina deva ser efectuada próximo do equinócio de Primavera (Forcada e Abecia, 2000; Forcada *et al.*, 2000b), estando mesmo descritos resultados interessantes em fêmeas, com início de tratamento no final de Janeiro (Riocerezo *et al.*, 2001).

No presente trabalho pretendemos avaliar se a aplicação de implantes de melatonina permite melhorar os resultados de fertilidade do sémen congelado de carneiros das raças Merina Preta e Campaniça, durante a Primavera, conforme foi já demonstrado noutros trabalhos, em que se verificaram aumentos na taxa de fertilidade (Kokois *et al.*, 2000). Esta hipótese, a ser validada, teria consequências práticas úteis, nomeadamente na possibilidade de melhorar a qualidade do sémen congelado em época menos favorável, o que permitiria a utilização dos machos durante todo o ano em centros de inseminação e a inclusão de sémen de qualidade em bancos dos Programas de Conservação Genética.

### 3.3 Material e métodos

Os trabalhos realizaram-se no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), situado na herdade da Abóbada, Serpa, Portugal (Latitude 37° 57' N, Longitude 7° 26' W, Altitude 242 m). Utilizaram-se as instalações existentes no referido Centro, nomeadamente laboratório, sala de cirurgia, pavilhões anexos cobertos e infraestruturas exteriores da herdade.

Foram utilizados 12 machos e 69 fêmeas de raça Merina Preta e 7 machos e 52 fêmeas de raça Campaniça, existentes no CEBA. Para a raça Merina Preta, os machos apresentavam idades compreendidas entre os 17 meses e os 7 anos e pesos entre os 66 e os 105 kg e para a raça Campaniça, os machos tinham idades entre os 18 meses e os 8 anos e pesos entre os 53 e os 75 kg. As fêmeas tinham idades entre os 2 e os 4 anos e entre os 2 e os 10 anos para as raças Merina Preta e Campaniça, respectivamente.

O período do ensaio decorreu de 25 de Fevereiro de 2002 a 5 de Novembro de 2002, correspondendo à data de formação dos grupos de machos e à data da última parição. Os machos encontravam-se estabulados num pavilhão anexo ao laboratório, com iluminação natural, sendo aí mantidos para um trabalho de avaliação seminal que decorreu em simultâneo com este. As fêmeas foram mantidas em pastoreio, sendo conduzidas para as mangas de maneio e pavilhões cobertos na altura dos trabalhos.

No dia 14 de Março de 2002 foram colocados três implantes de melatonina (*Melovine*<sup>®</sup>) em cada um dos machos de raça Campaniça e em metade dos de raça Merina Preta, escolhidos aleatoriamente, de forma a serem constituídos três grupos, um grupo de raça Merina Preta controlo, sem tratamento com melatonina (GPC; n=6) um grupo de raça Merina Preta tratado com melatonina (GPT; n=6) e um grupo de raça Campaniça, também tratado com melatonina (GCT; n=7).

Procedeu-se depois à congelação de sémen de todos os animais, em dois períodos. O primeiro decorreu 6 a 14 dias após a colocação dos implantes e o segundo 66 a 67 dias após aquela data, altura em que se esperaríamos já os efeitos da melatonina. Foi feita a avaliação qualitativa do sémen a fresco e, posteriormente, à descongelação pelas provas de mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose (HOST). Foi testada uma palhinha correspondente a cada

macho e para cada um dos dois períodos considerados, escolhida aleatoriamente do lote de sémen que se havia constituído. Numa fase posterior avaliou-se a fertilidade do sémen, dos mesmos lotes, recorrendo a inseminação artificial intrauterina por laparoscopia de fêmeas das mesmas raças que, por sua vez, foram submetidas a diagnóstico de gestação por ultrasonografia aos 53-55 dias de gestação para determinar a fertilidade nesta altura. A fertilidade efectiva foi registada na altura das parições.

### **3.3.1 Colheita e avaliação do sémen**

A recolha de sémen foi feita por vagina artificial. A avaliação qualitativa do sémen foi efectuada imediatamente após a recolha, no laboratório, através das provas de mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose, conforme já referido.

Na prova de mobilidade individual utilizou-se um microscópio com platina aquecida a 35°C e ampliação de 100×, fazendo-se a preparação colocando de uma gota de sémen diluída em soro fisiológico, numa lâmina aquecida a 37°C. Sobrepos-se depois uma lamela, também aquecida, e contou-se a percentagem de espermatozóides com movimentos progressivos.

O teste de coloração vital foi feito pelo método descrito por Evans e Maxwell (1987) utilizando o corante eosina-nigrosina. Foram contados 100 espermatozóides, em microscópio de contraste de fase, com ampliação de 400×, utilizando um contador manual para determinar a percentagem de espermatozóides vivos (não-corados).

A prova de endosmose utilizou uma solução a 100 mOsm/kg, composta por citrato tri-sódico di-hidratado (1,04 g) e água destilada (100 ml), através da técnica descrita por Ferreira *et al.* (2001), que consistiu em diluir 0,1 ml do sémen colhido em 1 ml da solução hipoosmótica, incubando esta preparação durante durante 30 minutos a 32°C. Depois disto, parou-se a reacção de endosmose, adicionando a uma gota da solução incubada uma gota de glutaraldeído em meio BL-1 (ver composição na Tabela 3-1). A observação foi feita em microscópio de contraste de fase com ampliação de 400×, após colocação de uma lamela aquecida. Foram contados 100 espermatozóides, com um contador manual, anotando-se a percentagem que apresentava enrolamento de cauda (reacção positiva).



Reagente	Quantidade
Glucose	2,9 g
Citrato tri-sódico 2H <sub>2</sub> O	1 g
Bicarbonato de sódio	0,2 g
Água destilada	100 ml

**Tabela 3-1: Composição química do meio BL-1 (Pursel *et al.*, 1972, citado por Ferreira *et al.*, 2001).**

### 3.3.2 Congelação de sémen

A congelação do sémen foi feita pelo método utilizado em anos anteriores no CEBA, no âmbito do Programa de Conservação Genética das raças Campaniça e Merina Preta.

Após retirada do sémen para as avaliações qualitativas já referidas, adicionámos o diluente comercial *Triladyt*<sup>®</sup>, em dose igual à do sémen, isto é, na proporção de 1:1. O diluente, aquecido à temperatura do sémen (32°C) em banho-maria, tem a composição referida na Tabela 3-2. Foi adicionado ao sémen lentamente, com recurso a seringa graduada esterilizada, tapando-se os tubos com papel de prata e mantendo-os no banho-maria.

Triladil <sup>®</sup>	
Água bidestilada	Tilosina
Glicerol	Gentamicina
TRIS	Spectinomicina
Ácido cítrico	Lincomicina
Frutose	Gema de ovo depurada

**Tabela 3-2: Composição do diluidor Triladil<sup>®</sup>**

O número de espermatozóides vivos, entretanto observado no teste de coloração vital, foi utilizado para calcular a diluição final do sémen, de modo a garantir uma quantidade constante de 100×10<sup>6</sup> espermatozóides em cada palhinha. Exigiu-se um mínimo de 70% de células vivas na contagem para o sémen ser processado.

Após a segunda diluição, preparámos o número de palhinhas correspondentes ao total de sémen diluído. Utilizaram-se palhinhas coloridas de 0,25 ml, que teriam uma capacidade útil de 0,22 ml devido ao espaço necessário à câmara de ar e tampão. Utilizando um marcador próprio, rotularam-se com a data de congelação, raça e número do carneiro. As palhinhas

foram cheias por sucção bucal, segundo o método descrito por Chemineau *et al.* (1991), retirado o excesso de sémen do extremo aberto, com uma seringa esterilizada de 1 ml, e fechadas com um tampão de pó de álcool polivinílico, tudo já a temperatura ambiente.

Depois do enchimento, as palhinhas foram postas em suportes próprios (*racks*) e colocadas no frigorífico à temperatura constante de 4°C durante 4 horas para equilíbrio, após o que se retiraram os suportes com as palhinhas do frigorífico. Continuou-se com o processo de congelação, numa primeira fase em vapores de azoto líquido (-75 a -125°C), utilizando um contentor de 5 litros com boca larga, com 4 cm de azoto líquido no fundo. Colocaram-se os suportes com as palhinhas sobre o azoto líquido e mantiveram-se aí durante 20 minutos, com o contentor fechado. Finalizou-se a congelação numa segunda fase por imersão das palhinhas em azoto líquido (-196°C) e seu armazenamento nos *canisteres* dos contentores de armazenamento.

### **3.3.3 Avaliação do sémen após descongelação**

A descongelação, para avaliação das palhinhas, foi feita por imersão da palhinha em banho-maria a 35°C, durante 30 segundos, colocando-se o sémen num tubo *ependorf* de 1 ml em banho-maria a 32°C. Avaliou-se a mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose, pelas mesmas técnicas referidas anteriormente, salvaguardando as diluições do sémen em cada prova em função da presença do diluidor.

### **3.3.4 Inseminação artificial**

A sincronização dosaios das ovelhas a inseminar foi feita com 40 mg de acetato de fluorogestona, em forma de esponja vaginal (*Chrono-gest*®), que foi colocada com auxílio de aplicador próprio. O progestagénio foi retirado ao fim de 12 dias, altura em que se administraram 450 UI de eCG (*Intergonan*®) a cada ovelha, por via intramuscular.

Vinte e quatro horas após a retirada das esponjas juntaram-se às ovelhas carneiros vasectomizados, equipados com arreios marcadores, para auxiliar na detecção deaios. Logo após esta introdução, observou-se o comportamento das ovelhas várias vezes durante o dia. As fêmeas com sinais de cio ou que se apresentavam marcadas foram sendo apartadas, registando-se os respectivos números identificadores e hora da separação. Nesta altura os

animais foram privados de água e comida, de modo a permitir um jejum de 24 horas antes da inseminação.

