

**UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**Caracterização de Parâmetros Reprodutivos nas Raças  
Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça**

**Dissertação de Mestrado em Produção Animal**

**Elisa Maria Varela Bettencourt**

**JURÍ:**

**Doutor José Robalo Silva**

**Doutor Luís M. dos Anjos Ferreira**

**Doutor António L. M. M. Rodrigues Rocha**

**Doutora Graça M. Leitão Ferreira Dias**

**Doutor Claudino A. Pereira de Matos**

**ORIENTADOR**

**Doutor Claudino A. P. de Matos**

**1999  
Lisboa**

## **Resumo**

Os objectivos gerais deste trabalho foram avaliar a eficácia reprodutiva da aplicação de diferentes sistemas de maneio na época de Primavera. Avaliou-se também a variação sazonal em alguns parâmetros reprodutivos em carneiros nas épocas de Primavera e Outono. Num primeiro estudo, avaliou-se a eficácia da aplicação de inseminação artificial (**IA**) em ovelhas Merino Branco (**MB**), Merino Preto (**MP**) e Campaniço (**C**) considerando os factores: idade e condição corporal da ovelha, tipo de **IA** (vaginal ou cervical), diluidor de sémen (Laiciphos ou Triladil), tipo de sémen (fresco ou refrigerado) e a concentração por dose de sémen aplicada. Em todas as raças, a fertilidade foi afectada significativamente por a concentração por dose de sémen aplicada ( $P<0.05$ ), obtendo-se valores de fertilidade de 32.6% e 54.9% na raça **MB**; 35.0% e 54.4% na **MP** e 18.5% e 33.5% na **C**. Na raça **C** a fertilidade foi também significativamente influenciada pelo tipo de sémen utilizado. Num segundo estudo procurou avaliar-se a eficácia de quatro sistemas de maneio reprodutivo em ovelhas **MB** e **MP**: pré-tratamento com progestagénios (**AP**), pré-exposição a carneiros vasectomizados (**EM**), **IA** duas semanas antes da cobrição natural (**IN**) e um grupo controlo de cobrição natural, sem qualquer tratamento prévio (**CN**). A fertilidade global foi de 86% e não foi afectada significativamente por o sistema de maneio aplicado ( $P<0.05$ ). A fertilidade foi influenciada significativamente por a raça (82.8% vs 89% para a raça **MB** e **MP**, respectivamente,  $P<0.05$ ). A Produtividade (Kg de borrego desmamado por ovelha parida) foi influenciada significativamente pelo sistema de maneio, raça e tipo de parto ( $P<0.05$ ). Ovelhas submetidas ao tratamento prévio com progestagénios apresentaram Produtividade superior (36.5 Kg)

comparativamente a ovelhas dos grupos **IN** (35.46 Kg), **EM** (33.3 Kg) e **CN** (32.6 Kg). A Produtividade na raça **MB** (36.08 Kg) foi significativamente superior à da raça **MP** (32.83 Kg). Num terceiro estudo observaram-se variações significativas no perímetro testicular (32.96 cm e 35.19 cm no Outono e Primavera, respectivamente,  $P<0.05$ ), obtendo-se uma correlação positiva com o peso vivo do carneiro. A concentração de sémen, mobilidade massal e mobilidade individual foram significativamente superiores na época de Outono. Os resultados globais indicam que o sucesso da **IA** é condicionado pela concentração por dose de sémen e pelo tipo de sémen aplicado. Adicionalmente, o recurso à aplicação de tratamentos hormonais ou a técnicas de maneio como o “efeito macho” induzem a sincronização de cios e permitem a obtenção de taxas de fertilidade elevadas na época de Primavera. Finalmente, apesar dos carneiros das três raças apresentarem alguma sazonalidade reprodutiva, mantêm a capacidade de produzirem sémen ao longo do ano.

**Palavras Chave:** Ovinos, Inseminação Artificial, Sazonalidade, Fertilidade, Portugal

## Abstract

The main objectives of these studies were to evaluate the efficiency of different reproductive management systems during a Spring breeding period. Additionally, data on reproductive traits were collected in rams during Spring and Fall. In a first study, artificial insemination (AI) was tested in Merino Branco (**MB**), Merino Preto (**MP**) and Campaniça (**C**) ewes considering the effects of age and body condition score of the ewe, place of semen deposition (vaginal or cervical), diluter (Laiciphos or Triladil), semen conservation (fresh or cooled) and semen concentration per dose applied. In all breeds, fertility was significantly affected by the classes of dose of semen considered ( $P<0.05$ ) with 32.6% and 54.9% for **MB**, 35% and 54.4% for **MP** and 18.5% and 33.5% for **C** ewes. Semen conservation affected fertility of **C** ewes ( $P<0.05$ ). In a second study, the effectiveness of four distinct management systems was assessed being **MB** and **MP** ewes randomly assigned to the following treatment groups: synchronization with progestagens (Group **AP**), pré-exposition to vasectomized rams (Group **EM**), ewes AI and natural breeding for returned ewes (Group **IN**) and control in natural breeding (Group **CN**). The overall fertility was 86% and was not affected by the management system adopted ( $P>0.05$ ). Breed differences were observed for this trait (82.8% vs 89% for **MB** and **MP** ewes, respectively;  $P<0.05$ ). Productivity defined as Kg of lamb weaned by ewe lambing (**P1**) was significantly affected by management system, breed and type of birth ( $P<0.05$ ). Ewes with estrus synchronization showed higher productivity (36.5 Kg) than ewes of **IN** (35.46 Kg), **EM** (33.32 Kg) or **CN** (32.6 Kg) groups. Productivity of **MB** ewes (36.08 Kg) was higher than **MP** ewes (32.83 Kg). Finally, in a third study,

data on testis diameter and semen characteristics were collected in **MB**, **MP** and **C** rams during Fall and Spring. A seasonal effect was observed in the testis diameter (32.96 vs 35.19 cm during Fall and Spring, respectively;  $P<.05$ ) and a clear correlation was observed for this trait and the bodyweight of the ram. Semen concentration and motility was higher during Fall ( $P<.05$ ). The overall results indicate that the success of AI was mainly dependent of the dose of semen applied, hormonal treatments or the “male effect” resulted in estrus synchronization and high fertility rates during Spring. Finally, **MB**, **MP** and **C** rams showed some seasonality of reproduction, although they were able to produce good quality semen throughout the year.

**Key words:** Sheep, Seasonality, Artificial Insemination, Fertility, Portugal

## Dedicatória

Aos meus pais por tudo o que representam.

## **Agradecimentos:**

Ao Doutor Claudino Matos, como Orientador Científico deste trabalho, por toda a amizade e paciência, bem como pelo seu importante contributo científico sem o qual não teria sido possível a execução deste trabalho.

Ao Doutor Carlos Bettencourt por toda a colaboração e auxílio, não só no referente ao delineamento experimental deste trabalho, mas também na concretização da sua componente prática.

Ao Doutor Canas Simões por todo o seu auxílio, nomeadamente na realização da componente prática desta tese.

Ao Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóboda, por todas as facilidades materiais e humanas que me proporcionaram.

Ao Dr. João Fialho, responsável pelo Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, por ter autorizado a realização deste trabalho.

Ao Dr. Carlos Vaz por toda a sua boa vontade e disponibilidade, sem a qual não me teria sido possível realizar este mestrado.

À minha irmã Teresa por todo o seu auxílio, amizade e disponibilidade.

A todas as pessoas que trabalham na Herdade da Abóboda e que contribuíram para a execução deste trabalho, nomeadamente os pastores e a Sr<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. Manuela Pardelha.

À minha família, por todo o apoio que sempre me deram.

## **Índice Geral**

|  |          |
|--|----------|
| <b>I INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b> |
| <b>II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                               | <b>4</b> |
| 1. Fisiologia Reprodutiva na Espécie Ovina: Fêmea .....            | 4        |
| 1.1. Ciclo Éstrico.....  | 4        |
| 1.1.2. Endocrinologia do Ciclo Éstrico .....                       | 4        |
| 2. Sazonalidade e Estação Reprodutiva: Femêa.                      | 9        |
| 2.1. Endocrinologia do Anestro Sazonal .....                       | 10       |
| 2.2. Duração da Estação Reprodutiva e Taxa de Ovulação.....        | 13       |
| 2.2.1. Factores Ambientais .....                                   | 14       |
| 2.2.2. Factores Inerentes ao Animal.....                           | 16       |
| 2.2.3. Factores Sociais.....                                       | 18       |
| 2.2.4. Tratamentos Hormonais.....                                  | 21       |
| 3. Fisiologia Reprodutiva na Espécie Ovina : Macho .....           | 25       |
| 3.1. Endocrinologia .....  | 25       |
| 3.2. Espermatogénese .....   | 26       |
| 3.3. Avaliação do Macho Reprodutor .....                           | 27       |
| 3.3.1. Líbido.....   | 27       |
| 3.3.2. Avaliação Testicular .....                                  | 28       |
| 3.3.3. Avaliação Laboratorial do Sémen .....                       | 30       |
| 3.3.3.1. Avaliação de Características Macroscópicas do Sémen ..... | 30       |
| 3.3.3.2. Avaliação de Características Microscópicas do Sémen.....  | 31       |
| 4. Sazonalidade e Estação Reprodutiva no Macho .....               | 33       |
| 4.1. Endocrinologia da Sazonalidade Reprodutiva no Macho.....      | 34       |
| 4.2. Alterações de Comportamento Sexual -Líbido.....               | 36       |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3. Alterações Testiculares.....  | 37        |
| 4.4. Alterações em Características Quantitativas e Qualitativas do Sémen .....   | 38        |
| 5. Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes.....  | 41        |
| 5.1. Vantagens e Inconvenientes da Inseminação Artificial.....   | 42        |
| 5.2. Preparação dos Animais a Utilizar num Programa de IA.....   | 45        |
| 5.3. Processamento do Sémen.....   | 46        |
| 5.3.1. Diluição do Sémen .....   | 46        |
| 5.3.2. Conservação de Sémen .....  | 50        |
| 5.4. Técnicas de Inseminação .....   | 53        |
| 5.4.1. Inseminação Vaginal .....   | 53        |
| 5.4.2. Inseminação Cervical.....   | 53        |
| 5.4.3. Inseminação Transcervical.....  | 55        |
| 5.4.4. Inseminação Intra-Uterina por Laparoscopia.....   | 55        |
| 5.5. Momento Óptimo para a Inseminação .....   | 56        |
| <b>III PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>   | <b>58</b> |
| Estudo 1 Utilização da Inseminação Artificial em Ovelhas Merino Branco, Merino Preto e Campanço.....   | 58        |
| Resumo.....  | 58        |
| Introdução.....  | 59        |
| Materiais e Métodos.....   | 60        |
| Resultados.....  | 62        |
| Discussão.....   | 65        |
| Conclusões.....  | 67        |
| Referências Bibliográficas.....  | 67        |
| Estudo 2. Avaliação da Eficácia de Sistemas de Manejo Reprodutivo em Ovelhas Merino Branco e Merino Preto no Período de Cobrição de Primavera..... | 69        |

|   |            |
|---|------------|
| Resumo.....   | 69         |
| Introdução.....   | 71         |
| Material e Métodos .....  | 72         |
| Resultados.....   | 76         |
| Discussão.....  | 84         |
| Conclusões.....   | 88         |
| Referências Bibliográficas.....   | 89         |
| Estudo 3. Avaliação da Variação Sazonal de Algumas Características Reprodutivas em Carneiros das Raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça..... | 91         |
| Resumo.....   | 91         |
| Introdução.....   | 93         |
| Materiais e Métodos.....  | 94         |
| Resultados.....   | 96         |
| Discussão.....  | 99         |
| Conclusão.....  | 102        |
| Referências Bibliográficas.....   | 103        |
| <b>IV BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>106</b> |

## **Indicie de Tabelas:**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Volume de sémen a utilizar (ml) e n º mínimo recomendado de espermatozóides móveis (milhões) por dose de inseminação em função do local de deposição do sémen e do tipo de sémen utilizado (método de conservação). Adaptado de Evans e Maxell (1987)..... | 47 |
| Tabela 1.1. Efeitos inicialmente considerados para avaliar a fertilidade à IA nas raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça.....   | 62 |
| Tabela 1.2. Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficientes de variação (C.V.) para a fertilidade à IA nas raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça.....  | 63 |
| Tabela 1.3. Médias Marginais $\pm$ Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e nº de observações (n) para a fertilidade à IA (%) e para cada raça de acordo com os factores incluídos nos respectivos modelos de análise.....   | 64 |
| Tabela 1.4. Prolificidade Média (Erro padrão) após Inseminação Artificial, Cobrição pelo Carneiro e Prolificidade Média Global para as Raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. ....   | 64 |
| Tabela 2.1. Distribuição das observações em função do Grupo de Maneio, Raça e Idade. ....  | 75 |
| Tabela 2.2. Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficientes de variação (C.V.) para a Fertilidade e Prolificidade .....  | 77 |
| Tabela 2.3. Médias Marginais $\pm$ Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n º de observações (n) para a Fertilidade (%) e Prolificidade em função do Grupo de Maneio, da Raça e Idade da Ovelha. ....  | 78 |
| Tabela 2.4. Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficientes de variação (C.V.) para a <b>Produtividade 1</b> (Kg borregopor ovelha exposta à cobrição) <b>Produtividade 2</b> (Kg borrego por ovelha parida). ....             | 81 |
| Tabela 2.5. Médias Marginais $\pm$ Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n º de observações (n) para a <b>Produtividade 1</b> e <b>Produtividade 2</b> de acordo com os factores incluidos nos respectivos modelos de análise.....                                      | 82 |
| Tabela 2.6. Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficientes de variação (C.V.) para a idade dos borregos ao desmame.....   | 83 |
| Tabela 2.7. Médias Marginais $\pm$ Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e nº de observações (n) para a idade dos borregos ao desmame em função do grupo de maneio reprodutivo.   | 83 |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 3.1. Médias ( $\bar{X}$ ) e coeficientes de variação (C.V.) para o perímetro testicular (PT; cm), volume de ejaculado (Vol; ml), concentração de sémen, (Conc; $* 10^9$ / ml), mobilidade massal (MM; 1-5), mobilidade individual, (MI; %) e concentração plasmática de testosterona, (Test; ng/ml)) em função da raça e época considerada..... | 96 |
| Tabela 3.2. Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e coeficientes de variação (C.V.) para o perímetro testicular, concentração, mobilidade massal e mobilidade individual.....   | 98 |
| Tabela 3.3. Médias Marginais $\pm$ Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e nº de observações (n) para o Perímetro Testicular (cm), Concentração ( $* 10^9$ / ml) de Sémen, Mobilidade Massal (1-5) e Mobilidade Individual (%), em função da época: Primavera e Outono e da Raça Merina Branca (MB), Merina Preta (MP) e Campanha (C).....                  | 98 |

## **Indicie de Figuras:**

Figura 1 Distribuição dos registo semanais de 1<sup>a</sup> cobrição de acordo com o sistema de maneio utilizado (**CN**: cobrição natural; **EM**: pré-exposição a carneiros vasectomizados; **AP**: pré-tratamento com progestagénios). ..... 79

Figura 2 Distribuição semanal de partos de acordo com o sistema de maneio utilizado (**CN**: cobrição natural; **EM**: pré-exposição a carneiros vasectomizados; **AP**: pré-tratamento com progestagénios; **IN**: inseminação artificial seguida de cobrição natural). ..... 80

## I Introdução

A ovinicultura é uma das actividades pecuárias com maior tradição e representatividade no Sul do nosso país. O sistema de exploração tradicional em regime extensivo foi, nos últimos anos, gradualmente substituído por um regime mais equilibrado, com recurso à suplementação alimentar em épocas de carência e à utilização de pastagens melhoradas. A utilização de raças locais que, dadas as suas potencialidades produtivas e reprodutivas, exigem menos do ambiente comparativamente a raças exóticas, constitui em alguns casos, um meio importante de subsistência para as populações rurais que as exploram.

De acordo com o último *census*, a raça Merina Branca, com cerca de um milhão de animais (DGP, 1992), é a raça ovina com maior expressão em todo o país, encontrando-se dispersa não só na região Alentejana, mas também por todo o Ribatejo. A raça Merina Preta, com um efectivo actual de cerca de 20 000 cabeças (DGP, 1992), encontra-se por toda a região do Alentejo, com predominância nos concelhos fronteiriços situados entre Moura e Estremoz (Matos *et al.*, 1996). A raça Campaniça, com um total de 2 500 animais inscritos no Registo Zootécnico, encontra-se dispersa pelos concelhos de Mértola com cerca de 2 000 animais, Serpa, 400 animais e no Algarve, cerca de 100 animais (Conduto, 1996).

Existe actualmente em curso um programa de melhoramento genético para a raça Merina Branca e um programa de conservação genética para a raça Campaniça, considerada raça em vias de extinção (efectivo inferior a 5 000 fêmeas adultas, FAO, 1992). A execução destes programas implica o conhecimento exaustivo de

parâmetros reprodutivos e a aplicação de técnicas que até agora se justificavam apenas a título experimental.

Apesar de os ovinos serem considerados como “reprodutores de dias curtos” (Yeates, 1949), em Portugal, devido a condicionalismos de mercado, a maioria dos produtores utiliza preferencialmente como época de cobrição a Primavera. Embora uma percentagem significativa de ovelhas se encontre acíclica nesta época (Bettencourt, 1988), a sazonalidade não é tão marcada como noutras países de maior latitude. A aplicação de técnicas, como o “efeito macho” (Bettencourt, 1988; Matos *et al.*, 1997) ou a utilização de tratamentos hormonais, permite a obtenção de taxas de fertilidade elevadas durante esta época. Do ponto de vista produtivo a utilização desta época de cobrição assume particular importância nesta região tendo em vista, além da obtenção de borregos no período do Natal, a produção leiteira para a elaboração do tradicional Queijo Serpa, cujo fabrico artesanal se restringe principalmente aos meses de Outono e Inverno. A época de cobrição de Outono é geralmente utilizada para o efectivo de substituição e para os animais que não ficaram gestantes na Primavera.

A inseminação artificial (IA) perfila-se como uma técnica reprodutiva indispensável, quer em programas de melhoramento genético (Foulley *et al.*, 1990), quer em programas de conservação *in situ* ou *ex situ* (Schulte-Cerne, 1992). Em Portugal, a IA em ovinos tem sido até agora efectuada apenas a título experimental e em situações pontuais, em contraste com outros países como por exemplo a França onde em 1995/96 foram inseminadas 773 000 ovelhas (Perret *et al.*, 1997). Desenvolvimentos futuros nas técnicas de congelação de sémen e de ovulação

múltipla, transferência e congelação de embriões, são igualmente factores importantes para a execução destes programas.

É de extrema importância a avaliação das características reprodutivas do macho, tendo em vista a sua utilização, quer em cobrição natural, quer em programas de IA. A utilização de animais com problemas reprodutivos ou com sazonalidade marcada em épocas de cobrição de Primavera, pode comprometer a fertilidade de todo o efectivo.

Os objectivos deste trabalho foram:

- Caracterizar a resposta à aplicação de diferentes sistemas de maneio reprodutivo em ovelhas das raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça, e identificar os factores que influenciam esta resposta.
- Estudar a variação sazonal de alguns parâmetros reprodutivos em machos das três raças ovinas.

## **II Revisão Bibliográfica**

### **1. Fisiologia Reprodutiva na Espécie Ovina: Fêmea**

#### **1.1. Ciclo Éstrico**

O ciclo éstrico é o intervalo decorrente entre o início de um estro ou cio e o início do cio seguinte (Bearden e Fuquay, 1984). Na espécie ovina tem duração média de 16 a 17 dias (Hafez 1987) e divide-se em fase folicular (2 a 3 dias) e fase luteínica (13 a 14 dias, Karsch, 1984a). O cio ocorre no final da fase folicular e a sua duração varia de 12 a 50 horas, ocorrendo a ovulação no final do estro (24 a 30 horas após o seu início, Hafez, 1987). A duração do estro varia com a raça, idade, localização geográfica e contacto com os machos. O único indicador seguro de estro é o reflexo de imobilidade, ou seja, a fêmea permanece quieta quando é montada pelo macho. Assim, na detecção de cios podem usar-se machos, aeventalados ou vasectomizados, equipados com arreios marcadores.

#### **1.1.2. Endocrinologia do Ciclo Éstrico**

O controlo do ciclo éstrico envolve uma sequência de alterações hormonais reguladas pelo eixo hipotálamo-hipofisário que interactua com os ovários e útero (Bearden e Fuquay, 1984). De acordo com os modelos elaborados por Karsch *et al.* (1984) e O'Callaghan *et al.* (1987), as secreções hipotalâmicas são controladas por estímulos externos, principalmente o fotoperíodo, e estímulos internos, os esteróides

gonadais. A progesterona e os estrogénios são as duas hormonas esteróides, produzidas a nível ovárico, que assumem um papel importante na regulação do ciclo estríco (Haresign *et al.*, 1983). O sistema nervoso central (SNC) desempenha um papel fundamental no controlo da ovulação e da libertação de GnRH a partir das terminações nervosas da eminência mediana do hipotálamo.

O controlo exercido pelo hipotálamo na secreção de gonadotrofinas, LH (Luteinizing Hormone) e FSH (Follicle Stimulating Hormone), pela adenohipófise, é mediado por factores de libertação: GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone). Estes são produzidos e secretados pelos neurónios hipotalâmicos passando para a adenohipófise por via sanguínea (Daniel e Prichard, 1957). A existência de factores de libertação diferentes para a LH e FSH é controversa, já que a administração de GnRH induz a libertação quer de FSH quer de LH (Pelletier, 1976; Clarke, 1984). Os opiáceos endógenos parecem estar envolvidos no controlo da secreção de GnRH. Estudos realizados por Brooks *et al.* (1983) e Ebling *et al.* (1984) sugerem a participação opióide no controle da secreção de GnRH e gonadotrofinas em ovelhas. Assim, a administração de naloxone, um inibidor dos opióides endógenos, induz a libertação de GnRH e LH na fase luteínica de fêmeas cíclicas e, no período de anestro pós parto, de fêmeas a amamentar (Malven, 1986).

As gonadotrofinas, LH e FSH, são sintetizadas e armazenadas nas células basófilas da adenohipófise (Hutchinson, 1979), sendo posteriormente libertadas, por exocitose, em resposta à estimulação pela GnRH (Fawcett *et al.*, 1969). A resposta da adenohipófise à GnRH varia com o estado reprodutivo da ovelha, sendo maior aquando da proximidade do pico pré-ovulatório de LH (Reeves *et al.*, 1974), ou após

tratamento prévio com estradiol (Haresign e Lamming, 1978). A resposta da adenohipófise à GnRH é inferior após exposição prolongada a progesterona (Jenking *et al.*, 1977).

A secreção de LH apresenta um padrão pulsátil, cuja frequência varia de acordo com a fase do ciclo éstrico considerada. Durante a fase luteínica os níveis elevados de progesterona, actuando ao nível do hipotálamo, induzem uma baixa frequência de GnRH e consequentemente de LH (Karsch *et al.*, 1984). Por outro lado, os níveis basais de estrogénios actuam na adenohipófise diminuindo a sua capacidade de resposta à GnRH e, consequentemente, a síntese de gonadotrofinas (Karsch *et al.*, 1984). Este efeito de “feedback” negativo dos estrogénios é potencializado pela progesterona (Haresign, 1983). Verifica-se assim uma diminuição na frequência de pulsos de LH concomitante com um aumento da sua amplitude (Goodman e Karsch 1980). Durante a fase lútea, a frequência de pulsos de LH é de um pulso cada 3 a 4 horas (Karsch *et al.*, 1984). Níveis basais da ordem dos 0,1-2,0 ng/ml alternam com elevações da ordem dos 5 a 15 ng/ml, de cerca de 30 a 45 minutos de duração (Haresign *et al.*, 1983). A manutenção da baixa frequência da secreção de LH impede os estágios finais de evolução folicular e subsequente ovulação.

Após a luteólise e consequente diminuição dos níveis de progesterona, o estradiol vai actuar a nível hipotalâmico resultando num aumento da frequência dos pulsos de GnRH e LH, embora a sua amplitude se mantenha baixa. A frequência de libertação de LH atinge nesta fase, imediatamente antes do pico pré-ovulatório de LH, cerca de um pulso cada 1 a 2 horas (Baird, 1978). Assim, de um modo gradual,

aumentam as concentrações sanguíneas de LH, necessárias para as últimas fases de desenvolvimento folicular, culminando com o pico pré-ovulatório de estrogénios e LH e subsequente ovulação (Karsch *et al.*, 1984; Haresign, 1985). O aumento das concentrações de estradiol, associado a níveis basais de progesterona, exerce um efeito de “feedback”, positivo ao nível do eixo hipotálamo-hipofisário, induzindo o pico pré-ovulatório de LH e FSH e subsequente ovulação 18 a 24 depois (Downey, 1980).

Durante a fase folicular a secreção de FSH é afectada negativamente, em parte, devido ao “feedback” negativo exercido pelos estrogénios, resultando numa diminuição gradual dos níveis de FSH (Salamonsen *et al.*, 1973; McNeilly *et al.*, 1984; Goodman, 1988). A inibina, uma glicoproteína secretada a nível folicular, exerce também “feedback” negativo na secreção de FSH (Clark, 1984). No momento do pico pré-ovulatório de LH, observa-se simultaneamente um pico de FSH, registando-se uma segunda elevação desta hormona 18 a 24 horas mais tarde (Salamonsen *et al.*, 1973).

Os níveis circulantes de esteróides gonadais reflectem as alterações que se verificam a nível ovárico ao longo do ciclo éstrico. No dia que antecede o estro, as concentrações de estradiol 17 $\beta$  aumentam para cerca de 10 pg/ml, atingindo um pico no início do estro (Haresing, 1985; Stellflug *et al.*, 1997; Downey, 1980). A concentração sanguínea de progesterona aumenta de níveis basais, da ordem dos 0,5 ng/ml, para valores de 1,0 ng/ml entre os dias 3 e 4 do ciclo éstrico, continuando a aumentar até valores de 4 a 5 ng/ml cerca do dia 9, altura em que atinge um “plateau” que se mantém até aos dias 13 a 14 (Haresing, 1985; Stellflug *et al.*, 1997).