As inseminações foram realizadas 54 a 60 horas após a retirada dos implantes utilizando a ordem que havia sido observada na detecção deaios. As ovelhas foram tranquilizadas com 5 a 10 mg/kg de acepromazina (*Calmivet*<sup>®</sup>), administrados por via endovenosa 30 minutos antes da intervenção. Utilizou-se a via de inseminação intrauterina, por laparoscopia, pelo que os animais foram colocados em mesas próprias, com inclinação de 45°, em decúbito dorsal. A técnica consistiu em preparar cirurgicamente a zona de trocarterização, 10 a 15 cm cranialmente ao úbere por tricotomia e desinfecção com solução iodada e álcool. Depois, efectuou-se uma anestesia local por infiltração, com cloridrato de lidocaína a 2% (*Anesthesin*<sup>®</sup>). Para facilitar o acesso ao aparelho reprodutor criou-se um pneumoperitoneu artificial através da insuflação de ar filtrado, após o que se colocaram dois trocárteres, um para o laparoscópio, e o outro para pinça e pipeta de inseminação. Em primeiro lugar observaram-se as estruturas existentes em ambos os ovários e, depois, aplicou-se o sémen que foi escolhido aleatoriamente em cada raça. A descongelação do sémen fez-se por imersão da palhinha em água a 35°C, durante 30 segundos, sendo imediatamente aplicada no útero, metade da minipalhinha em cada corno. Para finalizar, suturaram-se as incisões com um ou dois agafos de *Michel* e aplicou-se um antibiótico local à base de cloridrato de oxitetraciclina por nebulização (*Terramicina Nebulizador*<sup>®</sup>). As ovelhas foram colocadas em local tranquilo, para recuperação.

### **3.3.5 Diagnóstico de gestação e resultados da parição**

Foi feito o diagnóstico de gestação nas fêmeas 53 a 55 dias após a inseminação por ultrasonografia transabdominal, utilizando um aparelho de ecografia em modo B (*Pie Medical, Maastricht, Holanda*), com sonda longitudinal de 5 MHz.

Na altura das partições registaram-se os borregos nascidos das ovelhas inseminadas, contando-se também os nado-mortos, de forma a determinar a taxa de fertilidade efectiva.

### **3.3.6 Tratamento estatístico**

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente recorrendo ao Proc GLM do SAS (*SAS Institute Inc.*, 1999-2000).

O modelo de análise de variância para os carneiros de raça Merina Preta (GPC vs. GPT), continha os efeitos do período (2 níveis) e do tratamento com melatonina (2 níveis) como factores principais, os efeitos dos testes de mobilidade individual, coloração vital e endosmose realizados na altura de recolha e após descongelação do sémen como covariáveis, e ainda o erro ou resíduo como efeito aleatório.

O segundo modelo utilizado foi semelhante ao anterior mas, neste caso, incluíram-se apenas os registos dos carneiros tratados com implantes (GPT vs. GCT), sendo o factor melatonina substituído pelo factor raça (2 níveis) e considerado-se também o efeito do período (2 níveis).

Por fim, recorrendo ao Proc Corr do SAS, calcularam-se as correlações entre as várias provas pelo método de Pearson, utilizando-se os dados de todos os carneiros (GPC, GPT e GCT).

## **3.4 Resultados**

Numa análise prévia pretendeu-se determinar se o tipo de estruturas ováricas, observadas por laparoscopia nas ovelhas, influenciou a fertilidade à inseminação artificial. Utilizou-se um modelo de análise de variância cujos factores foram a presença de folículos ou corpos hemorrágicos nos ovários na altura da inseminação. Os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos, pelo que este factor foi retirado do modelo.

Os resultados para os vários modelos realizados encontram-se nas tabelas Tabela 3-3 a Tabela 3-8. Não se notam diferenças entre os carneiros nos efeitos fixos considerando, nomeadamente, o tratamento com melatonina, o período de congelação e a raça. Do mesmo modo, nenhum dos factores de avaliação de sémen considerados nos modelos, à excepção da prova de coloração vital realizada na recolha, afectou significativamente as taxas de fertilidade.

Na Tabela 3-3 e Tabela 3-4 encontram-se os resultados de análise de variância para os animais de raça Merina Preta tratados e não-tratados com melatonina (GPT vs. GPC), em que se consideraram também os dois períodos de congelação. Não se registaram resultados estatisticamente relevantes, considerando as provas de avaliação efectuados após a recolha e após descongelação. O único parâmetro que parece ter alguma relação com a taxa de fertilidade é o teste de coloração vital efectuado ao sémen antes da congelação ( $p < 0,05$ ).

Factores		ECO	PARTO
		n=69	n=69
	G. L.	valor F	valor F
<b>Período</b>	1	3,17	1,30
<b>Melatonina</b>	1	0,60	0,11
<b>Mob. Ind. na recolha</b>	1	0,02	0,35
<b>Col. vital na recolha</b>	1	4,30*	1,91
<b>HOST na recolha</b>	1	0,36	1,71
<b>R<sup>2</sup></b>		0,110	0,064
<b>Coefficiente de variação</b>		159,98	179,42
<b>Média de fertilidade (%)</b>		27,7	24,2

\*P<0,05    \*\*P<0,01    \*\*\*P<0,001

**Tabela 3-3: Análise de variância para a raça Merina Preta (GPC vs. GPT) em função dos vários factores e provas avaliados na altura da recolha de sémen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo (R<sup>2</sup>), o coeficiente de variação e ainda a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia (ECO) ou no parto.**

Factores		ECO	PARTO
		N=69	n=69
	G. L.	valor F	valor F
<b>Período</b>	1	0,32	0,12
<b>Melatonina</b>	1	0,45	0,02
<b>Mob. Ind. após descong.</b>	1	1,93	3,26
<b>Col. vital após descong.</b>	1	0,01	0,15
<b>HOST após descong.</b>	1	0,47	0,45
<b>R<sup>2</sup></b>		0,092	0,076
<b>Coefficiente de variação</b>		160,18	175,92
<b>Média de fertilidade (%)</b>		27,9	24,6

\*P<0,05    \*\*P<0,01    \*\*\*P<0,001

**Tabela 3-4: Análise de variância para a raça Merina Preta (GPC vs. GPT) em função dos vários factores e provas avaliados após descongelação do sémen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo (R<sup>2</sup>), o coeficiente de variação e a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia ou no parto.**

Na análise de variância entre raças, em que os animais foram todos sujeitos a tratamento (GPT vs. GCT) e para os dois períodos de congelação, considerando as mesmas provas, não se notam quaisquer diferenças estatísticas (Tabela 3-5 e Tabela 3-6). De referir que o coeficiente de variação é elevado em todas as análises de variância, variando entre 137,04 e 179,42, o que demonstra as grandes diferenças nas observações. A fertilidade, em qualquer das análises variou entre os 27,7 e os 35,7%, quando obtida por ecografia, e entre os 24,2 e os 28,2% na altura do parto.

Fontes de variação	G. L.	ECO	PARTO
		n=84 valor F	n=84 valor F
Período	1	0,00	0,05
Raça	1	0,74	0,36
Mob. Ind. na recolha	1	0,07	0,09
Col. vital na recolha	1	1,11	1,15
HOST na recolha	1	0,06	0,87
R <sup>2</sup>		0,046	0,058
Coeficiente de variação		137,04	161,98
Média de fertilidade (%)		35,7	28,2

\*P<0,05    \*\*P<0,01    \*\*\*P<0,001

**Tabela 3-5:** Análise de variância para os animais tratados das duas raças (GPT vs. GCT), em função dos vários factores e provas avaliados na recolha de sêmen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo (R<sup>2</sup>), o coeficiente de variação e a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia ou no parto.

Fontes de variação	G. L.	ECO	PARTO
		n=84 valor F	n=84 Valor F
Período	1	0,12	0,17
Raça	1	0,33	0,20
Mob. Ind. à descong.	1	0,07	0,66
Col. vital à descong.	1	0,51	1,96
HOST à descong.	1	0,13	0,01
R <sup>2</sup>		0,024	0,060
Coeficiente de variação		143,76	168,95
Média de fertilidade (%)		33,7	26,2

\*P<0,05    \*\*P<0,01    \*\*\*P<0,001

**Tabela 3-6:** Análise de variância para os animais das duas raças (GPT vs. GCT), em função dos vários factores e provas avaliados após descongelação do sêmen, para os quais se referem os graus de liberdade (G.L.). Indicam-se também os valores de F, o resíduo (R<sup>2</sup>), o coeficiente de variação e a média de fertilidade, em função do diagnóstico de gestação por ecografia ou no parto.

Como o teste de coloração vital efectuado na altura da recolha foi a única covariável estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), efectuámos depois a análise de variância, considerando apenas esta prova, para obter as médias dos mínimos quadrados para a taxa de fertilidade, tanto na comparação entre os animais de raça Merina Preta (GPC vs. GPT; Tabela 3-7), como na comparação entre as duas raças (GPT vs. GCT; Tabela 3-8). Verifica-se que as únicas médias que diferem ( $p < 0,05$ ) referem-se às fertilidades ecográficas no período 1 e 2 nos carneiros de raça Merina Preta (GPC e GPT), com valores mais elevados no primeiro período.

VARIÁVEL		Fertilidade na ecografia (%)	Fertilidade no parto (%)
Melatonina	Com.	32,6±8,4	22,6±8,2
	Sem	24,4±7,3	25,9±7,2
Período	1	42,6±8,5 a	31,3±8,5
	2	14,4±8,2 b	17,2±8,0

**Tabela 3-7: Média dos mínimos quadrados ± erro-padrão para as taxas de fertilidade por ecografia ou ao parto, considerando como covariável o teste de coloração vital efectuado na altura de recolha do sémen. Os valores referem-se aos carneiros de raça Merina Preta, tratados ou não com implantes de melatonina (GPC vs. GPT), cujo sémen foi congelado em dois períodos (1 e 2). Médias com letras diferentes diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).**

VARIÁVEL		Fertilidade na ecografia (%)	Fertilidade no parto (%)
Raça	GPT	28,8±9,0	20,1±8,2
	GCT	37,1±7,0	27,8±6,4
Período	1	32,1±9,1	17,4±8,4
	2	33,8±7,8	30,4±7,1

**Tabela 3-8: Média dos mínimos quadrados ± erro-padrão para as taxas de fertilidade por ecografia ou ao parto, considerando como covariável o teste de coloração vital efectuado na altura de recolha do sémen. Os valores referem-se aos carneiros tratados com implantes de melatonina, de raça Merina Preta (GPT) ou Campaniça (GCT), cujo sémen foi congelado em dois períodos (1 e 2).**

As várias provas avaliadas apresentaram os resultados descritivos indicados na Tabela 3-9. Observando as médias das três provas notam-se, em qualquer delas, valores mais baixos após descongelamento. Em relação às correlações entre as várias provas (Tabela 3-10), verificamos que a mobilidade individual e a coloração vital, quando realizadas após a recolha de sémen,

	Variável	n	Máximo	Mínimo	Média ± desvio padrão	Coefficiente de variação
<b>ANTES DA CONGELAÇÃO</b>	<b>Mobilidade individual (%)</b>	121	90	50	82,60±10,41	12,60
	<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	114	94	42	81,70±11,77	14,41
	<b>HOST (% positivos)</b>	115	97	26	64,43±16,79	26,06
<b>APÓS DESCONGELAÇÃO</b>	<b>Mobilidade individual (%)</b>	121	70	5	42,27±18,22	43,11
	<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	121	85	20	55,81±18,69	33,49
	<b>HOST (% positivos)</b>	121	78	11	30,85±17,31	56,12

**Tabela 3-9:** Número de observações, valores máximos, mínimos, média ± desvio padrão e coeficiente de variação para as provas de mobilidade individual, coloração vital e teste de endosmose antes da congelação e após descongelação do sémen de todos os carneiros de raça Merina Preta e Campaniça (GPC, GPT e GCT).

	NA RECOLHA DE SÉMEN			APÓS DESCONGELAÇÃO			
	Variável	Mobilidade individual (%)	Coloração vital (% de vivos)	HOST (% positivos)	Mobilidade individual (%)	Coloração vital (% de vivos)	HOST (% positivos)
<b>NA RECOLHA DE SÉMEN</b>	<b>Mobilidade individual (%)</b>	1,0 (n=121)	0,361*** (n=114)	0,074 (n=115)	-0,045 (n=121)	-0,246** (n=121)	-0,007 (n=121)
	<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	0,361*** (n=114)	1,0 (n=114)	0,195* (n=108)	0,062 (n=114)	-0,166 (n=114)	0,115 (n=114)
	<b>HOST (% positivos)</b>	0,074 (n=115)	0,195* (n=108)	1,0 (n=115)	0,319*** (n=115)	0,328*** (n=115)	0,436*** (n=115)
<b>APÓS DESCONGELAÇÃO</b>	<b>Mobilidade individual (%)</b>	-0,045 (n=121)	0,062 (n=114)	0,319*** (n=115)	1,0 (n=121)	0,667*** (n=121)	0,332*** (n=121)
	<b>Coloração vital (% de vivos)</b>	-0,246** (n=121)	-0,166 (n=114)	0,328*** (n=115)	0,667*** (n=121)	1,0 (n=121)	0,384*** (n=121)
	<b>HOST (% positivos)</b>	-0,007 (n=121)	0,115 (n=114)	0,436*** (n=115)	0,332*** (n=121)	0,384*** (n=121)	1,0 (n=121)

**Tabela 3-10:** Correlações entre as provas de mobilidade individual, coloração vital e endosmose, realizadas na altura da recolha de sémen ou após descongelação das minipalhinhas, para todos os carneiros das raças Merina Preta e Campaniça (GPC, GPT e GCT). Indicam-se os valores estatisticamente significativos para  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*).



foram as únicas com correlação altamente significativa ( $p < 0,001$ ), registrando um valor de 0,36. Das provas efectuadas após descongelação, há correlações altamente significativas ( $p < 0,001$ ) e positivas entre as três provas, mas o valor mais elevado estabelece-se entre as provas de mobilidade individual e coloração vital ( $r = 0,67$ ). A endosmose após descongelação apresenta correlações de 0,32 e 0,38 com a mobilidade individual e a coloração vital, respectivamente. De realçar ainda que o teste de endosmose realizado antes da congelação foi única prova, realizada nesta altura, com correlações altamente significativas ( $p < 0,001$ ) com as provas após descongelação, com valores de 0,32, 0,33 e 0,44 para a mobilidade individual, coloração vital e endosmose, respectivamente. A endosmose foi também a única prova com correlação positiva e significativa ( $p < 0,001$ ) quando realizada antes e após congelação ( $r = 0,44$ ).

### **3.5 Discussão e conclusões**

Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que a aplicação de implantes de melatonina nos machos não influenciou a taxa de fertilidade do sémen congelado. A prova de coloração vital realizada na recolha foi a única significativa na análise fertilidade que diferiu, quando se considerou apenas esta prova no modelo, entre os dois períodos de congelação para os carneiros de raça Merina Preta (GMT e GMC), com valores mais elevados no primeiro período ( $p < 0,05$ ). Não se verificaram quaisquer diferenças entre as duas raças estudadas, em todos os animais tratados (GMT vs. GCT).

Foi demonstrado por alguns autores que a acção da melatonina em carneiros ocorre algumas semanas após a colocação dos implantes, já que apenas 45 dias após essa data se notam aumentos dos níveis séricos de testosterona (Chemineau *et al.*, 1992; Kokois *et al.*, 2000). Nas fêmeas referem-se 70 dias como duração ideal do tratamento para que se observe uma elevação dos níveis da gonadotrofina LH entre os 40 e os 60 dias (Staples *et al.*, 1992; Chemineau *et al.*, 1996; Vigué *et al.*, citado por Forcada *et al.*, 2000a; Bittman *et al.*, 1985, citados por Forcada *et al.*, 2000b). Por esta razão, no presente trabalho, esperavam-se algumas diferenças na fertilidade do sémen congelado no segundo período, altura em que haviam já decorrido 66 a 67 dias da colocação dos implantes. No primeiro período de congelação, que ocorreu 6 a 14 dias após colocação dos implantes, não esperávamos registar qualquer

influência do tratamento. A obtenção de fertilidade superior no primeiro período, nos carneiros de raça Merina Preta (GMC e GMT), pode ser justificada por este ser um período ainda menos desfavorável à reprodução relativamente ao segundo que ocorreu já em plena Primavera.

A sazonalidade reprodutiva manifesta-se em vários parâmetros, que estão diminuídos na época menos favorável, onde podemos destacar os níveis hormonais, as alterações morfológicas (perímetro testicular) e parâmetros de avaliação seminal (Baptista e Mascarenhas, 1977; Colas, 1980; Dacheaux *et al.*, 1981; Pelletier *et al.*, 1982; Boland *et al.*, 1985; Evans e Maxwell, 1987; Lopez, 1991; Chemineau *et al.*, 1992; Gerlach e Aurich, 2000; Hafez e Hafez, 2000b). Há também referência a menor capacidade fecundante do sémen na Primavera do que no Outono (Colas, 1981; Guerin, 1990), embora outros autores tenham registado taxas de fertilidade semelhantes do sémen recolhido durante os vários meses do ano (Hill *et al.*, 1998). Em Portugal, referem-se mesmo níveis elevados de fertilidade durante a Primavera (Barbas *et al.*, 1991; Bettencourt, 1999). De facto, parece que as raças existentes em latitudes mediterrânicas, e concretamente em Portugal, apresentam menor sazonalidade reprodutiva (Silva, 1991; Bettencourt e Fialho, 1992; Alonso de Miguel e Cognié, 1980, citados por Chemineau, 1992; Azcona *et al.*, 2001). Este facto permite inferir que a fertilidade do sémen colhido ao longo do ano não apresenta grandes diferenças. Por esta razão, os tratamentos com melatonina, que visam simular uma época favorável, podem não alterar significativamente a qualidade do sémen nesta localização geográfica. Em latitudes mais elevadas, os tratamentos luminosos permitiram melhorar a fertilidade na cobrição natural (Schanbacher, 1979) e também a fertilidade do sémen congelado (Fiser e Batra, 1984, Fiser e Fairfull, 1983, 1986, Zheltobryuk *et al.*, 1990, citados por Salamon e Maxwell, 1995b). Kokois *et al.* (2000) refere que o tratamento com melatonina permitiu aumentar a actividade da enzima acrosina, com possibilidade de melhorar a fertilidade do sémen congelado.

A fertilidade prevista em todos os grupos de ovelhas inseminadas, com base no diagnóstico por ecografia, variou entre os 27,7 e os 35,7%. Ao parto a fertilidade oscilou entre os 24,2 e os 28,2%. Estes valores são semelhantes aos conseguidos anteriormente (26 a 32%) utilizando a mesma técnica de congelação e inseminação (Rodrigues, 2001). Notam-se ainda ligeiras diferenças entre a fertilidade estimada através do diagnóstico de gestação por ecografia e a fertilidade efectiva pelos registos de partições. Esta diferença pode ser explicada pela

ocorrência eventual de alguns abortos após a data de ecografia que, devido ao facto das ovelhas se encontrarem em regime extensivo, possam ter passado despercebidos. Por outro lado, podem ter ocorrido erros no diagnóstico de gestação. Apesar da precisão da ecografia na altura em que foi realizada neste trabalho poder ser de 100% ou próximo deste valor (Fowler e Wilkins, 1984; Buckrell, 1988; Gearhart *et al.*, 1988), não excluimos essa possibilidade.

Em relação às várias provas efectuadas, o teste de coloração vital realizado após a recolha foi a única covariável significativa ( $p < 0,05$ ), apenas no modelo que incluía os carneiros Merino Preto (GPC vs. GPT), pelo que poderá ser utilizada, em algum grau, para estimar a fertilidade a obter na utilização de sémen congelado de carneiro. Das outras duas provas, há autores que referem que o HOST pode permitir inferir a capacidade de resistência do sémen à congelação (Artiga, 1994) e Wierzbowski e Kareta (1993) indicam que o valor preditivo da fertilidade pela mobilidade individual é limitado.

A congelação do sémen reduziu o número de espermatozóides viáveis, o que pode ser verificado pelas médias das provas de mobilidade individual, coloração vital e endosmose, que apresentaram um decréscimo de 48,8, 31,7 e 52,1%, respectivamente. Das três provas, a que registou valores mais baixos e que apresentou maior decréscimo foi a de endosmose, o que se justifica plenamente, já que está demonstrado que durante o processo de congelação os efeitos deletérios se processam principalmente a nível da membrana plasmática (Parks e Graham, 1992; Salamon e Maxwell, 1995b, 2000; Barrios *et al.*, 2000). Esta prova é a única das três que avalia a funcionalidade dessa estrutura (Jeyendran *et al.*, 1984; Vazquez *et al.*, 1997) e, segundo Artiga (1994), pode reflectir a capacidade de sobrevivência dos espermatozóides à congelação, quando realizada após a recolha, como referido anteriormente. Segundo Hauser *et al.* (1992) após a congelação os valores de HOST decrescem significativamente, não tendo valor preditivo na fertilidade.