Enquanto que o processo de formação do corpo lúteo (CL) é semelhante nas várias espécies, existem diferenças consideráveis no que diz respeito aos mecanismos que promovem a sua manutenção e regressão. Na espécie ovina, em que a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) é a hormona luteolítica, o CL está sujeito simultaneamente a acções luteolíticas e luteotróficas (McCracken *et al.*, 1971). Assim, por um lado, a LH e prolactina suportam a manutenção da estrutura e funcionalidade do CL, enquanto que a  $PGF_{2\alpha}$ , de origem uterina, induz a luteólise (Denamur *et al.*, 1966).

A  $PGF_{2\alpha}$  é produzida pelo útero, próximo dos dias 12-14 do ciclo éstrico, sendo libertada de modo pulsátil, por um mecanismo de contra-corrente, da veia útero-ovárica para a artéria ovárica e desta para o ovário (McCracken *et al.*, 1971). O mecanismo exacto que regula a síntese de  $PGF_{2\alpha}$  não se encontra totalmente esclarecido, envolvendo a progesterona e o estradiol de origem ovárica, bem como a oxitocina, com origem na pituitária posterior e no CL (Silvia *et al.*, 1991). A administração de progesterona, durante a fase inicial do desenvolvimento lúteo, diminui a duração do CL em ovelhas, possivelmente devido à produção precoce de  $PGF_{2\alpha}$  (Ottobre *et al.*, 1980). Por seu lado, o estradiol, ao actuar no endométrio, aumenta a síntese de receptores de oxitocina e activa as enzimas associadas com a síntese de  $PGF_{2\alpha}$  (Huslig *et al.*, 1979; Dey *et al.*, 1982; Hixon e Flint, 1987). A oxitocina de origem hipofisária estimula a produção de  $PGF_{2\alpha}$  pelo útero, a qual por sua vez, induz a produção adicional de oxitocina pelo CL (Flint *et al.*, 1990). A ligação da oxitocina aos receptores do endométrio estimula a produção de  $PGF_{2\alpha}$ .

estabelecendo-se um “*feedback*” positivo entre a síntese de oxitocina e a síntese de PGF<sub>2α</sub> de modo a assegurar a luteólise.

## **2. Sazonalidade e Estação Reprodutiva: Femêa.**

Os ovinos são uma espécie poliéstrica sazonal, sendo o fotoperíodo o principal factor que influencia esta sazonalidade (Hafez, 1987). Assim, todas as raças ovinas originárias de latitudes médias ou altas (> 30 ° segundo Lincoln, 1992 ou > 40° de acordo com Chemineau *et al.*, 1992), onde a amplitude das variações anuais no número de horas de luz diária é grande, apresentam variações sazonais na sua actividade reprodutiva em ambos os sexos (Ortavant *et al.*, 1985).

Na ovelha existe assim uma estação reprodutiva em que se observam ciclos éstricos regulares, e uma estação de anestro sazonal, caracterizada por inactividade sexual. O estado nutricional, a temperatura, diferenças entre raças e ferôrmonas desempenham também um papel importante no controlo da actividade reprodutiva e na profundidade do anestro sazonal (Sadlier, 1969).

A percentagem de ovelhas que ovulam durante a estação de anestro é superior à percentagem de ovelhas que apresentam estro durante esta estação (Hulet *et al.*, 1974; Bettencourt, 1988). Num estudo realizado na Austrália com animais de raça Dorset Horn, verificou-se que no início da estação reprodutiva a proporção de ovelhas que ovularam foi superior à proporção de ovelhas que manifestaram cio, enquanto que, no final da estação reprodutiva se registou a situação inversa (Hall *et al.*, 1986). Ovulações não acompanhadas de cio ocorrem geralmente no início da estação

reprodutiva como consequência da ausência da elevação prévia dos níveis séricos de progesterona, a qual é indispensável para a manifestação do comportamento de estro (Hunter *et al.*, 1971).

## **2.1. Endocrinologia do Anestro Sazonal**

Os mecanismos fisiológicos envolvidos na tradução dos efeitos do fotoperíodo, englobam um sistema que converte a informação referente à duração do período de luz num sinal hormonal, o qual, actua a nível cerebral coordenando alterações fisiológicas e comportamentais (Lincoln, 1992). Este sistema engloba fotoreceptores da retina, o núcleo supraquiasmático e a glândula pineal (Lincoln, 1992). O núcleo supraquiasmático (SNC) funciona como um relógio biológico interno, o qual regula os ritmos circadianos endógenos. Por outro lado, a glândula pineal funciona como “tradutor”, convertendo a informação neurológica, tendo em conta a duração do fotoperíodo, em informação hormonal, através da variação do tempo de secreção da melatonina (Lincoln, 1992).

A melatonina é libertada para a circulação periférica apenas durante a noite, funcionando com indicador da duração do fotoperíodo (Arendt, 1986). Assim, durante o período de luz as concentrações sanguíneas de melatonina não são detectáveis, aumentando rapidamente com a fase escura e mantendo-se elevadas até ao final da noite (Arendt, 1986). A alteração do fotoperíodo modifica a amplitude e duração do sinal de melatonina e altera a fase circadiana coincidente (Bartness e Goldman, 1988). Existem duas hipóteses tendo em conta os parâmetros críticos do

sinal de melatonina. Watson *et al.* (1983) indicam a existência de um ritmo circadiano inato de sensibilidade, o qual é regulado por o ciclo de luz / obscuridade respondendo às alterações do fotoperíodo quando o sinal de melatonina coincide com o período sensível. Alternativamente, autores Carter e Goldman (1983) e Wayne *et al.* (1988), apoiam a hipótese de que a resposta de um animal ao fotoperíodo está dependente da duração da exposição a um sinal contínuo de melatonina, independentemente de este ocorrer durante o dia ou noite. Assim, ovelhas pinealectomizadas respondem a infusões de melatonina independentemente do momento da sua administração, ao longo de um período de 24 horas.

Verifica-se no entanto, que ovelhas sujeitas a estímulos de luz constante, ficam refractárias à luz, ou seja, perdem a capacidade de responder ao estímulo de luz, entrando em anestro (Robinson e Karsch, 1984). Do mesmo modo, ovelhas submetidas a “dias longos” permanentemente, após determinado período, entram em actividade reprodutiva (Robinson *et al.*, 1989). A falta de resposta ao fotoperíodo não se deve exclusivamente, nem a alterações na secreção de melatonina, nem a alteração de sensibilidade à melatonina, uma vez que, animais pinealectomizados mantêm alterações sazonais na sua actividade reprodutiva (Malpaux *et al.*, 1988). Existe assim um ritmo reprodutivo circanual endógeno, o qual é geralmente regulado por alterações do fotoperíodo, e consequentemente da secreção de melatonina, mas que é capaz de se manter por si próprio (O’Callaghan *et al.*, 1987; Robinson e Karsch, 1988).

O mecanismo de acção da melatonina, de modo a mediar os diversos efeitos do fotoperíodo, permanece por clarificar em múltiplos aspectos. Assim, a melatonina

poderá actuar directamente na pituitária anterior ou em outros locais do cérebro, influenciando indirectamente a actividade da glândula pituitária. Lincoln (1992) apresenta dois modelos para explicar os mecanismos de acção da melatonina. A primeira hipótese indica que o efeito principal da melatonina é ao nível da via neurológica dopaminérgica e/ou opióide na região médiobasal do hipotálamo (Rasmussen, 1991; Lincoln e Maeda, 1992). Estas células influenciam a actividade dos neurónios neurosecretores do hipotálamo, os quais apresentam terminações nervosas na eminência mediana. A secreção para o sistema sanguíneo porta-hipotálamo-hipofisário permite a regulação de diferentes tipos celulares da adenohipófise. Existe evidência do efeito inibitório do sistema dopaminérgico na liberação de GnRH / LH, podendo desempenhar um papel importante na supressão da actividade reprodutiva durante o anestro sazonal, actuando ao nível da região médiobasal do hipotálamo (Meyer e Goodman, 1986). A segunda hipótese indica, como local principal da actuação da melatonina, a “*pars tuberalis*” da glândula pituitária (Morgan e Williams, 1989). A “*pars tuberalis*”, em resposta à melatonina, produz um factor desconhecido que afecta a função secretora da parte anterior da glândula pituitária. Este factor, por sua vez, pode actuar na eminência mediana ou em outros locais do cérebro, de modo a influenciar o controlo hipotalâmico da glândula pituitária, ou pode actuar directamente nas células da glândula pituitária.

O aumento nocturno da melatonina vai mediar o efeito “inibidor” dos dias longos, bem como o efeito “indutor” dos dias curtos (Karsch *et al.*, 1984). Assim, durante os dias curtos, a melatonina induz o pulso gerador de LH a ser mais resistente ao efeito inibidor do estradiol, enquanto que, o efeito supressor da melatonina,

durante os dias longos, diminui o pulso gerador de LH sensibilizado-o à acção inibidora do estradiol.

Assim, endocrinologicamente, o anestro sazonal pode ser caracterizado como um período durante o qual o eixo hipotálamo-hipofisário fica altamente sensível aos efeitos de “*feedback*” negativo do estradiol, mantendo-se baixos os níveis de secreção tónica de LH bem como os níveis séricos de progesterona. Não se observam os picos pré-ovulatórios de LH e FSH, não se realizando as fases finais do crescimento e maturação folicular e consequente ovulação (Haresign *et al.*, 1985; O’Callaghan *et al.*, 1987; Karsch *et al.*, 1980). Os níveis tónicos de FSH mantêm-se normais durante o período de anestro, não desempenhando aparentemente um papel importante no controlo do anestro sazonal, o qual parece dever-se, na ovelha, apenas à inadequada secreção episódica de LH (Mc Neilly *et al.*, 1982).

As concentrações sanguíneas de prolactina apresentam uma sazonalidade marcada, sendo superiores durante os dias longos em relação ao que se verifica nos dias curtos (Pijoan e Williams, 1984). Esta sazonalidade, no entanto, não pode ser associada conclusivamente com o início e a duração da estação reprodutiva (Pijoan e Williams, 1984), verificando-se que, durante o anestro sazonal, os níveis de prolactina não parecem intervir directamente com o crescimento folicular (McNeilly *et al.*, 1982).

## **2.2. Duração da Estação Reprodutiva e Taxa de Ovulação**

O conhecimento dos inúmeros aspectos que influenciam a duração da estação reprodutiva e a sua manipulação permite melhorar significativamente a eficácia reprodutiva de uma exploração. Podemos agrupá-los em factores ambientais, factores inerentes ao próprio animal e factores sociais.

### **2.2.1. Factores Ambientais**

#### i) Fotoperíodo e Estação do Ano

Os ovinos são designados como reprodutores de “dias curtos” ou seja, a sua actividade reprodutiva inicia-se quando a duração dos dias começa a diminuir, perto do equinócio de Outono (Yeates, 1949), iniciando-se a estação reprodutiva, para a maioria das raças, no final do Verão ou início do Outono (Thimonier e Mauléon, 1969; Robison e Karsch, 1984). Mais importante do que a duração do fotoperíodo parece ser a direcção na qual esta duração se altera, ou seja, o aumento ou a diminuição da duração do período de luz em relação à experiência prévia (Robinson e Karsch, 1987). Assim, enquanto a exposição a dias longos durante o Verão inibe a transição do anestro sazonal para a estação reprodutiva (Wayne *et al.*, 1990), a subsequente exposição a dias curtos induz o aparecimento e manutenção da actividade reprodutiva (Malpaux e Karsch, 1990).

Na medida em que é necessária a sequência específica de “dias longos: dias curtos” para a indução da actividade reprodutiva, a utilização de tratamentos de luz, que simulem esta sequência, permite antecipar o início da época reprodutiva em

ovelhas (O'Callaghan *et al.*, 1992). Estes tratamentos podem ser associados à administração de melatonina exógena e/ou a técnicas de maneio como a exposição ao macho (Williams e Helliwell, 1993; Donovan *et al.*, 1994; Sweeney e O'Callaghan, 1996).

#### ii) Localização Geográfica

A localização geográfica tem um efeito marcante na duração da estação reprodutiva, verificando-se que animais explorados em latitudes maiores, em virtude da maior amplitude de variação do fotoperíodo, apresentam uma sazonalidade mais marcada comparativamente a animais localizados na região equatorial (Hulet *et al.*, 1974).

#### iii) Temperatura

A interpretação do efeito da temperatura na actividade reprodutiva torna-se complicada, na medida em que é difícil diferenciar o efeito desta do efeito do fotoperíodo, bem como das consequentes alterações de comportamento alimentar, as quais induzem por si, alterações da função reprodutiva (Haynes e Howles, 1981). Outros factores tais como humidade, ventilação e radiação solar interactuam com as variações de temperatura.