As correlações entre as várias provas efectuadas em todos os carneiros (GPC, GPT e GCT) permitiram concluir que a endosmose é a que apresenta correlação mais elevada ( $r=0,44$ ) e muito significativa ( $p < 0,001$ ) com ela própria, quando realizada antes e após congelação. De qualquer maneira, a correlação mais elevada, altamente significativa ( $p < 0,001$ ) estabeleceu-se entre as provas de mobilidade individual e coloração vital realizadas após descongelação ( $r=0,67$ ).

Dos resultados obtidos, concluímos que o tratamento com melatonina a carneiros das raças Merina Preta e Campaniça não provocou diferenças na fertilidade do sémen congelado, não se registando também diferenças entre raças. A prova de coloração vital foi a única com significância, quando realizada na altura da colheita de sémen. A ausência de diferenças na fertilidade pode ser justificada pela menor sazonalidade das raças estudadas na latitude do Sul de Portugal.

#### 4. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F., Vazquez, I.A. (1991a). Studies on the presence and absence of glicerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology*, 28: 36-42.
- Abdelhakeam, A.A., Graham, E.F., Vazquez, I.A., Chaloner, K.M. (1991b). Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology*, 28: 43-49.
- Aguado, M.J., Garde, J., Gracia, O., Perez-Guzman, M.D., Montoro, V., Vazquez, I. (1995). Entrenamiento y evaluacion de la aptitud reproductiva de los moruecos para la elaboracion de dosis seminales. *Ovis*, 36: 17-25.
- Aisen, E.G., Medina, V.H. (1992). Evaluacion del semen ovino congelado-descongelado. Correlación entre los parámetros vinculados. In: Libro de comunicaciones / VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Salamanca, España, pp. 336-341.
- Aisen, E.G., Medina, V.H., Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57: 1801-1808.
- Almeida, G., Pelletier, J. (1988). Abolition of seasonal testis changes in the Île-de-France ram by short light cycles: relationship to luteinizing hormone and testosterone release. *Theriogenology*, 29 (3): 681-691.
- Anderson, G.M., Connors, J.M., Hardy, S.L., Valent, M., Goodman, R.L. (2001). Oestradiol microimplants in the ventromedial preoptic area inhibit secretion of luteinizing hormone via dopamine neurons in anoestrous ewes. *Journal of Neuroendocrinology*, 13: 1051-1058.
- Anel, L. (1992). Inseminacion intrauterina com semen descongelado en la oveja. In: Libro de ponencias y mesas redondas: programa definitivo/ VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Salamanca, España, pp. 229-234.
- Anel, L., Boixo, J.C., Anel, E., Carbajo, M., Domínguez, J.C., Olmedo, J.A., Alvarez, M., Chamorro, C., Paz, P. (1992). Inseminacion intrauterina (laparoscopia) en ovejas: resultados preliminares de su aplicacion en condiciones de campo. In: Libro de comunicaciones de las VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Salamanca, España, pp. 354-359.

- Anel, L., Carbajo, M., Dominguez, J.C., Anel, E., Boixo, J.C., Chamorro, C., de Paz, P., Olmedo, J.A. (1995). Tecnicas de aplicacion seminal en la inseminacion artificial ovina. *Ovis*, 36: 63-81.
- Anguita, A.M., Portero, F., Deletang, F., Martino, A. (2001). Utilizacion de implantes de melatonina en corderas merinas durante el anestro estacional. Comparación de su uso en la Sierra Norte de Sevilla en dos rebaños distintos. In: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1046-1051.
- Angulo, V.M., Aguado, M.J., Perez-Guzman, M.D., Garde, J.J. (1995). Premisas para la utilizacion de da inseminacion artificial ovina en España. *Ovis*, 36: 11-16.
- Armstrong, D.T., Evans, G. (1984). Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 71: 89-94.
- Artiga, C.G. (1994). Test de endosmisis em ovino. In: Ponencias y comunicaciones de las 7<sup>as</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Murcia, España, pp. 77-81.
- Artiga, C.G., Martinez, E., Perez-Fuentes, J., Vazquez, I. (1995). Determinacion de la calidad seminal en morueco. *Ovis*, 36: 27-36.
- Ashdown. R.R., Hafez E.S.E. (1993). Anatomy of male reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*, 6<sup>th</sup> edition. Editor: E.S.E Hafez, Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 3-19.
- Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellin, M.E. (2000a). Semen evaluation. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 365-375.
- Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellin, M.E. (2000b) Artificial insemination. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 376-389.
- Azcona, V.A., González, A.M., Jurado, J.C.M., Garcia, García-Cervigón, M., Pasamontes, M.D.P., Angulo, V.M. (2001). Influencia de los implantes de melatonina sobre la calidad seminal en los moruecos del esquema de selección de la raza ovina Manchega. In: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 997-982.

- Baptista, M.C., Mascarenhas, R.D. (1977). Etude de la variation saisonniere de l'activite sexuelle chez le belier Serra da Estrela pendant l'annee. In: Abstracts do 38º Congresso da Federação Europeia de Zootecnia, Lisboa, vol. II, pp. 927.
- Barbas, J.P., Vasquez, M.I., Mascarenhas, R.D. (1991). Actividade ovárica da ovelha Serra da estrela: variação sazonal. Colectânea da S.P.O.C., 2(1): 151-158.
- Barrell, G.K., Thurn, L.A., Brown, M.E., Viguié, C., Karsch, F.J. (2000). Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biology of Reproduction*, 63: 769-774.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*, 63: 1531-1537.
- Bearden, H.J., Fuquay, J.W. (1997a). Neuroendocrine regulators of reproduction. In: *Applied animal reproduction*. 4<sup>th</sup> edition, Prentice-Hall Inc., London, pp. 33-50.
- Bearden, H.J., Fuquay, J.W. (1997b). The estrous cycle. In: *Applied animal reproduction*. 4<sup>th</sup> edition, Prentice-Hall Inc., London, pp 52-65.
- Bearden, H.J., Fuquay, J.W. (1997c). Introduction and History of artificial insemination. In: *Applied animal reproduction*. 4<sup>th</sup> edition, Prentice-Hall Inc., London, pp.142-146.
- Bearden, H.J., Fuquay, J.W. (1997d). Semen evaluation. In: *Applied animal reproduction*. 4<sup>th</sup> edition, Prentice-Hall Inc., London, pp. 158-170.
- Bettencourt, C.M.V., Fialho, J.B. (1992). Sazonalidade reprodutiva e “efeito macho” em ovelhas da raça Merino Branco. In: *Publicações do 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal: comunicações livres: bovinos, ovinos, equinos, suínos, outras espécies*, volume II, Luso, Portugal, pp. 256-262.
- Bettencourt, E.M.V. (1999). Caracterização de parâmetros reprodutivos nas raças ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. Tese de Mestrado, Lisboa, FMV/UTL.
- Bettencourt, E.M.V., Bettencourt, C.M.V., Matos, C.A.P., Simões, J.P.C. (1997). Utilização da inseminação artificial em raças ovinas autóctones do Sul de Portugal. In: *Comunicações livres do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, volume II, Estoril, Portugal, pp. 431-435.
- Bodin, L., Elsen, J.M., Hanocq, E., François, D., Lajous, D., Manfredi, E., Mialon, M.M., Boichard, D., Foulley, J.L., San-Cristobal-Gaudy, M., Teyssier, J., Thimonier, J., Chemineau, P. (1999). Génétique de la reproduction chez les ruminants. *INRA Productions Animales*, 12 (2): 87-100.

- Boersma, A., Raßhofer, R., Stolla, R. (2001). Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the Morphology Analyser Integrated Visual Optical System. *Reproduction in Domestic Animal*, 36: 222-229.
- Boland, M.P., Al-Kamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B., Howles, C.M., Kelleher, D.L., Gordon, I. (1985). The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. *Animal Reproduction Science*, 9: 241-252.
- Braun, W.F., Thompson, J.M., Ross, C.V. (1980). Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology*, 13 (3): 221-229.
- Brice, G., Chemineau, P. (1996). Traitements utilisant la photopériode et la mélatonine pour le contrôle de la fonction de reproduction chez les mammifères d'élevage. In: Abstracts des communications des Journées Scientifiques de la Physio: Mélatonine et rythmes circadiens et circannuels chez les mamifères. INRA, France.  
<http://www.tours.inra.fr/tours/prmd/melatonine/brice.htm>
- Buckrell, B.C. (1988). Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology*, 29 (1): 71-84.
- Buckrell, B.C., Buschlbeck, C., Gartley, C.J., Kroetsch, T., McCutcheon, W., Martin, J., Penner, W.K., Walton, J.S. (1994). Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, 42: 601-611.
- Byrne , G.P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy , P., Donovan, A., Hanrahan, J.P., Boland, M.P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, 62: 265-275.
- Caldeira, R.M.V.H. (1992). A condição corporal em ovinos: sua avaliação e interesse do seu conhecimento no manejo dos rebanhos. *Veterinária Técnica*, Ano 2, 3: 14-18.
- Carlson, C.D. (s/ data). The effect of melatonin dosage and progesterone on reproduction in anestrus ewes.  
<http://www.csuchico.edu/agr/research/ccarlson.shtml>
- Carolino, R.N. (1999). Caracterização das Raças Autóctones Portuguesas. In: XXXIX Reunião Luso-Espanhola sobre Higiene, Sanidade e Produção Animal, Lisboa.
- Chagas e Silva, J.N. (1992). Inseminação artificial em ovinos. *Colectânea S.P.O.C.*, 3 (1): 61-80



- Chemineau, P., Cagnié, Y., Guérin, Y., Orgeur, P., Vallet, J-C. (1991). Training manual on artificial insemination in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper, 83. Editor: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Chemineau, P. (1992). Medio ambiente y reproducción animal. In: Conferência de clausura de das VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal, Salamanca, España.  
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/war/wrall/v165ob/v165ob04.htm>
- Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Guérin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Animal Reproduction Science*, 30: 157-184.
- Chemineau, P., Malpaux, B., Pelletier, J., Leboeuf, B., Delgadillo, J.A., Deletang, F., Pobel, T., Brice, G. (1996). Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins. *INRA Productions Animales*, 9 (1): 45-60.
- Chemineau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Leboeuf, B. (1998). Photopériodisme et reproduction chez les caprins. In: Communication dans le Colloque “Reproduction caprine: nouveaux contextes, derniers acquis”, Niort, France.
- Choudhry, T.M., Berger, T., Dally, M. (1995). In vitro evaluation of cryopreserved ram semen and its correlation with relative *in vivo* fertility. *Theriogenology*, 43: 1195-1200.
- Colas, G. (1980). Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20(6): 1789-1799.
- Colas, G. (1981). Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. II. Fécondance: relation avec les critères qualitatifs observés *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 21(3): 399-407.
- Colas, G. (1986). Factors affecting the quality of ram semen. In: *Sheep production*. Editor: W. Haresign, Butterworths, London, pp. 453-465.
- Colas, G., Guerin, Y., Briois, M., Ortavant, R. (1987). Photoperiodic control of testicular growth in the ram lamb. *Animal Reproduction Science*, 13: 255-262.
- Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP)(s/ data). Melatonin: summary report. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, U.K.  
<http://www.eu.int/pdfs/vet/mrls/melatonin.pdf>

- Conduto, R. (1996). A ovelha Campaniça – origem, efectivos, Livro Genealógico, características genéticas, morfológicas e produtivas. Sistemas de Exploração. Colectânea da S.P.O.C., 6(1): 13-18.
- Correa, J.R., Heersche, G., Jr, Zavos, P.M. (1997a). Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*, 47: 715-721.
- Correa, J.R., Pace, M.M., Zavos, P.M. (1997b). Relationships among frozen-tawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48: 721-731.
- Correa, J.R., Zavos, P.M. (1994) The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42: 351-360.
- Cortes, S., Nuñez, R., Vazquez, I. (1993). Capacidad de reaccion a endosmosis del espermatozoide de macho cabrio. In: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Internacional Meeting on Animal Reproduction*, Murcia, España, pp. 225-230.
- Courot, M. (1979). Semen quality and quantity in the ram. In: *Sheep Breeding*. 2<sup>nd</sup> edition. Editores: G.J. Tomas, D.E. Robertson, R.J. Lightfoot, Butterworths, London, pp. 495-504.
- Cruz e Silva, J.C. (1991). Variações sazonais das características dos ejaculados obtidos por electroejaculação de ovinos Saloios. In: *Resumos do IV Simposium Internacional de Produção Animal*. Lisboa, volume II, pp. 140-157.
- Cunningham, W., Marsh, D. (1997). Pregnancy diagnosis. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, 1<sup>st</sup> edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 612-616.
- Dacheux, J.L., Pisselet, C., Blanc, M.R., Hochereau-de-Reviers, M-T, Courot, M. (1981) Seasonal variations in *rete testis* fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61: 363-371.
- D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Colonna, M.A., Bellitti, A. (2001). Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55: 1159-1170.
- Dally, M.R. (2001). Laparoscopic artificial insemination. A means to improve genetics. <http://www.toprams.com/lai.htm>

- Deveson, S.L., Arendt, J., Forsyth, I.A. (1992). The influence of the pineal gland and melatonin on the reproductive performance of domesticated female ungulates. *Animal Reproduction Science*, 30: 113-134.
- Dias, F.E.F., Lopes Junior, E.S., Villaroel., A.B.S., Rondina, D., Lima-Verde, J.B., Paula, N.R.O., Freitas, V.J.F. (2001). Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslançadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53 (5): 618-623.
- D'Occhio, M.J., Suttie, J.M. (1992). The role of the pineal gland and melatonin in reproduction in male domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, 30: 135-155.
- Donovan, A., Hanrahan, J.P., Lally, T., Boland, M.P., Byrne, G.P., Duffy, P., Lonergan, P., O'Neill, D.J. (2001). AI for sheep using frozen-thawed semen. In: End of Project Report (ARMIS 4047), The Department of Agriculture, Food and Rural Development, Ireland.
- Dott, H.M., Foster, G.C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "live/dead" stain. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29: 443-445.
- Dufour, J.J., Fahmy, M. H., Minvielle, F. (1984). Seasonal changes in Breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *Journal of Animal Science*, 58 (2): 416-422.
- Duguma, G., Cloete, S.W.P., Schoeman, S.J., Jordan, G.F. (2002). Genetic parameters of testicular measurements in Merino rams and the influence of scrotal circumference on total flock fertility. *South African Journal of Animal Science*, 32 (2): 76-82.
- Dýrmundsson, Ó. R., Sigtryggsson, P., Torsteinsson, S.S. (1981). Seasonal variation in testis size of Iceland rams. *Íslenzkar Landbúnadarrannsóknir, J. Agr. Res. Icel.*, 13 (1-2): 55-60.
- El-Alamy, M.A., Foote, R.H. (2001). Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, 65: 254-254.
- El-Alamy, M.A., Foote, R.H., Hare, E. (2001). Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long- and short-day lighting. *Theriogenology*, 56: 839-854.
- English, J., Poulton, A.L., Arendt, J., Symons, M. (1986). A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77: 321-327.

- Eppleston, J., Maxwell, W.M.C. (1995). Sources of variation in the reproductive performance of ewes inseminated with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology*, 43: 777-788.
- Eppleston, J., Roberts, E.M. (1986). The effect of progestagen, PMSG and time of insemination on fertility in ewes following intra-uterine insemination with frozen semen. *Australian Veterinary Journal*, 63 (4): 124-125.
- Eppleston, J., Salamon, S., Moore, N.W., Evans, G. (1994). The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 211-225.
- Espinosa, E., Solanilla, E., Josa, A., Gil, L., Falceto, M.V., Del Niño, A., Muñoz, I. (1993). Relación entre el test de endosmosis y los parametros de contrastación seminal (tinción vital, concentración y motilidad) en ganado vacuno. In: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> Internacional Meeting on Animal Reproduction*, Murcia, España, pp. 181-186.
- Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of sheep and goats*. Butterworths Pty Limited, Sydney, Australia.
- Evans, G., 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, Cambridge*, 94: 69-88.
- FAO – Food and Agriculture Organization (1992). Expert Consultation on the management of global animal genetic resources. In: *FAO-report 1992*, Rome, Italy.
- Ferreira, G.M.B.C., Sousa, J.P.F., Barbas, J.P., Horta, A.E.M. (2001). Teste de endosmose (HOST) em sêmen de caprinos da raça Serrana. In: *Proceedings do III Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Porto, Portugal, pp. 559-564.
- Findlater, R.C.F., Haresign, W., Curnock, R.M., Beck, N.F.G. (1988). Effect of timing of intrauterine insemination with frozen-tawed semen on fertility in ewes. In: *Proceedings du 3eme Congrès Mondiale de Reproduction et selection des ovins et bovines a viande*, volume 1, Paris, France, pp. 194-196.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W. (1986). Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 25: 473-484.
- Fitzgerald, J. (1997). Applied reproductive physiology of the ram. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, 1<sup>st</sup> edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 571-574.

- Fitzgerald, J.A., Ruggles, A.J., Stellflug, J.N., Hansel, W. (1985). A seven-day synchronization method for ewes using medroxyprogesterone acetate (MAP) and prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Journal of Animal Science*, 61: 466-469.
- Fitzgerald, J.A., Stellflug, J.N. (1991). Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. *Journal of Animal Science*, 69: 264-275.
- Fitzgerald, J.A., Stellflug, J.N. (1998). Laparoscopy and artificial insemination of sheep. <http://www.hawaii.edu/ansc/Proceed/Hhl/sheeplap.htm>
- Forcada, F., Abecia, J.A. (2000). Control de la actividad reproductiva del ovino. *Mundo Ganadero*, 122.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Zarazaga, L.A., Lozano, M. (2000a). Importancia del fotoperiodo en la regulación de la actividad reproductora. *Ovis*, 71: 13-32.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Zúñiga, O., Martino, A. (2000b). Posibilidades de aplicación práctica de la meatonina en el control de la actividad reproductora del ganado ovino. *Ovis*, 71:65-86.
- Forcada, F., Abecia, J.A., Zúñiga, O. (2001). Efecto de la melatonina sobre la secrecion de progesterona in vivo y el desarrollo embrionario in vitro. In: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1010-1015.
- Fowler, D.G., Wilkins, J.F. (1984). Diagnosis of pregnancy and number of foetuses in sheep by real-time ultrasonic imaging. I. Effects of number of foetuses, stage of gestation, operator and breed of ewe on accuracy of diagnosis. *Livestock Production Science*, 11: 437-450.
- Frazer, L., Gorszczaruk, K., Strzezek, J. (2001). Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reproduction in Domestic Animal*, 36: 325-329.
- Fukui, Y., Ishikawa, D., Ishida, N., Okada, M., Itagaki, R., Ogiso, T. (1999). Comparison of fertility of estous synchronized ewes with four different intravaginal devices during breeding season. *Journal of Reproduction and Development*, 45 (5): 337-343.
- Fukui, Y., Itagaki, R., Ishida, N., Okada, M. (2001). Effect of different hCG treatments on fertility of estrus-induced and artificially inseminated ewes during the non-breeding season. *Journal of Reproduction and Development*, 47 (4): 189-195.
- García, A., Neary, M.K., Kelly, G.R., Pierson, R.A. (1993). Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. *Theriogenology*, 39 (4): 847-861.

- Garde, J., Pérez, S., Garrido, D., Aguado, M.J., Angulo, C., Pérez Guzmán, M.D., Juménez, J., Montoro, V. (1993). Aplicacion del semen congelado de morueco por via intrauterina dentro del esquema de seleccion de la raza ovina Manchega: resultados preliminares. In: Publicações do 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal: comunicações livres: bovinos, ovinos, equinos, suínos, outras espécies, Luso, Portugal, pp. 293-298.
- Garner, D.L., Hafez, E.S.E. (1993). Spermatozoa and seminal plasma. In: Reproduction in Farm Animals, 6<sup>th</sup> edition. Editor: E.S.E Hafez. Philadelphia, Lea & Febiger, pp 165-187.
- Garner, D.L., Hafez, E.S.E. (2000). Spermatozoa and seminal plasma. In: Reproduction in Farm Animals, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 96-109.
- Gastel, T., Bielli, A., Perez, R., Lopez, A., Castrillejo, A., Tagle, R., Franco, J., Laborde, D., Forsberg, M., Rodriguez-Martinez, H. (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science*, 40: 59-75.
- Gerhart, M.A., Wingfield, A.P., Knight, A.P., Smith, J.A., Dargatz, D.A., Boon, J.A., Stokes, C.A. (1988). Real-time ultrasonography for determining pregnancy status and viable fetal numbers in ewes. *Theriogenology*, 30 (2): 323-337.
- Gerlach, T., Aurich, J.E. (2000). Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Animal Reproduction Science*, 58: 197-213.
- Gherardi, P.B., Lindsay, D.R. (1980). The effect of season on the ovulatory response of Merino ewes to serum from pregnant mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 425-429.
- Gil, J., Rodriguez-Irazoqui, M., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (2002). Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of ram semen after cervical insemination. *Theriogenology*, 57: 1781-1792.
- Gil, J., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (2000). Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, 54: 93-108.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1997). Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction Fertility Development*, 9: 481-487.
- Gillan, L., Maxwell, W.M.C. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 54: 271-283.