A temperatura não parece ter um papel importante directamente na ciclicidade reprodutiva, mas afecta directamente a sobrevivência embrionária. Altas temperaturas resultam numa baixa percentagem de óvulos fertilizados, em maior mortalidade embrionária e consequentemente em menor prolificidade. Ovelhas sujeitas a altas temperaturas, durante os 6 dias que antecedem a data prevista do estro, apresentaram atrasos quer na onda pré-ovulatória de LH, quer no início do estro.

Além disso, verifica-se uma redução na incidência de cios e uma menor expressão deste (Sawyer *et al.* 1979). As altas temperaturas estão frequentemente associadas a diminuição nas concentrações basais de LH, provavelmente devido à alteração inerente dos hábitos alimentares (Clarke e Tilbrook, 1992).

### **2.2.2. Factores Inerentes ao Animal**

O grau de sazonalidade em ovinos varia de acordo com a raça (Wheeler e Land, 1977), existindo diferenças significativas em relação ao início e duração da estação reprodutiva (Williams, 1984; Lamberson e Thomas, 1982). Assim, ovelhas de raça Campaniça, Merino Branco, Merino Precoce e Ile France, apesar de apresentarem uma certa sazonalidade em relação à incidência de cios e ovulações, mantêm um certo grau de actividade éstrica ao longo de todo o ano, não sendo possível indicar, para estas raças, uma estação de anestro definida. Verifica-se no entanto, uma sazonalidade mais marcada na raça Ile France nas condições do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóbada (Bettencourt, 1988).

De acordo com Folch (1993), estudos realizados em raças Ibéricas, recorrendo a laparoscopia e doseamentos de progesterona, indicam a existência de um anestro pouco profundo e de curta duração, existindo sempre, ao longo do ano, uma percentagem de fêmeas cíclicas. Os resultados obtidos por Silva e Calheiros (1980) indicam que a actividade reprodutiva em ovinos da raça Merina Branca atinge valores máximos entre Junho e Outubro, começa a decrescer em Novembro e atinge valores mínimos em Fevereiro. Rodrigues *et al.* (1989), em ovelhas Merino da Beira Baixa,

obtiveram valores de fertilidade elevados nos meses de Primavera. Barbas *et al.* (1991) em ovelhas Serra da Estrela, observaram variações significativas na actividade ovárica ao longo do ano, com 55% das ovelhas apresentando actividade durante os meses de Abril a Junho, elevando-se este valor durante os meses de Julho a Março para 90,5%. Os mesmos autores referem uma percentagem de ovelhas em estro mais elevada no Verão e Outono (50-65%) com valores mais baixos no Inverno e Primavera (30-45%).

No que diz respeito à taxa de ovulação, existem vários genótipos ovinos que apresentam taxas de ovulação elevadas, sendo talvez os mais conhecidos o Booroola Merino (Bindon *et al.*, 1978), o Finnsheep (Hanrahan e Quirke, 1985) e o Romanov (Bindon *et al.*, 1979). Existem indicações que o determinismo genético nestas raças é diferente. Enquanto no caso do Booroola Merino a elevada taxa de ovulação é devida a um gene maior (gene F), na Finnsheep e Romanov as elevadas taxas de ovulação são devidas à acção aditiva de vários genes.

A idade da ovelha influencia também a taxa de ovulação (Montgomery *et al.*, 1985). Assim, o pico da taxa de ovulação ocorre por volta dos três anos e meio, mantendo-se pelo menos até cerca dos dez anos de idade (Bindon *et al.*, 1980).

O mecanismo do efeito da suplementação alimentar sobre a reprodução não está ainda totalmente esclarecido. No entanto, para as mesmas condições, o aumento do nível nutritivo estimula a ovulação (Clarke e Tilbrook, 1992; Evans e Maxwell, 1987). A condição corporal antes da cobrição tem um papel importante na performance reprodutiva, influenciando a taxa de ovulação e a mortalidade embrionária (Gunn *et al.*, 1969; Gunn *et al.*, 1972). Assim, neste período, os animais

deverão estar num bom estado nutricional, com condição corporal entre 2,5 e 3 (escala de 1 a 5).

### **2.2.3. Factores Sociais**

Os factores de natureza social incluem a utilização de técnicas de maneio reprodutivo, utilizadas geralmente com o objectivo de antecipar o início da estação reprodutiva. Em baixas latitudes, estas técnicas podem ser utilizadas em qualquer época do ano, desde que o animal esteja em estado fisiológico receptivo para iniciar a sua actividade reprodutiva (Williams, 1978). O “efeito macho” é um método natural para induzir e sincronizar o cio em ovelhas em anestro, que consiste na introdução de carneiros em grupos de ovelhas previamente isoladas do macho. A sua eficácia foi demonstrada pela primeira vez, na interrupção do anestro sazonal, em ovelhas Merinas (Underwood *et al.*, 1944).

A utilização prática do “efeito macho” implica o isolamento das fêmeas, evitando qualquer contacto visual, olfativo ou sonoro com os machos, por um período de pelo menos 4 semanas e com uma distância mínima de 400 metros. O principal estímulo a partir do macho é olfativo, pela produção de ferôrmonas. Pearce e Oldham (1988) sugeriram que o “efeito macho” é mediado por uma combinação de estímulos comportamentais e visuais por parte do carneiro.

O contacto com o macho induz um aumento da concentração plasmática de LH e um pico pré-ovulatório de LH (Perkins e Fitzgerald, 1994). A maioria das ovelhas apresentará uma ovulação 6 dias após a introdução do carneiro, a qual não é geralmente acompanhada de estro (Schinckel, 1954; Pearce e Oldham, 1984). Num

estudo realizado por Oldham *et al.* (1979), em ovelhas Merinas em anestro, a ovulação foi induzida em 50 % das ovelhas nas 41 horas seguintes à introdução dos carneiros.

A sincronia que se observa na ovulação, após a introdução dos carneiros, não é acompanhada da sincronização de cios correspondente. Dum modo geral, observam-se dois picos de manifestação de cio: um aproximadamente 18 dias após o contacto com o macho e outro aproximadamente 6 dias depois do primeiro (Sckinckel, 1954, Fontes, 1991 cit. por Silva, 1993). Assim, o corpo lúteo, formado a partir de ovulação induzida pelo “efeito macho”, pode ter uma duração normal ou regredir precocemente (Oldham e Martin, 1978). Se a duração do corpo lúteo é normal, as ovelhas exibirão cio 18 a 19 dias após a introdução dos carneiros, ou seja, um ciclo após a primeira ovulação. Se o corpo lúteo é de curta duração, regredie após 5 a 6 dias, apresentando as ovelhas uma segunda ovulação, não acompanhada de cio, pouco tempo depois. O corpo lúteo, após esta segunda ovulação, apresenta geralmente uma duração normal, e as ovelhas manifestam cio um ciclo éstrico após esta segunda ovulação, 24 dias após a introdução dos carneiros (Oldham e Martin, 1978).

A eficácia deste método varia com vários factores tais como a localização geográfica da exploração (Williams, 1978), a época do ano (Bettencourt, 1995), a “profundidade” do anestro e momento da introdução do macho em relação à época reprodutiva (Martin *et al.*, 1986), a duração do período de isolamento (Martin *et al.*, 1986), a raça da ovelha (Martin *et al.*, 1986, Nugent *et al.*, 1988a), a raça do carneiro (Nugent *et al.*, 1988b), o estado nutricional e idade dos animais e a associação a

tratamentos hormonais (Oldham e Pearce, 1984).

No que diz respeito à época do ano, o “efeito macho” é mais eficiente quando utilizado imediatamente antes do início da época reprodutiva (Nugent *et al.*, 1988b), podendo ser utilizado para antecipá-la (Hall *et al.*, 1986). Ovelhas expostas ao “efeito macho”, num período de anestro profundo, podem ovular uma vez, mas voltam a uma situação de anestro, sem uma segunda ovulação e sem manifestarem círcio. Comparando a aplicação do “efeito macho”, em ovelhas Merino Branco, Bettencourt (1995) observou que na Primavera a maioria das ovelhas apresentou cios durante a 3<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> semana após a introdução dos carneiros, enquanto que no Outono a maior incidência de cios ocorreu nas duas primeiras semanas de cobrição. Estes resultados sugerem que na época de Outono a maioria das ovelhas encontra-se cíclica, aquando da entrada dos carneiros. Fontes (1991), cit. por Silva (1993), refere que a utilização do efeito macho em ovelhas Merinas, na Primavera, induz um aumento na percentagem de fêmeas cíclicas de 19% para 97% durante as duas semanas seguintes à introdução dos carneiros.

A sincronização de cios, pela introdução do macho, pode ser melhorada se se eliminarem os corpos lúteos de curta duração, através da aplicação de um tratamento prévio com progesterona, permitindo assim o aproveitamento da maior taxa de ovulação associada à primeira ovulação após a introdução dos carneiros (Oldham e Pearce, 1984). A aplicação destes tratamentos pode restringir-se a uma única injecção de progesterona, se fôr suficiente a sincronização do estro ao longo de 4 a 5 dias, ou à aplicação de esponjas ou implantes subcutâneos se fôr necessário uma sincronização mais definida (Oldham e Pearce, 1984). Num estudo efectuado por

Lindsay *et al.*(1984), a administração de uma única injecção de progesterona não afectou a proporção de ovelhas que responderam ao “efeito macho”, mas resultou numa maior sincronização na manifestação de cios, registando-se um único pico 16 a 21 dias após a introdução dos carneiros. O momento da junção dos machos, após a remoção das esponjas, influencia o período de cobrição, a taxa concepção, e n º de nascimentos (O’Doherty e Crosby, 1990).

#### **2.2.4. Tratamentos Hormonais**

Os tratamentos hormonais podem ser utilizados com o objectivo de modificar a estação reprodutiva, sincronizar grupos de cobrição ou para alterar a taxa de ovulação, podendo ser associados entre si ou com técnicas de manejo reprodutivo.

A utilização de progestagénios está directamente relacionada com a duração da fase luteína da espécie em que são aplicados, verificando-se que a administração de progesterona exógena não afecta a função de um corpo lúteo já formado. Assim, a sua administração deverá igualar ou exceder o tempo de vida de um corpo lúteo normal, 12 a 14 dias em ovelhas, que entram em cio 2 a 3 dias após a retirada do progestagénio exógeno (Evans e Maxwell, 1987). Os progestagénios podem ser administrados de várias formas: via vaginal, via sub cutânea, via intra muscular e via oral.

Existem duas formas que utilizam a via vaginal: as esponjas ou pessários intravaginais e o CIDR (Libertador de Substâncias Internamente Controlado; CIDR=Controlled Internal Drug Release dispenser). As esponjas são impregnadas

com acetato de fluorogestona (FGA) nas doses de 30, 40, e 45 mg, sendo a dosagem mais baixa recomendada para ovelhas em anestro, já que o eixo hipotálamo hipofisário está mais sensível, bastando pequenas quantidades para exercer “feedback” negativo. Para ovelhas na estação reprodutiva, recomendam-se esponjas de 40 mg (Evans e Maxwell 1987). Outras esponjas utilizadas, impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), são utilizadas em todas as épocas de cobrição. O CIDR é um dispositivo intravaginal, de silicone elástico impregnado em progesterona médica e moldada sobre um núcleo de nylon. Existem dois tipos de CIDR, o tipo S (1986), desenhado para ovelhas (Wheaton *et al.*, 1993), e o tipo G (1988) cujas modificações facilitam a sua aplicação em vaginas pequenas permitindo o tratamento de borregas (Welch e Tervit, 1984; Welch, 1985 cits. por Wheaton *et al.*, 1993; McMillan, 1985). Os CIDR-S contendo 3, 6, 9, e 12 % (v/v) de progesterona sintética, idêntica à natural, foram testados, tendo os últimos três demonstrado ser eficazes na inibição do estro. Este dispositivo é eficaz na indução de cio em ovelhas tanto na estação reprodutiva, bem como fora desta (Wheaton *et al.*, 1993).

As principais vantagens do CIDR em relação às esponjas relacionam-se com o desenho ou forma deste último, a qual evita a acumulação de corrimento vaginal que se regista geralmente aquando da retirada das esponjas, apresentando-se assim como um método mais asséptico e que parece apresentar uma melhor taxa de retenção (Wheaton *et al.*, 1993). Segundo Walker *et al.* (1989), ovelhas tratadas com CDIR iniciam a ovulação mais cedo do que ovelhas tratadas com MAP ou FGA, tendo-se observado os tempos médios de 51, 69 e 63 horas respectivamente. Estes resultados contrariam os obtidos por Maxwell *et al.* (1986) cits. por Walker *et al.*, (1989) os

quais indicaram que a ovulação ocorreu em tempo semelhante à registada em ovelhas tratadas com MAP.

Os implantes subcutâneos de progesterona são colocados na orelha ou abaixo do joelho, através de uma pequena intervenção cirúrgica (Evans e Maxwell, 1987). O tipo de progestagénio a utilizar pode ser 2 a 6 mg de norgestomet (Ainsworth, 1985), 10 a 60 mg de acetato de medroxiprogesterona, MAP, ou 100 a 600 mg de progesterona.

A administração intramuscular implica aplicações diárias de uma ou duas injecções de progesterona, numa dose de 5 a 25 mg, de modo a manter o nível sanguíneo de progesterona (Keisler, 1991). A desvantagem deste método é a grande necessidade de intervenções e consequente aumento de mão de obra.

Na administração oral, o progestagéneo é fornecido na alimentação do animal. Podem ser utilizados: acetato de medroxiprogesterona (MAP, 10 a 60 mg/dia/ovelha); acetato de clorgestona (CAP, 1 a 3 mg/ovelha/dia) e acetato de melengesterol (0,1 a 2 mg/ovelha/dia). A paragem do tratamento não coincide com a eliminação do progestagénio do sistema da ovelha, na medida em que está dependente do trânsito intestinal (Keisler, 1991). A sincronização após a administração ao longo de 14 a 16 dias em ovelhas é eficiente, no entanto a fertilidade ao primeiro cio é baixa, facto que pode ser ultrapassado se a inseminação for efectuada no segundo cio após o tratamento.

Os tratamentos hormonais utilizados com o objectivo de aumentar a taxa de ovulação baseiam-se na suplementação com gonadotrofinas naturais, FSH (Keisler, 1991) ou LH isolada ou combinada com a FSH (Wallace *et al.*, 1986), ou com

gonadotrofinas placentárias como a PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) (Jabour *et al.*, 1991), ou hCG, (Radford *et al.*, 1984) durante a fase folicular do ciclo estríco. A imunização contra os esteróides ováricos ou contra a inibina, impedindo os mecanismos de “feedback” negativo ovário hipotálamo-hipofisário, pode também ser utilizada, provocando excesso de libertação de gonadotrofinas endógenas (Evans e Maxwell, 1987).

Os factores de libertação do hipotálamo, tais como a GnRH, bem como as gonadotrofinas, LH e FSH, são rapidamente metabolizáveis, apresentando assim uma semi-vida muito curta, o que implica administração contínua para que o tratamento tenha o efeito desejável. No caso das hormonas placentárias, PMSG e hCG, cuja semi vida é maior, uma única administração é suficiente.

A utilização de PMSG é a mais vulgarizada em pequenos ruminantes (Jabour *et al.*, 1991). A PMSG tem uma acção biológica semelhante à FSH e LH, predominando a actividade da primeira (Hafez, 1987). A injecção de PMSG vai estimular a actividade dos folículos ováricos, aumentando assim a produção de estradiol e induzindo a onda pré ovulatória de LH. A dose de PMSG a administrar depende da raça e tamanho da ovelha, bem como da estação reprodutiva. Assim, fêmeas grandes e de raças pouco prolíficas necessitam de doses maiores de PMSG tal como ovelhas fora da estação reprodutiva. As doses a administrar são da ordem dos 400 a 500 U.I., para fêmeas na estação reprodutiva, e de 500 a 750 para fêmeas fora da estação reprodutiva. O factor mais importante a ter em conta é a necessidade de se utilizarem simultaneamente métodos de sincronização do cio, ou a monitorização do estro, já que, para ser efectiva, a PMSG tem de ser administrada nos dias 12 a 14 do

ciclo éstrico (Scaramuzzi *et al.*, 1988).

A utilização de PMSG, em tratamentos de sincronização, induz a produção de anticorpos com um efeito cumulativo, quando os mesmos são aplicados repetidamente (Bodin *et al.*, 1997). De acordo com estes autores, os anticorpos podem afectar a reprodução mesmo um ano após a última administração de PMSG, induzindo uma diminuição na sincronização, antecipando ou retardando a onda pré-ovulatória de LH.

### **3. Fisiologia Reprodutiva na Espécie Ovina : Macho**

#### **3.1. Endocrinologia**

A nível hipofisário existem três hormonas com importância no controlo do processo reprodutivo do macho: a LH, a FSH e a prolactina. Contrariamente à FSH, a LH e a prolactina são secretadas de modo pulsátil (Lapwood, 1986). A testosterona, sintetizada a nível testicular, sob influência da LH, é também secretada de modo pulsátil verificando-se um pico aproximadamente 30 minutos após um pico de LH (Lapwood, 1986). A testosterona inibe a libertação de LH, por um mecanismo de “feedback” negativo, ocorrendo este processo por alterações da libertação hipotalâmica de GnRH (Pelletier, 1970) e por alterações na resposta hipofisária à GnRH endógena (Pelletier, 1974). As flutuações de FSH são moderadas e independentes da ocorrência de pulsos de LH (Sanford *et al.* 1976, 1977).

O controlo da função testicular é exercido pela LH e FSH que interactuam

entre si a vários níveis, sendo os seus principais locais de actuação as células de Leydig e as células de Sertoli, respectivamente, (Lipsett, 1976). Assim, a LH estimula a produção de androgénios, principalmente a testosterona pelas células de Leydig, e a FSH actua nos túbulos seminíferos estimulando a espermato-génesis (Krester, 1982). A prolactina está directamente implicada no desenvolvimento testicular dos carneiros (Ravault e Courot, 1975; Ravault, 1976), podendo actuar também como hormona permissiva em sinergia com a LH e testosterona (Lapwood, 1986). A testosterona estimula a espermato-génesis nos túbulos seminíferos, controla o desenvolvimento e função dos órgãos reprodutivos e o comportamento sexual secundário (Christensen, 1975). É ainda responsável pelo aparecimento de características sexuais secundárias e interage com a LH e FSH no controlo do início e manutenção da espermato-génesis (Hafez, 1987, Christensen, 1975; Courot *et al.*, 1975).

### **3.2. Espermato-génesese**

O tempo necessário desde a activação das espermato-gónias até à libertação de espermatozóides livres, para o interior dos túbulos seminíferos, é de cerca de 40 dias nos carneiros (Evans e Maxwell, 1987).

Antes de estar preparado para a fertilização, o espermatozóide sofre vários processos que incluem a maturação e capacitação, terminando com a reacção do acrosoma. A maturação ocorre ao longo do epidídimo, adquirindo o espermatozóide a capacidade de movimento, processo este que requer cerca de 10 a 14 dias (Ortavant

1959). A capacitação ocorre no tracto reprodutivo feminino, principalmente no oviducto, envolvendo um processo de destabilização de membrana, que pode resultar ou na reacção de acrossoma, ou na morte celular (Harrison, 1996 cit. por Maxwell e Watson, 1996). Este processo está dependente de um influxo de iões cálcio (Yanagimachi, 1994), sendo o tempo requerido para a capacitação do espermatozóide no oviducto inferior a duas horas (Mattner, 1963 cit. por McKelvey *et al.*, 1985). Os espermatozóides só adquirem capacidade de fertilização após sofrerem o processo de capacitação (Watson, 1995).

Para que ocorra a fertilização, é necessário que ocorra a ligação e migração do espermatozóide através da zona pelúcida e fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana do óvulo. As enzimas existentes no acrossoma são específicas e essenciais para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e a activação do acrossoma é indispensável para a actividade enzimática e consequente fusão celular (Hafez, 1987).

### **3.3. Avaliação do Macho Reprodutor**

#### **3.3.1. Líbido**

O líbido ou desejo sexual é um aspecto importante na avaliação do macho reprodutor, condicionando o número de ovelhas que o macho é capaz de fecundar e, consequentemente, a fertilidade do rebanho (Lindsay *et al.*, 1979).

O líbido dos carneiros pode ser avaliado através de várias escalas, as quais são necessariamente subjectivas. Banks (1964) e Lees (1965) descrevem uma escala de 0 a 5 correspondendo a diferentes comportamentos: (0) nenhum interesse; (1) cheirar a genitália; (2) agressão; (3) “*flehmen*”(levantamento prolongado do lábio superior); (4) corte; (5) tentativas activas para montar a ovelha. Bremner *et al.* (1984) avaliaram o líbido, pelo tempo que os carneiros levaram a saltar a ovelha e pelo n º de montas em 15 minutos de observação. O líbido está ainda correlacionado com outros caracteres reprodutivos importantes nomeadamente a concentração plasmática de testosterona (Dufour *et al.*, 1984).

### **3.3.2. Avaliação Testicular**

O desenvolvimento testicular pós natal está mais relacionado com o peso vivo do que com a idade cronológica dos animais (Watson *et al.*, 1956; Courot, 1962; Orji e Steinbach, 1976; Braun *et al.*, 1980).

O tamanho testicular influencia a produção de sémen em carneiros (Amann, 1970; Ortavant, 1958 ). Em carneiros, jovens e adultos, o peso é o caracter testicular mais correlacionada com todos os aspectos da produção de sémen (Knight, 1977; Lino, 1972, Cameron *et al.*, 1984a,b). Assim, num estudo realizado por Cameron *et al.* (1984a), o número médio de espermatozóides por ejaculado e a produção diária de espermatozóides foram significativamente correlacionados com o peso testicular,  $r = 0.63$  ( $P < 0.05$ ) e  $r = 0.73$  ( $P < 0.01$ ), respectivamente. De acordo com estes autores,

cada grama adicional no peso testicular corresponde a um aumento de  $4.1 \times 10^5$  espermatozóides por ejaculado e a um aumento de  $10.7 \times 10^6$  da produção diária de espermatozóides. A taxa de produção espermática diária em função do peso testicular foi de aproximadamente 20 milhões de espermatozóides por grama de peso testicular / dia (Knight, 1973 cit. por Cameron *et al.*, 1984a).

Na medida em que o peso testicular é uma característica difícil de medir com precisão, em animais vivos, Knight (1977) observou que outros indicadores do tamanho testicular, tais como a circunferência escrotal, o volume escrotal e o diâmetro escrotal médio, se encontram correlacionados significativamente quer com o número de espermatozóides nos testículos e epidídimos, quer com o peso testicular. Em condições de campo, a circunferência escrotal é o indicador mais útil do número total de espermatozóides que podem ser obtidos por dia (Cameron *et al.*, 1984b). O volume escrotal pode ser avaliado por medição do aumento de volume de água após imersão testicular, conforme descrito por Evans e Robinson (1980).

A circunferência escrotal está relacionada com o peso vivo do carneiros (Notter *et al.*, 1985; Matos e Thomas, 1992; Matos *et al.*, 1992), verificando-se que as diferenças de circunferência escrotal que se observam entre raças resultam de diferenças do tamanho corporal (Notter *et al.*, 1985). Assim, observa-se que raças maiores possuem circunferências escrotais maiores (Braun *et al.*, 1980).

### **3.3.3. Avaliação Laboratorial do Sêmen**

Em termos práticos, consideram-se dois métodos de colheita de sêmen: por vagina artificial e por electroejaculação. O método da vagina artificial é o preferido, na medida em que é o método que mais se aproxima do processo natural de cópula, sendo um método rápido e simples, não stressante para o animal e com o qual se podem efectuar várias colheitas ao mesmo carneiro, obtendo-se em geral sêmen de boa qualidade. A desvantagem deste método é que implica um treino prévio dos machos. O método da electroejaculação, apesar de mais traumatizante para o animal, continua a ser usado, não só por permitir a colheita de sêmen em animais incapacitados, mas também porque, devido à sua simplicidade e rapidez de execução, se torna útil quando é necessária a avaliação de um grande número de machos que não foram préviamente treinados. O sêmen colhido por este método tem geralmente maior volume, mas menor concentração e está frequentemente contaminado com detritos celulares, urina, ou células de descamação.

#### **3.3.3.1. Avaliação de Características Macroscópicas do Sêmen**

O exame macroscópico do sêmen incide sobre os seguintes aspectos:

**Volume.** Avaliado num tubo calibrado ou directamente no copo colector. O volume normal por colheita é de 1 a 1,5 ml nos carneiros.

**Côr e Cheiro.** O sêmen do carneiro é normalmente de côr branco a pérola. Colorações e cheiros anormais podem indicar contaminação com sangue ou urina.

**Consistência.** Depende da concentração do sêmen podendo ser utilizada para estimar

este valor. De acordo com Boundy (1993) varia de cremosa a leitosa e aquosa:

**5** Cremoso Espesso:  $4,5-6 * 10^9$  espermatozóides/ml sémen

**4** Cremoso:  $3,5-4,5 * 10^9$  espermatozóides/ml sémen

**3** Cremoso Fino :  $2,5-3,5 * 10^9$  espermatozóides/ml sémen

**2** Leitoso:  $1-2,5 * 10^9$  espermatozóides/ml sémen

**1** Nebuloso:  $0,3-1 * 10^9$  espermatozóides/ml sémen

**0** Claro Aquoso: muito poucos espermatozóides/ml sémen

### **3.3.3.2. Avaliação de Características Microscópicas do Sêmen**

**Concentração.** Sêmen de boa qualidade contém cerca de 3,5 a 6 mil milhões de espermatozóides por mililitro (Boundy, 1993). A determinação da concentração pode ser efectuada por contagem em haemocitómetro, utilizando um colorímetro, ou um fotômetro adequado e calibrado para o sêmen das diferentes espécies.