- Gillan, L., Skovgold, K., Watson, P.F., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (1999). Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. *Reproduction Fertility Development*, 11: 309-315.
- Goddard, S. (1991). A practical application of melatonin for use in sheep and goats. *Colectânea da S.P.O.C.*, 2 (1): 73-76.
- González de Bulnes, A., Moreno, J.S., Sebastián, A.L. (1999a). Principios básicos de ultrasonografía. *Ovis*, 61: 13-19.
- González de Bulnes, A., Moreno, J.S., Sebastián, A.L. (1999b). Exploración del aparato genital femenino. *Ovis*, 61: 21-33.
- González de Bulnes, A., Moreno, J.S., Sebastián, A.L. (1999c). Diagnóstico de gestación y determinación del número de embriones. *Ovis*, 61: 35-40.
- Gravance, C.G., Champion, Z.J., Casey, P.J. (1998). Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, 49: 1219-1230.
- Guerin, Y. (1990). Méthodes de conservation de la semence ovine. *Élevage & Insemination*, 236: 3-14.
- Guerin, M.V., Deed, J.R., Matthews, C.D. (2000). The coincidence of light and melatonin with a specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding in the ewe. *Journal of Biological Rhythms*, 15 (6): 514-523.
- Hafez, E.S.E. (1987). Reproductive behavior. In: *Reproduction in Farm Animals*, 5<sup>th</sup> edition. Editor: E.S.E Hafez. Philadelphia, Lea & Febiger, pp 260-294.
- Hafez, E.S.E. (1993). Artificial insemination. In: *Reproduction in Farm Animals*, 6<sup>th</sup> edition. Editor: E.S.E Hafez. Lea & Febiger, Philadelphia, pp 424-439.
- Hafez, E.S.E. (2000a). Anatomy of male reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 3-12.
- Hafez, E.S.E. (2000b). Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 431-442.
- Hafez, B., Hafez, E.S.E., (2000a). Anatomy of female reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 13-29.

- Hafez, B., Hafez, E.S.E., (2000b). Reproductive cycles. In: Reproduction in Farm Animals, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 55-67.
- Hafez, E.S.E., Jainudeen, M.R., Rosnina, Y. (2000). Hormones, Growth Factors and Reproduction. In: Reproduction in Farm Animals, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 33-54.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Buckrell, B.C. (1990a). A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33: 993-1010.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Sharpe, P., Buckrell, J.S. (1990b). Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, 33: 1231-1243.
- Hanif, M., Williams, H. (1991). The effects of melatonin and light treatment on the reproductive performance of yearling Suffolk rams. *British Veterinary Journal*, 147: 49-56.
- Haresign, W., Peters, A.R., Staples, L.D. (1990). The effect of melatonin on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Animal Production*, 50: 111-121.
- Hauser, R., Yavetz, G., Paz, G.F., Homonnai, T., Amit, A., Lessing, J.B., Peyser, M.R., Yogev, L. (1992). The predictive fertilization value of the hypoosmotic swelling test (HOST) for fresh and cryopreserved sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 9 (3): 265-270.
- Hawk, H.W., Cooper, B.S., Pursel, V.G. (1981). Increased sperm death in the cervix and uterus of estrous ewes after regulation of estrous with prostaglandin or progestogen. *Journal of Animal Science*, 52 (3): 601-610.
- Hill, J.R., Thompson, J.A., Perkins, N.R. (1998). Factors affecting pregnancy rates following laparoscopic insemination of 28 447 Merino ewes under commercial conditions: a survey. *Theriogenology*, 49: 697-709.
- Hochereau-de Reviers, M.T., Perreau, C., Lincoln, G.A. (1985). Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 74: 329-334.
- Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.



- Howles, C.M., Craigon, J., Haynes, N.B. (1982). Long-term rhythms of testicular volume and plasma prolactin concentrations in rams reared for 3 years in constant photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65: 439-446.
- Howles, C.M., Webster, G.M., Haynes, N.B. (1980). The effect of rearing under a long or short photoperiod on testis growth, plasma testosterone and prolactin concentrations, and the development of sexual behaviour in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 437-447.
- Husein, M.Q., Bailey, M.T., Ababneh, M.M., Romano, J.E., Crabo, B.G., Wheaton, J.E. (1998). Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology*, 49: 997-1005.
- Ibrahim, S.A. (1997). Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. *Animal Reproduction Science*, 49: 161-167.
- Islam, A.B.M.M., Land, R.B. (1977). Seasonal variation in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy. *Animal Production*, 25: 311-317.
- Jainudeen, M.R., Hafez, E.S.E., (2000). Pregnancy diagnosis. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 395-404.
- Jainudeen, M.R., Wahid, H., Hafez, E.S.E., (2000). Ovulation induction, embryo production and transfer. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Editor: B. Hafez, E.S.E. Hafez, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, pp. 405-430.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction & Fertility*, 70: 219-228.
- Jondet, R. (1976). Insemination of cows with semen thawed "in vivo". In: *VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Cracow.
- Kaya, A., Aksoy, M., Baspinar, N., Yildiz, C., Ataman, M.B. (2001). Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animal*, 36: 211-215.
- Kaya, A., Baspinar, N., Yildiz, C., Kurtoglu, F., Ataman, M.B., Haliloglu, S. (2000). Influence of melatonin implantation on sperm quality, biochemical composition of the seminal plasma and plasma testosterone levels in rams. *Revue de Medecine Veterinaire*, 151 (12): 1143-1146.

- Keisler, D.H., Buckrell, B.C. (1997). Breeding strategies. In: Current therapy in large animal theriogenology, 1<sup>st</sup> edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 603-611.
- Kennaway, D.J., Gilmore, T.A. (1985). Effects of melatonin implants in ram lambs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 85-91.
- Khalifa, R.M., Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1992). Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science*, 70: 38-42.
- Kimberling, C.V., Marsh, D.J. (1997). Breeding soundness evaluation and surgical sterilization of the ram. In: Current therapy in large animal theriogenology, 1<sup>st</sup> edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 575-584.
- Kokois, N., Theodosiadou, E., Tsantarlioutou, M., Rekkas, C., Goulas, P., Smokovitis, A. (2000). The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia*, 32: 107-114.
- Kusakari, N., Ohara, M. (1999). Effect of accelerated lambing system with melatonin feeding on reproductive performance for 2 years in Suffolk sheep raised in Hokkaido. *Journal of Reproduction and Development*, 45(4): 283-288.
- Land, R.B. (1972). The expression of female sex-limited characters in the male. *Nature*, 241: 208-209.
- Langford, G.A. (1982). Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progestogen-treated sheep in confinement. *Journal of Animal Science*, 54 (6): 1205-1211.
- Langford, G.A., Ainsworth, L., Wolynetz, M.S. (1982). Reproductive response of progestogen-treated sheep in confinement to a single and double insemination. *Journal of Animal Science*, 54 (1): 12-17.
- Langford, G.A., Marcus, G.J., Batra, T.R. (1983). Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogen-treated sheep. *Journal of Animal Science*, 57 (2): 307-312.
- Langford, G.A., Sanford, L.M., Marcus, G.J., Shrestha, J.N.B. (1999). Seasonal cyclic pituitary and testicular activities in rams. *Small Ruminant Research*, 33: 43-53.
- Langford, G.A., Shrestha, J.N.B., Sanford, L.M., Marcus, G.J. (1998). Reproductive hormone levels of early postpubertal ram lambs in relation to breed, adult testis size and semen quality. *Small Ruminant Research*, 29 (2): 225-232.

- Lapwood, K.R. (1986). Development of the male reproductive tract, spermatogenesis and puberty. In: Current Therapy in Theriogenology. Editor: David A. Morrow. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 867-869.
- Legaz, E., Deletang, F., Martino, A. (2001). Efecto de la utilización de implantes de melatonina sobre resultados de inseminación artificial en ovejas Manchegas × Assaf.  
<http://www.redvya.com/veterinarios/veterinarios/especialidades/ovino/Especialista>
- Lincoln, G.A., Clarke, I.J. (2000). Role of the pituitary gland in the development of photorefractoriness and generation of long-term changes in prolactin secretion in rams. *Biology of Reproduction*, 62: 432-438.
- Lincoln, G.A., Clarke, I.J. (1998). Absence of photoperiodic modulation of gonadotrophin secretion in HPD rams following chronic pulsatile infusion of GnRH. *Journal of Neuroendocrinology*, 10: 461-471.
- Lincoln, G.A., Clarke, I.J. (1997). Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. *Biology of Reproduction*, 57: 460-467.
- Lincoln, G.A., Ebling, F.J.P. (1985). Effect of constant-release implants of melatonin on seasonal cycles in reproduction, prolactin secretion and moulting in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73: 241-253.
- Lincoln, G.A., McNeilly, A.S., Cameron, C.L. (1978). The effects of a sudden decrease or increase in daylength on prolactin secretion in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52: 305-311.
- Lincoln, G.A., Tortonese, D.J. (1999). Prolactin replacement fails to inhibit reactivation of gonadotropin secretion in rams treated with melatonin under long days. *Biology of Reproduction*, 60: 602-610.
- López, A., Söderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. (1999). Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(1): 1-9.
- Lopez, J. G. (1991). Actividad sexual del morueco, producción de semen e inseminación artificial. *Colectânea da S.P.O.C.*, 2 (1): 79-98.
- Lopez-Brea, J.J.G., Aguado, M.I., Perez, S., Garrido, D., Vazquez, I. (1995). Tecnología para la conservación del semen de morueco. *Ovis*, 36: 37-47.