**Mobilidade Massal.** Esta característica só pode ser observada em espécies que possuem sêmen muito concentrado, como é o caso do carneiro, que, quando observado ao microscópio, apresenta um movimento de onda característico. É mais utilizada para avaliar a mobilidade em sêmen fresco. O processo consiste em colocar uma gota de sêmen numa lâmina, observando-se a mobilidade ao microscópio em placa aquecida a 37° C, com uma baixa ampliação. A avaliação é feita com base no vigor das ondas ou na actividade global (caso não existam ondas) aplicando-se uma escala de 0 (nenhum movimento) a 5 pontos (movimento por ondas muito intenso).

**Mobilidade Individual.** Corresponde à fracção de espermatozóides com

movimentos progressivos e determina-se pela observação de uma gota de sémen diluído em soro fisiológico, entre lâmina e lamela em placa aquecida, utilizando uma ampliação de 400x. É frequentemente utilizada para avaliar a mobilidade de sémen congelado / descongelado.

**Morfologia.** A avaliação da morfologia pretende determinar a percentagem de formas anormais encontradas num ejaculado. A morfologia anormal dos espermatozóides pode ser classificada em: cabeças anormais e soltas, gotas citoplasmáticas unidas à parte anterior, média ou distal da peça intermédia, caudas enroladas ou dobradas e outras anormalidades. A percentagem de espermatozóides anormais influencia a fertilidade quando é superior a 20% (Hafez, 1987) e amostras de sémen com mais de 15% de formas anormais não devem ser utilizadas em IA.

Existem várias técnicas complexas que permitem avaliar a morfologia dos espermatozóides, no entanto, a mais vulgarmente utilizada, em trabalhos de campo, consiste na coloração vital de eosina negrosina. Os resultados do teste de coloração vital estão correlacionados com a mobilidade individual e com a concentração de espermatozóides vivos, mas não com a concentração de espermatozóides totais, vivos e mortos (Espinosa *et al.*, 1993). Estudo realizados por Hulet *et al.* (1965), indicaram que a maior correlação entre a fertilidade e parâmetros de qualidade do sémen avaliados “*in vitro*”, foi observada em relação à morfologia das células. No entanto, os métodos rotineiros de contrastação seminal não apresentam em geral uma boa correlação com os resultados “*in vivo*”, na medida em que a fertilidade é um fenómeno complexo, no qual intervêm numerosos outros factores de ordem fisiológica ou ambiental (Garde *et al.*, 1993).

Um dos factores mais importantes a ter em conta na avaliação da morfologia é a integridade do acrossoma, a qual é indispensável para a fertilização. Recentemente, têm vindo a ser utilizadas novas técnicas como o teste de endosmose (Garde *et al.*, 1993), que permite avaliar a capacidade dos espermatozóides de capacitação e reacção do acrossoma, existindo vários estudos que indicam ser esta prova a que mais se relaciona com os resultados de fertilidade (Cortes *et al.*, 1993). Neste teste, os espermatozóides são submetidos à acção de uma solução hiposmótica, durante determinado período de tempo, após o qual são observados ao microscópio de contraste de fases, determinando-se a proporção de espermatozóides que apresenta aumento de volume da cauda (Hafez, 1987). Este aumento de volume celular, por vezes acompanhado de torção helicoidal da cauda, (Artiga, 1993), deve-se à passagem de água para o interior da célula em resposta às diferentes pressões osmóticas e é sinónimo da existência de uma membrana plasmática íntegra e funcional. O teste da endosmose celular apresenta correlações positivas com a mobilidade individual (Espinosa *et al.*, 1993; Jeyendran *et al.*, 1984), com a concentração de espermatozóides (Jeyendran *et al.*, 1984) e com os resultados de coloração vital (Jeyendran *et al.*, 1984; Artiga, 1993; Espinosa *et al.*, 1993).

#### **4. Sazonalidade e Estação Reprodutiva no Macho**

Em latitudes temperadas, o fotoperíodo é o principal factor que controla todo o processo reprodutivo no macho (Pelletier e Ortavant, 1975; Alberio e Colas, 1976), embora em condições de pastoreio e em ambientes menos favoráveis, a nutrição

possa ter um papel determinante neste processo (Masters e Fels, 1984).

No estudo de diferentes raças, no que diz respeito a padrões reprodutivos sazonais, nenhum dos critérios de avaliação isolado constitui um índice de avaliação credível. No entanto, a avaliação dos vários critérios combinados, dará uma melhor estimativa das diferenças que possam existir entre raças.

#### **4.1. Endocrinologia da Sazonalidade Reprodutiva no Macho**

As concentrações hormonais de LH, FSH, testosterona e prolactina presentam variações sazonais controladas principalmente pelo fotoperíodo (Poulton e Robinson, 1987). Assim, a diminuição do fotoperíodo estimula a secreção de LH e FSH pela hipófise, verificando-se consequentemente um aumento da actividade testicular e da produção de testosterona (Hafez, 1987). Quando a duração dos dias aumenta, verifica-se uma diminuição da secreção de gonadotrofinas e testosterona (Regisford e Katz, 1993). As concentrações sanguíneas de prolactina apresentam também um padrão sazonal, com níveis elevados associados a dias longos, enquanto a diminuição do período de luz induz uma diminuição na concentração de prolactina (Poulton e Robinson, 1987; Regisford e Katz, 1993). Na medida em que a prolactina, através de um mecanismo de “feedback” negativo, inibe a secreção de GnRH pelo hipotálamo, esta hormona poderá mediar o efeito do fotoperíodo no crescimento e regressão testicular em carneiros adultos, bem como no comportamento sexual de carneiros jovens (Howles *et al.*, 1980, 1982).

A frequência de pulsos de LH e testosterona aumenta durante o Outono,

quando a duração dos dias diminui (Pelletier *et al.*, 1982). Sandford *et al.* (1977), num estudo realizado durante a estação reprodutiva, observou que quando a duração do período de luz diária diminui, de 14:30 para 9:30 horas, aumenta a frequência de pulsos de LH e diminui a sua amplitude, verificando-se concumantemente um aumento da frequência e amplitude dos pulsos de testosterona.

A elevada correlação ( $r = 0.95$ ) que se verifica entre o aumento da frequência de picos de LH e o aumento das concentrações médias de testosterona, sugere que, no início da estação reprodutiva, o aumento da concentração média de testosterona deve-se ao aumento da frequência de pulsos de LH. À medida que progride a estação reprodutiva este efeito é potencializado. Assim, verifica-se que pulsos de LH de amplitude sucessivamente mais baixos induzem maiores elevações na concentração sérica de testosterona, devendo-se esta variação possivelmente ao aumento da sensibilidade testicular à acção da LH (Sanford *et al.*, 1977). Sarlos *et al.* (1996) encontraram diferenças significativas nas concentrações médias de testosterona entre o Outono (16,53 ng/ml) e a Primavera (5,28 ng/ml).

De acordo com alguns autores, as alterações sazonais na secreção de LH e testosterona são influenciadas pela raça (Schambacher e Lunstra, 1976), idade (Williams *et al.*, 1976) e pela exposição prolongada do carneiro a ovelhas em estro (Illius *et al.*, 1976). Independentemente de os carneiros estarem ou não em período de cobrição, os níveis sanguíneos de testosterona diminuem deste o meio do Inverno à Primavera (Katongole *et al.*, 1974). No entanto, em carneiros Finnish Landrace, um período de cobrição no final da estação reprodutiva pode conduzir ao aumento temporário dos níveis de FSH (Sanford *et al.*, 1976), LH e testosterona (Sanford *et*

*al.*, 1974c; Sanford *et al.*, 1976). Outros autores descrevem ainda que as concentrações sanguíneas de testosterona podem ser afectadas negativamente por aumentos significativos de temperatura (Gomes *et al.*, 1971).

#### **4.2. Alterações de Comportamento Sexual -Líbido**

Uma grande variedade de factores ambientais, tais como a estação do ano, o fotoperíodo e a nutrição, representam fontes de variação do líbido e capacidade de serviço do carneiro (Alberio e Colas, 1976). Existem também variações significativas entre raças (Hulet *et al.*, 1962b; Flecher, 1979, Poulton e Robinson, 1987), sendo estas diferenças mais acentuadas em animais jovens (Land, 1970).

Bremner *et al.* (1984), avaliando o líbido pelo tempo que os carneiros levaram a saltar a ovelha e pelo número de montas em 15 minutos de observação, registaram maior líbido no Outono comparativamente à Primavera. Noutro estudo, carneiros das raças Finnish Landrace e Suffolk apresentaram igualmente maior actividade reprodutiva no meio da estação reprodutiva (Outubro), diminuindo esta cerca de 50% na Primavera e Verão, voltando a aumentar no Outono seguinte (Schanbacher e Lunstra, 1976). A existência de uma correlação positiva ( $r = 0.59$ ) entre as concentrações médias de testosterona e a actividade reprodutiva destes carneiros ao longo dos meses de estudo, sugerem que as flutuações sazonais nas concentrações de testosterona influenciam o comportamento sexual dos carneiros. Resultados semelhantes foram obtidos por Sanford *et al.* (1977) com correlações de 0.90 e de 0.76, respectivamente para cada carneiro e entre diferentes carneiros. Contrariamente, outros autores descrevem um efeito do fotoperíodo no

comportamento sexual independentemente de ocorrerem ou não alterações na concentração periférica de testosterona (Howles *et al.*, 1980).

#### **4.3. Alterações Testiculares**

O efeito do fotoperíodo no grau de desenvolvimento testicular tem sido demonstrado por vários autores (Dyrmundsson *et al.*, 1981; Derycke *et al.*, 1988). No entanto, até determinada idade (5 meses em borregos Ile France de acordo com Alberio e Colas, 1976), o desenvolvimento testicular não é influenciado pelo fotoperíodo. A estação de nascimento influencia significativamente o desenvolvimento testicular do borrego em crescimento (Courot *et al.*, 1975; Land *et al.*, 1979).

Em carneiros adultos, o peso testicular varia ao longo do ano, com valores mínimos e máximos, respectivamente na Primavera e final do Verão, tendo-se registado diferenças da ordem dos 200 gr em Fevereiro-Março para valores superiores a 350 gr em Julho, em carneiros Ile France (Pelletier e Ortavant, 1970). O diâmetro escrotal apresenta variações de acordo com a estação do ano, observando-se valores superiores na época de Outono comparativamente à época de Primavera (Dyrmundsson *et al.*, 1981). Resultados semelhantes foram obtidos em carneiros Merino e Rommney (Bremner *et al.*, 1984), em carneiros Rambouillet, (Tulley e Burfening, 1983) e em carneiros Saloios (Silva, 1991).

O efeito de diferentes níveis nutricionais na reprodução de carneiros adultos de raça Merina Australiana foi estudado por Oldham *et al.* (1978). De acordo com

estes autores, um aumento do nível alimentar conduz a um aumento do volume testicular (67%) e do peso vivo (32%). Mais do que 50% das diferenças observadas no volume testicular foram devidas a alterações nos níveis de azoto da dieta, o que demonstra claramente a influência da componente de origem proteica no crescimento e regressão testicular de carneiros adultos. As variações sazonais que se observam no tamanho testicular em carneiros adultos, são independentes do peso vivo dos animais (Dyrmundsson *et al.*, 1981).

#### **4.4. Alterações em Características Quantitativas e Qualitativas do Sêmen**

As características quantitativas e qualitativas do sêmen estão dependentes de inúmeros factores, dos quais se destacam variações inerentes ao próprio animal, variações dependentes das técnicas de colheita utilizadas e variações dependentes de factores ambientais, nomeadamente o fotoperíodo.

A qualidade do sêmen é fortemente influenciada pela idade do animal (Colas, 1983) e está relacionada com o desenvolvimento testicular (Courot, 1979). Assim, os primeiros espermatozóides podem ser colhidos em borregos com cerca de 5 a 6 meses de idade. A produção de sêmen aumenta em quantidade e qualidade com a idade, obtendo-se ejaculados com fertilidade normal cerca dos 7,5 a 9 meses de idade (Courot, 1979). Os primeiros ejaculados da vida reprodutiva, contêm um grande número de células anormais (Skinner e Rowson, 1968; Colas, 1983) e as anomalias consistem na sua maioria, em malformações da cabeça e gotas citoplasmáticas (Skinner e Rowson, 1968). Assim, os jovens carneiros não são necessariamente bons

reprodutores e o seu uso em programas de IA resulta frequentemente em taxas de fertilidade e prolificidade baixas (Colas, 1983).

A raça do carneiro influencia significativamente a mobilidade do sémen (Boland *et al.*, 1985), existindo no entanto diferenças significativas na fertilidade entre carneiros dentro da mesma raça (Colas, 1981). Carneiros Merino mantêm sémen de relativa qualidade ao longo de todo o ano, enquanto algumas raças Britânicas apresentam um declínio marcado da qualidade do sémen nos meses de Verão (Colas, 1983).

Para se obter um número máximo de espermatozóides, a frequência das colheitas deverá ser adaptada à capacidade do animal (Courot, 1979). Tem-se verificado que o n° total de espermatozóides por ejaculado diminui com o aumento da frequência das colheitas (Salamon, 1962 cit. por Cameron *et al.*, 1984). Assim, quando os animais são sujeitos a ejaculações frequentes, o número de espermatozóides por ejaculado diminui para valores baixos e relativamente estáveis (Tomkings e Bryant, 1976 cit. por Cameron *et al.*, 1984a). O aumento da frequência de ejaculação não altera no entanto a qualidade dos espermatozóides (Salamon, 1962). Quando a utilização destes ejaculados resulta em baixas taxas de fertilidade, tal não é devido a factores qualitativos (Sanford *et al.*, 1977), mas sim ao reduzido número de espermatozóides que atingem o trato reprodutivo feminino.

A alteração do comportamento sexual do macho, através da utilização de falsas montas ou da substituição da fêmea, pode ser utilizado para aumentar a produção de sémen (Petkov, 1969 cit. por Colas *et al.*, 1975). O treino dos carneiros para colheita de sémen tem influência no seu desempenho reprodutivo,

verificando-se que carneiros jovens, quando treinados para colheitas regulares aos 5-6 meses de idade, têm uma produção espermática aos 18 meses superior a carneiros da mesma idade que não foram sujeitos a colheitas prévias (Colas *et al.*, 1975). Em carneiros treinados regularmente para cobrição natural ou colheita em vagina artifical, é possível a recolha de sémen em todos os meses do ano (Courot, 1979).

Apesar do aumento do fotoperíodo na Primavera diminuir a produção de sémen em carneiros, estes são produtores permanentes de sémen ao longo do ano (Courot, 1979). O volume do ejaculado apresenta variações sazonais durante a estação reprodutiva, aumentando de Agosto para Novembro, coincidindo os valores máximos de volume obtido com os valores máximos de concentração de testosterona (Sanford *et al.*, 1977). Os ejaculados de carneiros expostos a fotoperíodo crescente contêm mais células com formas anormais do que os de carneiros expostos a fotoperíodo decrescente (Colas, 1983).

A espermatogénese e a maturação no epidídimo são sensíveis às elevadas temperaturas (Waites e Ortavant, 1968 cit. por Courot, 1979; Rathore, 1968). Assim, a exposição a altas temperaturas resulta em alterações do perfil morfológico do sémen (Rathore, 1968) e numa consequente diminuição da fertilidade.

A produção de sémen pode ser também influenciada pela nutrição (Lindsay *et al.*, 1979). Assim, carneiros mantidos num alto nível alimentar, produzem maior número de espermatozóides do que carneiros mantidos em regime alimentar deficiente ( $26 \times 10^6$  v.s.  $18 \times 10^6$  espermatozóides / grama de peso testicular / por dia).

## **5. Inseminação Artificial em Pequenos Ruminantes**

A inseminação artificial é uma técnica reprodutiva em que se obtém o sémen do macho para ser posteriormente depositado no tracto reprodutivo da fêmea, com o auxílio de instrumentos e sem que haja contacto directo entre macho e fêmea (Evans e Maxwell, 1987). A primeira ovelha inseminada data de 1901-1904, por E. Ivanov, na Rússia. Desde essa data, a técnica tem vindo a ser desenvolvida, mas apenas a partir da década de 70 se verificou um grande impulso na sua aplicação, provavelmente associado a melhorias nos métodos de conservação do sémen e ao desenvolvimento de tratamentos de sincronização (Bodin *et al.*, 1997).

Em 1995/96, o n º total de IA foi de 903 500 ovelhas, tendo 85% dos animais sido inseminados em França (Perret *et al.*, 1997). Este número representa apenas 1,4% do total de sistemas de produção para os diferentes países. A situação varia de país para país, com uma menor percentagem nos países Mediterrâneos (0.03% na Grécia, 0.06% em Portugal, 0.3% em Espanha, 0.27% na Itália), e nos países de língua Inglesa como o Reino Unido e a Irlanda (0.1%; Perret *et al.*, 1997). A IA está mais desenvolvida em França (9.8%) e Islândia (4.8%), sendo a produção leiteira o objectivo dominante, correspondendo a 53% do número total de IA (Perret *et al.*, 1997). Em França, em 1995, foram inseminadas artificialmente 39% das ovelhas leiteiras (Bodin *et al.*, 1997).

Num inquérito realizado, em 1995/96 por Perret *et al.* (1997), foram identificados na Europa 36 centros de IA, dos quais 32 pertencem a entidades privadas ou a Organizações Cooperativas. Os restantes estão associados a Centros de Investigação embora possam também fornecer doses de sémen para criadores. Os

centros privados podem estar independentes ou incluídos num centro de IA para bovinos. A actividade destes centros depende das raças envolvidas e dos sistemas de produção. Assim, para a produção leiteira, a IA realiza-se sobretudo na Primavera e início do Verão, enquanto que na produção de carne pode realizar-se na Primavera, para produção fora de época, mas também no Outono, especialmente se as ovelhas são inseminadas em cio natural, como se passa, por exemplo, na Noruega (Perret *et al.*, 1997).

Em Portugal, a utilização da IA é rara tendo sido realizada quase exclusivamente a título experimental. Este facto deve-se a inexistência de centros licenciados para IA em pequenos ruminantes, particularmente na zona sul do país, (Matos *et al.*, 1997).

### **5.1. Vantagens e Inconvenientes da Inseminação Artificial**

Do ponto de vista do melhoramento genético, a aplicação da IA tem interesse nas várias etapas de execução dos respectivos programas (Foulley *et al.*, 1990). O recurso à IA permite a avaliação de reprodutores, facilitando a criação de ligações genéticas entre diferentes explorações (Foulley *et al.*, 1984) e permite a utilização mais simplificada do teste de descendência, em diferentes condições ambientais e de maneio (Hafez, 1987). Na medida em que possibilita que um mesmo carneiro seja utilizado num número maior de explorações, permite o aumento da descendência e reduz a necessidade de carneiros reprodutores, com o consequente aumento na sua intensidade de selecção (Bodin *et al.*, 1997). Actualmente, um carneiro adulto pode

fornecer mais do que 550 doses de sémen por ano (valor médio de 386 doses por carneiro no ano de 1995 em França, Bodin *et al.*, 1997).

Através da utilização da IA, consegue-se uma mais rápida valorização genética das raças, com maior ganho genético, na medida que facilita a existência de acasalamentos assortativos com maior eficiência do que em cobrição natural. Além disso, conduz a maior precisão na avaliação obtida mediante a utilização de metodologia estatística genética, correntemente adoptada em vários programas de melhoramento genético (Bodin *et al.*, 1997).

A dissociação espacial do local de produção dos gâmetas sexuais masculinos e do local onde vão ser aplicados, é um dos factores com maior interesse na IA, permitindo uma maior disseminação de material genético superior (Hafez, 1987). A manutenção dos machos reprodutores, separados e em local fixo, permite um maior controlo da parte de organizações competentes no que diz respeito à origem dos machos (sua ascendência, valor genético e performances individuais), bem como a sua utilização reprodutiva (Bodin *et al.*, 1997). Assegura-se a existência de registos seguros, aumentando a precisão de selecção e a eliminação de caracteres indesejáveis (Evans e Maxwell, 1987). Por outro lado, facilita o transporte de material genético, nomeadamente entre países que não permitem a entrada de animais (Evans e Maxwell, 1987). A conservação prolongada de sémen de animais de grande valor genético permite que o seu sémen seja utilizado após a sua morte (Evans e Maxwell, 1987).

A utilização da IA é crucial à execução de programas de conservação genética, “*in situ*” ou “*ex situ*”, para raças em vias de extinção (Schulte-Coerne,

1992) na medida em que facilita o controlo do número e tamanho das famílias (Bodin *et al.*, 1997). Permite de modo mais fácil e eficiente a aplicação de sistemas de cobrição rotacional conforme, descrito por Chevalet e Rochambeau (1979), com a divisão da população com base na matriz de parentescos, independentemente da separação das explorações (Bodin *et al.*, 1997). Se utilizada correctamente, permite ainda controlar os riscos de consanguinidade, particularmente nas trocas de material genético entre efectivos de pequena dimensão.

O desenvolvimento e aplicação da IA facilita a utilização de outras técnicas reprodutivas, como a transferência de embriões (Evans e Maxwell, 1987), e permite a implementação de trabalhos experimentais, com o objectivo da detecção de genes com importância económica (Bodin *et al.*, 1997).

Em termos de eficácia produtiva, apresenta também várias vantagens facilitando a identificação de machos inférteis, permitindo a utilização de machos incapacitados por lesões ou idade avançada e a redução do número de machos por exploração. Esta é particularmente importante na época de Primavera, onde o líbido dos machos é mais baixo e a qualidade do sémen é inferior (Bodin *et al.*, 1997).

A utilização da IA diminui os riscos sanitários, permite a sincronização de cobrições e partos, facilita o manejo e resulta num aumento da prolificidade e da produção leiteira, por antecipação dos nascimentos e da idade ao primeiro parto (Boichard *et al.*, 1984; Bodin *et al.*, 1997). Permite ainda a utilização da época de anestro sazonal e a utilização de cruzamentos com machos de raças seleccionadas para a exploração de carne (Bodin *et al.*, 1997).

Os principais inconvenientes da inseminação artificial são a necessidade de

sincronização de cios, particularmente se se efectuar no período de anestro sazonal, o que encarece obrigatoriamente esta técnica, particularmente devido à utilização de tratamentos hormonais. Do ponto de vista genético, a utilização intensiva e indiscriminada de IA pode conduzir à diminuição da variabilidade genética devido a um aumento da taxa de consanguinidade, particularmente em situações em que a intensidade de selecção praticada seja alta (Evans e Maxwell, 1987; Bodin *et al.*, 1997).

A imprecisão de acasalamentos, devido a hipotéticos erros de identificação de sémen congelado, a utilização de um macho reprodutor incorrectamente valorizado e a disseminação de doenças, se os machos não forem testados para doenças transmitissíveis através do sémen, são também factores a considerar na utilização da IA.

A taxa de fertilidade é o indicador mais preciso do sucesso de um programa de IA, com um limiar mínimo de 50% (Perret *et al.*, 1997). O acréscimo dos custos associados à execução de programas de IA parece ser o factor principal limitante à sua expansão, como refere o inquérito realizado por Perret *et al.* (1997).

## **5.2. Preparação dos Animais a Utilizar num Programa de IA**

A avaliação dos carneiros a utilizar deverá ser feita 6 a 8 semanas antes e engloba, não só uma avaliação do aparelho reprodutor e do líbido do carneiro, mas também do estado geral dos animais, já que existem inúmeras situações que podem influenciar o processo de espermatogénese (Mylne *et al.*, 1997). Na medida em que o

sémen que se obtém por colheita em vagina artificial apresenta melhores características qualitativas e quantitativas, é de extrema importância o treino prévio dos carneiros para este método de recolha, de acordo com o descrito por Evans e Maxwell (1987). O tempo necessário para este treino depende inúmeros factores tais como a estação do ano, a idade, raça e temperamento de carneiro, bem como a experiência reprodutiva prévia (Mylne *et al.*, 1997).

Em relação às fêmeas a utilizar, estas poderão ser inseminadas em cio natural ou após sincronização. A sincronização permite a inseminação de um maior número de fêmeas na mesma data e a inseminação fora da estação reprodutiva, não implicando a detecção de cios inerente à utilização de cios naturais (Mylne *et al.*, 1997).

### **5.3. Processamento do Sémen.**

Após a colheita e avaliação laboratorial do sémen, de acordo com o descrito previamente, o correcto processamento do sémen a utilizar é um dos factores mais importantes para o resultado final de um programa de IA.

#### **5.3.1. Diluição do Sémen**

A utilização de diluidores em IA é essencial, permitindo aumentar substancialmente o volume de sémen e, consequentemente, o número de ovelhas inseminadas por ejaculado. Dado que o plasma seminal confere apenas uma protecção limitada aos espermatozóides, o diluidor deverá proporcionar um ambiente

adequado à continuação das actividades metabólicas dos espermatozóides, fornecendo nutrientes como fonte de energia, impedindo alterações de pH e conferindo protecção em relação ao arrefecimento e congelação (Foote, 1974).

O intervalo entre a colheita de sémen e a sua diluição deve ser o menor possível. Deve-se sempre adicionar o diluidor ao sémen, sendo ambos mantidos em banho-maria à temperatura de 30º C (Evans e Maxwell, 1987). A diluição máxima que se pode realizar depende da concentração inicial de espermatozóides no sémen, da percentagem de espermatozóides vivos e móveis, do número de animais a inseminar e do volume e concentração de espermatozóides que se pretende utilizar na IA (Evans e Maxwell, 1987). A Tabela 1,0 adaptada de Evans e Maxwell (1987), indica os diferentes volumes bem como o número de espermatozóides (em milhões) mínimo a utilizar, de acordo com o local de inseminação e o tipo de conservação ou utilização em fresco do sémen.

| <b>Tipo de IA</b>                                 | <b>Volume de Inseminado</b>   | <b>Nº de Espermatozóides em relação ao Tipo de Sémen Utilizado</b> |                    |                  |
|---|-------------------------------|--|--------------------|------------------|
|   |                               | <b>Fresco</b>  | <b>Refrigerado</b> | <b>Congelado</b> |
| <b>Inseminação Vaginal</b>                        | 0,3-0,5 ml                    | 300  | Sem efeito         | Sem efeito       |
| <b>Inseminação Cervical</b>                       | 0,05-0,20 ml                  | 100  | 150                | 180              |
| <b>Inseminação Intra-Uterina por Laparoscopia</b> | 0,5-0,10 ml por corno uterino | 20 total nos dois cornos   | 20                 | 20               |

**Tabela 1** Volume de sémen a utilizar (ml) e nº mínimo recomendado de espermatozóides móveis (milhões) por dose de inseminação em função do local de deposição do sémen e do tipo de sémen utilizado (método de conservação). Adaptado de Evans e Maxell (1987).