- López-Valdéz, G., Mellado-Bosque, M. (2001). Estimación de la concentración y motilidad de espermatozoides de toros y machos cabrios utilizando um patrón de fotografías de eyaculados y pruebas de nado ascendente. *Agrociencia*, 35 (4): 407-412.
- Lucidi, P., Barboni, B., Mattioli, M. (2001). Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*, 55: 1797-1805.
- Lymberopoulos, A.G., Amiridis, G.S., Kühholzer, B., Besenfelder, U., Christodoulou, V., Vainas, E., Brem, G. (2001). Fertilization and embryo recovery rates in superovulated Chios ewes after laparoscopic intauterine insemination. *Theriogenology*, 55: 1855-1862.
- Malpaux, B., Karsch, F.J. (1990). A role for short days in sustaining seasonal reproductive activity in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90: 555-562.
- Malpaux, B., Viguié, C., Thiéry, J.C., Chemineau, P. (1996). Contrôle photopériodique de la reproduction. *INRA Productions Animales*, 9(1), 9-23.
- Manso, A., Anel, L., Anel, E., Alvarez, M., Boixo, J.C., Sevillano, C., Dominguez, J.C., Paz, P. (1997) Estudio comparativo de dos geometrias de congelación (0,25 y 0,5ml) en semen de moruecos. In: *Comunicações livres do 1º Congresso Ibérico de Reprodução Animal*, Estoril, Portugal, pp. 189-192.
- Marines, J.L., Soto, R., Trejo, A. (1988). Efecto de la dosis de medroxiprogesterona y PMSG sobre la fertilidad y la tasa ovulatoria en ovejas inseminadas com semen congelado durante el anestro estacional. In: *Proceedings du 3eme Congrès Mondiale de Reproduction et selection des ovins et bovines a viande*, volume 1, Paris, France, pp. 197-200.
- Martin, G.B., Tjondronegoro, S., Boukhliq, R., Blackberry, M.A., Briegel, J.R., Blache, D., Fisher, J.A., Adams, N.R. (1999). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reproduction, Fertility and Development*, 11: 355-366.
- Martin, I.C.A. (1986). Semen collection and evaluation. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Editor: David A. Morrow. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 880-883
- Matos, C.A.P. (1993). Conservação dos recursos genéticos em espécies domésticas, Aspectos práticos. *Colectânea S.P.O.C.*, 4 (1): 75-82.
- Matos, C.A.P. (2000). Recursos genéticos animais e sistemas de exploração tradicionais em Portugal. *Separata de Archivos de Zootecnia*, 49 (187): 363-383.

- Matos, C.A.P., Bettencourt, C.M.V. (1996). Proposta para a utilização da raça ovina Campaniça. *Colectânea da S.P.O.C.*, 6 (1): 19-25.
- Matos, C.A.P., Thomas, D.L. (1992). Physiology and genetics of testicular size in sheep: a review. *Livestock Production Science*, 32 (1): 1-30.
- Maxwell, W.M.C. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at synchronized oestrus. 1. effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Animal Reproduction Science*, 10: 301-308.
- Maxwell, W.M.C., Evans, G., Mortimer, S.T., Gillan, L., Gellatly, E.S., McPhie, C.A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, 11: 123-126.
- Maxwell, W.M.C., Hewitt, L.J. (1986). A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 106: 191-193.
- Maxwell, W.M.C., Landers, A.J., Evans, G. (1995). Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, 43: 1201-1210.
- Maxwell, W.M.C., Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: a review. *Reproduction Fertility and Development*, 5: 613-638.
- Maxwell, W.M.C., Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction Fertility and Development*, 8: 1013-1020.
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.C. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42: 55-65.
- McDonald, M.F. (1986). Estrous synchronization and control of the estrous cycle. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Editor: David A. Morrow. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 887-889.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57: 327-344.
- Mieusset, R., Casares, P.Q., Partida, F.G.S., Sowerbutts, S.F., Zupp, J.L., Setchell, B.P. (1992). Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94: 337-343.

- Miller, S.J. (1986). Artificial breeding techniques in sheep. In: Current Therapy in Theriogenology. Editor: David A. Morrow. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 884-887.
- Muñoz, A.J.G., Chacon, G.R., Deletang, F., Martino, A. (2001). Produccion de ovino de carne en sistemas adehesados complementados com aprovechamientos agricolas temporales (Rastrojeras). Uso de implantes de melatonina. In: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1016-1021.
- Muñoz, T.J., Fernandez-Pacheco, E., Cabras. M.J. (1993). Calidad seminal en dosis descongeladas de toro. In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> Internacional Meeting on Animal Reproduction, Murcia, España, pp. 261-271.
- Mylne, M.J.A., Hunton, J.R., Buckrell, B.C. (1997). Artificial insemination of sheep. In: Current therapy in large animal theriogenology, 1<sup>st</sup> edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 575-584.
- Nadal da Luz, S., Neves, J.P., Gonçalves, P.B.D. (2000). Parâmetros utilizados na avaliação do sémen congelado ovino para inseminação laparoscópica. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 37 (2).
- Nagy, Sz., Házas, G., Bali Papp, Á, Iváncsics, J., Szász Jr., F., Kovács, A., Foote, R.H. (1999). Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Theriogenology, 52 (7): 1153-1159.
- Neild, D.M., Chaves. M.G., Flores, M., Miragaya, M.H., Gonzalez, E., Agüero, A. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. Andrologia, 32: 351-355.
- Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, M., Beconi, M., Agüero, A. (1999). Hypoosmotic test in equine spermatozoa. Theriogenology, 51: 721-727.
- Nelson, E.A., Lin, T.Y. (1983). Collecting, evaluation, processing, and storage of goat and sheep semen. In: Reproduction and Genetics, presented by the International Sheep and Goat Institut, UTAH, USA, pp. 229-252.
- Noakes, D.E. (2001a). Endogenous and exogenous control of ovarian cyclicity. In: Artur's Veterinary Reproduction & Obstetrics, 8<sup>th</sup> edition. Editores: D.E. Noakes, T. J. Parkinson, G.C.W. England, London, WB Saunders Company Limited, pp. 3-53.
- Noakes, D.E. (2001b). Pregnancy and its diagnosis. In: Artur's Veterinary Reproduction & Obstetrics, 8<sup>th</sup> edition. Editores: D.E. Noakes, T. J. Parkinson, G.C.W. England, London, WB Saunders Company Limited, pp. 69-118.

- Ollero, M., Muñio-Blanco, T., López-Pérez, J., Cebrián-Pérez, J.A. (1996). Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *International Journal of Andrology*, 19: 287-292.
- Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J., Volland-Nail, P. (1985). Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev Reproduction Biology*, 7: 305-354.
- Pang, S.F. (1998). Melatonin receptors in reproductive tissues: evidence for the multiple sites of melatonin action.  
<http://www.mcmaster.ca/inabis98/brown/shiu0573/two.html>
- Parkinson, T.J. (2001a). Normal reproduction in male animals. In: Artur's Veterinary Reproduction & Obstetrics, 8<sup>th</sup> edition. Editores:D.E. Noakes, T. J. Parkinson, G.C.W. England, London, WB Saunders Company Limited, pp. 673-694.
- Parkinson, T.J. (2001b). Fertility and infertility in male animals. In: Artur's Veterinary Reproduction & Obstetrics, 8<sup>th</sup> edition. Editores:D.E. Noakes, T. J. Parkinson, G.C.W. England, London, WB Saunders Company Limited, pp. 695-750.
- Parkinson, T.J. (2001c). Artificial insemination. In: Artur's Veterinary Reproduction & Obstetrics, 8<sup>th</sup> edition. Editores:D.E. Noakes, T. J. Parkinson, G.C.W. England, London, WB Saunders Company Limited, pp. 751-778.
- Parkinson, T.J., Follett, B.K. (1994). Effect of thyroidectomy upon seasonality in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 51-58.
- Parks, J.E., Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38: 209-222.
- Paulenz, H., Ådnøy, T., Fossen, O.H., Söderquist, L., Andersen Berg, K. (2002). Effect of deposition site and sperm number on the fertility of sheep inseminated with liquid semen. *The Veterinary Record*, 150: 299-302.
- Pearce, G.P., Oldham, C.M. (1988). Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-introduced ovulation in the ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84: 333-339.
- Pelletier, J., Bodin, L., Hanocq, E., Malpaux, B., Teyssier, J., Thimonier, J., Chemineau, P. (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel<sub>1a</sub> receptor in the ewe. *Biology of Reproduction*, 62: 1096-1101.
- Pelletier, J., Castro, B., Roblot, G., Wylde, R., Marie-Madeleine de Reiviers (1990). Characterization of melatonin receptors in the ram pars tuberalis: influence of light. *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 123: 557-562.

- Pelletier, J., Garnier, D.H., de Reviers, M.M., Terqui, M., Ortavant, R. (1982). Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. *Journal of Reproduction and Fertility*, 64: 341-346.
- Pérez, L.J., Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Moses, D., Baldassarre, H. (1996a). In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 45: 1037-1046.
- Pérez, L.J., Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Moses, D., Baldassarre, H. (1996b). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 46: 131-140.
- Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56: 425-434.
- Pérez-Pé, R., Grasa-Molina, P., Muiño-Blanco, P., Cebrián-Pérez, J.A. (2001a). Las proteínas seminales pueden evitar la capacitación prematura inducida por el frío en los espermatozoides ovinos. In: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1078-1084.
- Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. (2001b). Sperm washing method alters the ability of seminal plasma proteins to revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *International Journal of Andrology*, 24: 352-359.
- Perkins, N.R., Hill, J.R., Pedrana, R.G. (1996). Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized merino ewes. *Theriogenology*, 46: 541-545.
- Petrounkina, A.M., Petzoldt, R., Weitze, K.F., Waberski, D., Töpfer-Petersen (2000). Cell subpopulation-related volumetric parameters: a complementary tool of the modified hypo-osmotic swelling test on model of boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*, 35: 201-206.
- Pévet, P. (1996). La mélatonine et les rythmes biologiques. In: Abstracts des communications des Journées Scientifiques de la Physio: Mélatonine et rythmes circadiens et circannuels chez les mammifères. INRA, France.  
<http://www.tours.inra.fr/tours/prmd/melatonine/pevet.htm>
- Piketty, V. (2001). Absence of sexual dimorphism in pars tuberalis [<sup>125</sup>I]-melatonin binding sites of lambs slaughtered in June and in October. *Journal of Pineal Research*, 30: 50-55.
- Poulton, A.L., Robinson, T.J. (1987). The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. *Journal of Reproduction and Fertility*, 79: 609-626.



- Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, 60: 403-407.
- Reeves, J.J.. (1987). Endocrinology of reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*, 5<sup>th</sup> edition. Editor: E.S.E Hafez. Philadelphia, Lea & Febiger, pp 85-106.
- Regisford, E.G.C., Katz, L.S. (1993). Effects of bromocriptine-induced hypoprolactinemia on gonadotrophin secretion and testicular function in rams (*Ovis aries*) during two seasons. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 529-537.
- Rekik, M., Bryant, M.J., Cunningham, F.J. (1991). Effects of treatment with melatonin on the response of seasonally anovular ewes to the introduction of rams. *Animal Production*, 53: 203-207.
- Rescalvo, L., Madridano, J.M., Garcia, O, Pérez, S., Aguado, M.J., Pérez-Guzmán, M.D., Montoro, V., Garde, J. (1993). Influencia de la estacion sobre las características seminales en moruecos adultos de raza Manchega. In: *Publicações do 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal: comunicações livres: bovinos, ovinos, equinos, suínos, outras espécies*, Luso, Portugal, pp. 278-284.
- Riocerezo, C.P., Deletang, F., Martino, A. (2001). Utilización de implantes de melatonina para la cubrición del mês de Marzo en una ganadería de alta producción de leche. In: *XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1066-1070.
- Risopatrón, J., Peña, P., Miska, W., Sánchez, R. (2001). Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. *Andrologia*. 33: 63-67.
- Ritar, A.J., Ball, P.D. (1993). The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Animal Reproduction Science*, 31: 249-262.
- Robinson, J.E., Karsch, F.J. (1987). Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylength. *Journal of Reproduction and Fertility*, 80: 159-165.
- Rodrigues, F.A.S.S.B. (2001). Criopreservação de sêmen ovino da raça Campaniça. Relatório de Estágio, Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior Agrária.
- Rodrigues, V.J.P., Rebello de Andrade, C.S.C., Fragoso de Almeida, J.P. (1989). Contribuição para a caracterização reprodutiva do Merino da Beira Baixa. In: *IV Symposium Internacional de Reprodução Animal*, sessão VI, Lisboa, Portugal, pp.8-10.

- Rosa, H.J.D., Juniper, D.T., Bryant, M.J. (2000). Effects of sexual experience and melatonin treatment of rams on plasma testosterone concentration, sexual behavior and ability to induce ovulation in seasonally anoestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120: 169-176.
- Rota, A., Penzo, N., Vincenti, L., Mantovani, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 53: 1415-1420.
- Russel, A.J.F., Goddard, P.J. (1995). Small ruminant reproductive ultrasonography. In: *Veterinary ultrasonography*. Editor: P.J. Goddard, CAB International, Wallingford, pp. 257-274.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37: 185-249.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (1995b). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38: 1-36.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 77-111.
- Sanford, L.M., Palmer, W.M., Howland, B.E. (1977). Changes in the profiles of serum LH, FSH and testosterone, and in mating performance and ejaculate volume in the ram during the ovine breeding season. *Journal of Animal Science*, 45 (6): 1382-1391.
- Schanbacher, B.D. (1979). Increased lamb production with rams exposed to short day lengths during the nonbreeding season. *Journal of Animal Science*, 49 (4): 927-932.
- Schanbacher, B.D., Lunstra, D.D. (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *Journal of Animal Science*, 43 (3): 644-650.
- Sebastian, A.L. (1989a). El ciclo sexual. *Ovis*, 1: 43-57.
- Sebastian, A.L. (1989b). Estacionalidad de la reproduccion. *Ovis*, 1: 59-73.
- Sebastian, A.L., De Bulnes, A.G., Lopez, M.G., Moreno, J.S. (1995). Induccion y sincronizacion del celo y la ovulacion en la oveja; utilizacion en la inseminacion artificial. *Ovis*, 36: 49-61.

- Shamsuddin, M., Amiri, Y., Bhuiyan, M.M.U. (2000). Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reproduction in Domestic Animal*, 35: 53-57.
- Sharkey, S., Callan, R.J., Mortimer, R., Kimberling, C. (2001). Reproductive techniques in sheep. *Veterinary Clinics of North America: food animal practice*, 17(2): 435-455.
- Silva, J.R. (1991). Controlo do ciclo éstrico em ovinos: justifica-se sincronizar com hormonas em Portugal?. *Colectânea da S.P.O.C.*, 2 (1): 143-144.
- Silva, J.R., Calheiros, F.C. (1980). Ritmo reprodutivo anual em ovelhas da raça Merina. *Direcção Geral dos Serviços Veterinários*.
- Staples, L.D., McPhee, S., Kennaway, D.J., Williams, A.H. (1992). The influence of exogenous melatonin on the seasonal patterns of ovulation and oestrus in sheep. *Animal Reproduction Science*, 30: 185-223.
- Stellflug, J.N., Fitzgerald, J.A., Parker, C.F., Bolt, D. (1988). Influence of concentration, duration and route of administration of melatonin on reproductive performance of Spring-mated Polypay and Polypay-cross ewes. *Journal of Animal Science*, 66: 1855-1863.
- Stellflug, J.N., Weems, Y.S., Weems, C.W. (1997). Clinical reproductive physiology of ewes. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, 1<sup>st</sup> edition. Editor: Robert S. Youngquist, Philadelphia, USA, pp. 594-598.
- Stellflug, J.N., Wulster-Radcliffe, M.C., Hensley, E.L., Cowardin, E.A., Seals, R.C., Lewis, G.S. (2001). Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *Journal of Animal Science*, 79: 568-573.
- Sukardi, S., Curry, M.R., Watson, P.F. (1997). Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Animal Reproduction Science*, 46: 89-96.
- Tejero, J.P., Bastida, B.R., Salvador, M.D.A., Bueno, J.P.M., Angulo, G.G., Deletang, F., Martino, A. (2001). Melatonina en ovino Segureño. In: *XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 1085-1090.
- Thimonier, J. (1996). Photopériode et reproduction. *INRA Productions Animales*, 9(1): 3-8.

- Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Soderquist, L., Mapletoft, R., Rodriguez-Martinez, H. (1999). Relationship between the proportion of capacited spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *International Journal of Andrology*, 22: 366-373.
- Thwaites, C.J. (1995). The comparative effects of undernutrition, exercise and frequency of ejaculation on the size and tone of the testes and on semen quality in the ram. *Animal Reproduction Science*, 37: 299-309.
- Tobin, V.A., Pompolo, S., Clarke, I.J. (2001). The percentage of pituitary gonadotropes with immunoreactive oestradiol receptors increase in the follicular phase of the ovine oestrus cycle. *Journal of Neuroendocrinology*, 13: 846-854.
- Valcárcel, A., de las Heras, M.A., Pérez, L. (1994). Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, 41: 483-489.
- Vazquez, I., Calderon, F., Castillo, M., Sanchez, J., Botey, C., Del Palacio, M. (1989). Influencia de la presión osmótica de los diluyentes en la conservación del esperma refrigerado de morueco. In: 4<sup>as</sup> Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, León, España, pp. 283-287.
- Vázquez, J.F., Ruhi, J.T., Talegón, M.I., Gonzalez, M.Y., de Chávarri, E. (2001). Utilización de FGA e PMSG en la oveja Rubia de el Molar para incrementar su eficacia reproductiva en Primavera. In: XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, pp. 999-1003.
- Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Martinez, P., Garcia-Artiga, C., Roca J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47: 913-922.
- Ward, W.R. (1986). The breeding season and the estrous cycle. In: *Current Therapy in Theriogenology*. Editor: David A. Morrow. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 846-847.
- Watson, P.F. (1990). Cryopreservation of ram semen. In: *Actas, ponencias y comunicaciones no incluidas en los Tomos I y II de las 5as Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial*, Facultad de Veterinaria, Zaragoza, España, pp. 95-112.
- Watson, P.F., Jones, P.S., Plummer, J.M. (1991). A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Animal Reproduction Science*, 24: 93-108.

- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871-891.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 481-492.
- Wayne, N.L., Malpaux, B., Karsch, F.J. (1988). How does melatonin code for day length in the ewe: duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period? *Biology of Reproduction*, 39: 66-75
- Webster, J.R., Suttie, J.M., Veenviliet, B.A., Manley, T.R., Littlejohn, R.P. (1991). Effect of melatonin implants on secretion of luteinizing hormone in intact and castrated rams. *Journal of Reproduction and Fertility*, 92: 21-31.
- Wheaton, J.E., Pohl, H.A., Windels, H.F. (1990). Effects of melatonin and progesterone administred to ewes in Spring and Summer. *Journal of Animal Science*, 68: 923-930.
- Wierzbowski, S., Kareta, W. (1993). An assessment of sperm motility estimation for evaluation in rams. *Theriogenology*, 40: 205-209.
- Williams, A.H., McPhee, S.R., Reeve, J.L., Staples, L.D. (1992). Optimum use of subcutaneous melatonin implants to enhance the reproductive performance of seasonal and non-seasonal sheep joined in spring and early summer. *Animal Reproduction Science*, 30: 225-258.
- Windsor, D.P. (1995). Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. *Theriogenology*, 43: 1009-1018.
- Windsor, D.P. (1997). Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino rams. *Animal Reproduction Science*, 47: 21-29.
- Windsor, D.P., Széll, A.Z., Buschlbeck, C., Edward, A.Y., Milton, J.T.B., Buckrell, B.C. (1994). Transcervical artificial insemination of Australian merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 42: 147-157.
- Windsor, D.P., White, I.G. (1995). Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Animal Reproduction Science*, 40: 43-58.
- Wulster-Radcliffe, M.C., Williams, M.A., Stellflug, J.N., Lewis, G.S. (2001). Technical note: artificial vagina vs a vaginal collection vial for collecting semen from rams. *Journal of Animal Science*, 79: 2964-2967.

- Yeates, N.T.M. (1949). The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 39: 1-43.
- Yellon, S.M., Foster, D.L., Longo, L.D., Suttie, J.M. (1992). Ontogeny of the pineal melatonin rhythm and implications for reproductive development in domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, 30: 91-112.
- Zarazaga, L.A., Chemineau, P., Malpoux, B., Forcada, F. (2000). La melatonina: síntesis, ritmo de secreción y catabolismo. *Ovis*, 71: 35-58.
- Zavos, P.M., Cohen, M. (1980). Bovine mucus penetration test: an assay for fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 34(2): 175-176.
- Zeginiadou, T., Papadimas, J., Mantalenakis, S. (2000). Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. *Andrologia*, 32: 335-243.