Salamon (1962) constatou existir uma relação linear entre o número de espermatozóides inseminados e a taxa de nascimentos. Este autor, considerando um intervalo de 28 a 128 milhões de espermatozóides por dose aplicada, constatou que por cada 25 milhões de espermatozóides utilizados adicionalmente, a taxa de nascimentos aumentava 13%. A relação entre o número de espermatozóides inseminados e a subsequente fertilidade, é frequentemente descrita de acordo com um modelo assimptótico, ou seja, a fertilidade aumenta linearmente quando o número de espermatozóides aumenta a partir de um valor baixo. Quando o nível de fertilidade atinge um valor máximo, a curva que relaciona o número de espermatozóides com a taxa de fertilidade atinge um *plateau*. A partir deste não se consegue qualquer aumento de fertilidade, mesmo que se incremente o número de espermatozóides inseminados.

A escolha do diluidor a utilizar num programa de IA depende fundamentalmente do método de conservação do sémen. Assim, os mais frequentemente utilizados têm por base o leite e podem ser utilizados para IA com sémen fresco ou refrigerado (Maxwell e Salamon, 1993).

Quando o recurso à IA incluir a utilização de sémen congelado, os diluidores utilizam o tampão citrato e os monossacáridos arabinose, frutose, glucose. A utilização destes monossacáridos permite compensar, durante a congelação, a diminuição da osmolaridade resultante da adição do glicerol, utilizado como crioprotectante. O sémen de carneiro pode tolerar uma concentração dupla de glucose, em relação ao nível isotônico, em virtude deste monossacárido ter a capacidade, ao contrário dos dissacáridos, de atravessar a membrana celular dos

espermatozóides (Zhuravlj, 1982 cit. por Salamon e Maxwell, 1995a). Outros diluidores utilizam como fonte energética trissacáridos como a lactose, sacarose e rafinose. A sacarose tem sido utilizada como o componente principal dos diluentes sintéticos, porque se verificou conferir uma melhor protecção da integridade do acrossoma do que a glucose, frutose ou lactose (Milovanov e Sokolovskaja, 1980; Marinov *et al.*, 1976a cits. por Salamon e Maxwell, 1995b).

Estudos *in vitro*, utilizando diluidores baseados em tampões orgânicos como o como o Tryladil<sup>R</sup> (cujo tampão é tris-tris(hidroximetil)aminometano), provaram ser tanto ou mais eficazes na congelação de sémen do que diluidores utilizando lactose e gema de ovo (Petrujic *et al.*, 1987; Danov *et al.*, 1983). A adição de 2% de albumina sérica bovina ao Tryladil<sup>R</sup> aumenta o seu efeito protector da integridade do acrossoma (Molova, 1983 cit. por Salamon e Maxwell, 1995a). No entanto, após inseminação com sémen congelado, a taxa de concepção foi melhor quando o meio utilizado foi um meio baseado em sacarose (Marinov *et al.*, 1983 cit. por Salamon e Maxwell, 1995a).

A incorporação de agentes crioprotectores nos diluidores de sémen permite aumentar a fertilidade do sémen refrigerado ou congelado. O glicerol tem sido o agente crioprotector mais utilizado na conservação do sémen desde que foi demonstrada a sua eficácia por Polgue *et al.* (1949). O nível de glicerol a incluir em diluentes para congelação de sémen é limitado pela sua toxicidade (Fahy, 1986). Esta está dependente da velocidade de arrefecimento e congelação, da composição do diluidor e do método de adição do glicerol (Salamon e Maxwell, 1995a).

A inclusão de gema de ovo é importante na crioprotecção a temperaturas da

ordem dos 0º C (Maxwell e Salamon, 1993). Tem-se verificado que a sua utilização também confere protecção aos espermatozóides aquando da diluição e durante o processo de congelação e descongelação. Tem sido proposto que a protecção que se verifica, pela adição de gema de ovo, no processo de congelação se deve à ligação desta às membranas plasmáticas (Watson, 1975).

Têm sido estudados uma série de outros agentes crioprotectores, não existindo até ao momento nenhum que tenha provado ser mais eficaz que o glicerol. São exemplo o dimetilsulfoxido (DMSO), o etileno glicol, a albumina e a polivinilpirrolidona (Salamon e Maxwell, 1995a).

### **5.3.2. Conservação de Sêmen**

O principal objectivo de qualquer processo de conservação de sémen é o de prolongar a sua capacidade de fertilizar reduzindo ou cessando a sua motilidade e reacções metabólicas (Evans e Maxwell, 1987).

A baixa fertilidade de sémen conservado em relação ao sémen fresco, deve-se, em parte, à redução da proporção de células móveis em consequência do processo de arrefecimento, congelação e descongelação (Maxwell e Watson, 1996). Verifica-se no entanto que, a viabilidade dos espermatozóides, quando avaliada pela sua motilidade, se mantém por mais tempo do que a sua capacidade de fertilização. De acordo com Watson (1995), as alterações que se verificam na membrana dos espermatozóides, durante o processo de conservação, apesar de não alterarem a sua motilidade, podem tornar as células incapazes de fertilização devido a alterarem o

processo normal de capacitação. Este autor sugere que, apesar da criopreservação suspender temporariamente as alterações contínuas nos espermatozóides, o estado evolutivo aquando da descongelação não é o inicial. Os espermatozóides apresentam alterações semelhantes às que se observam na capacitação, o que significa que ultrapassam esse estado evolutivo. É o processo de arrefecimento e aquecimento, mais do que qualquer alteração relacionada com a formação de gelo, que provoca estas alterações, verificando-se que o arrefecimento até 0 a 4º C também provoca este efeito (Fuller *et al.*, 1994; Watson, 1996 cit. por Maxwell e Watson, 1996).

A membrana plasmática dos espermatozóides é rica em ácidos gordos insaturados sendo susceptível a reacções de peroxidação. Espermatozóides com funcionamento normal produzem níveis baixos de substâncias reactivas com o oxigénio (Jones *et al.*, 1979). A acumulação de quantidades moderadas de substâncias reactivas com o oxigénio, pode estar associada ao processo normal de maturação dos espermatozóides que conduz à capacitação e reacção do acrossoma (Bize *et al.*, 1991). No entanto, se em excesso, inibem a motilidade e capacidade de fertilização. Este excesso pode estar também associado à redução de motilidade e capacidade de fertilização que se observa em sémen conservado, podendo melhorar-se estas características pela adição de antioxidantes aos diluentes de sémen (Sotojanov *et al.*, 1994).

Considera-se refrigerado o sémen diluído sujeito a arrefecimento de 30º C (temperatura a que se efectua a diluição) até 15º C, ou mais frequentemente até 5º C, mantendo-se esta temperatura até ao momento de ser utilizado. O sémen é colocado em palhinhas de 0,25 ml ou 0,50 ml, arrefecendo-se num frigorífico ou num

recipiente com gelo ou água fria (Evans e Maxwell, 1987). Deve evitarse o arrefecimento rápido do sémen de 18º C para 5º C, uma vez que é neste intervalo que os espermatozóides são mais sensíveis ao choque pelo frio. Quando o sémen é conservado a 5º C, é importante que seja mantida essa temperatura durante todo o período de conservação, na medida em que temperaturas acima desta não inibem suficientemente a motilidade e metabolismo dos espermatozóides. Por outro lado, temperaturas abaixo de 0º C podem ser fatais (Evans e Maxwell, 1987).

A viabilidade do sémen conservado a 15º C é menor do que a 5º C. Assim, sémen conservado a 15º C deve ser utilizado para inseminação cervical num período máximo de 6 a 12 horas de conservação, enquanto que a conservação a 5º C permite a utilização por um período de 24 horas em ovelhas (Evans e Maxwell, 1987). A utilização de inseminação intra-uterina, permite admitir a utilização de sémen refrigerado a 5º C até 6 dias de conservação (Evans e Maxwell, 1987).

O sémen congelado é mantido a temperaturas muito baixas (nitrogénio líquido a -196º C) e as reacções metabólicas dos espermatozóides param completamente, o que torna possível perservar o sémen por períodos de tempo mais prolongados. A congelação pode ser efectuada ou utilizando gelo seco (dióxido de carbono sólido a -79º C) ou azoto líquido (- 196º C) utilizando palhinhas de congelação (Evans e Maxwell, 1987). O método de descongelação depende do processo de congelação utilizado, embora de um modo geral, quanto mais rápido for o processo de congelação mais rápido deverá ser o de descongelação.

## **5.4. Técnicas de Inseminação**

No que diz respeito ao local onde é depositado o sémen, podem considerar-se várias técnicas de IA, nomeadamente a vaginal, a cervical, a transcervical e a intrauterina.

### **5.4.1. Inseminação Vaginal**

A inseminação vaginal é uma técnica frequentemente referida como “tiro no escuro” e consiste na deposição do sémen na vagina, o mais profundamente possível mas sem qualquer tentativa de localização do cérvix (Mylne *et al.*, 1997). É utilizada geralmente para sémen fresco diluído. Um programa de IA utilizando a inseminação vaginal, se bem conduzido, poderá resultar em taxas de concepção da ordem dos 60% com sémen fresco, não ultrapassando no entanto os 40% com sémen congelado (Buckrell *et al.*, 1991). No entanto, para se atingirem estes valores de fertilidade será necessária a utilização de um número elevado de espermatozoides, frequentemente excedendo os 500 milhões (Buckrell *et al.*, 1991).

### **5.4.2. Inseminação Cervical**

Na inseminação cervical o sémen é depositado dentro do cérvix o mais profundamente possível (Mylne *et al.*, 1997). A IA cervical com sémen fresco é a técnica mais utilizada uma vez que é uma técnica de aplicação fácil e rápida, com custos relativamente baixos e que permite a obtenção de resultados satisfatórios (Bodin *et al.*, 1997). Em França, 99% das inseminações realizadas são efectuadas por

via cervical com taxas de fertilidade média com sémen fresco de cerca de 65% (Bodin *et al.*, 1997).

As baixas taxas de fertilidade obtidas com sémen congelado, após inseminação cervical, limitaram durante muito tempo a utilização de sémen congelado em ovinos. O aumento da concentração de espermatozóides, quer utilizando uma diluição baixa antes da congelação, quer reconcentrando após descongelação por centrifugação ou filtração, permite melhorar os resultados de fertilidade obtidos (Evans e Maxwell, 1987, Salamon e Maxwell, 1995b). Outra opção é a inseminação dupla, que, no entanto, apresenta resultados contraditórios. Alguns autores referem uma melhoria significativa na prolificidade após inseminação dupla, quando o nº de espermatozóides depositados é o dobro do que com uma inseminação singular (Salamon e Maxwell, 1995b). Os resultados de prolificidade revelaram-se similares quando o nº de espermatozóides é o mesmo, com uma inseminação singular ou inseminação dupla, dentro do intervalo de tempo óptimo de 12 a 24 horas após detecção do estro. Assim, o nº de espermatozóides inseminados revelou-se mais importante do que o facto de se tratar de uma inseminação dupla ou singular (Salamon, 1977).

A fertilidade obtida por inseminação cervical, com sémen congelado, aumenta de acordo com o grau de profundidade a que é depositado o sémen, permitindo uma diminuição do nº de espermatozóides móveis por dose aplicada (até 20 a 40 milhões). Baseado em dados da literatura, Milovanov *et al.* (1978) cit. por Salamon e Maxwell (1995b) indicam a seguinte fórmula para predição dos nascimentos em relação à profundidade da inseminação:  $F = 30 + 12,5p$  (onde F representa a % de

nascimentos e p a profundidade da inseminação). A utilização de oxitocina, PGF<sub>2α</sub> ou choque eléctrico numa tentativa de facilitar o transporte através do cérvix por contracções uterinas, não se revelaram eficazes, bem como o uso de relaxina ou cocaína para facilitar a penetração mais profunda no cérvix (Evans e Maxwell, 1987).

#### **5.4.3. Inseminação Transcervical**

A técnica de inseminação transcervical baseia-se na localização, retracção e estabilização do cérvix de modo a permitir a penetração intra-uterina, com o auxílio de um instrumento de inseminação especialmente desenhado para o efeito (Halbert *et al.*, 1990a; Guelph System for Transcervical Artificial Insemination; GST-AI). De acordo com estes autores, esta técnica pode ser utilizada em programas comerciais de IA com resultados semelhantes aos obtidos com a inseminação intra-uterina por laparoscopia, com taxas de fertilidade de 70%. Factores como a idade e tamanho da ovelha, a estação reprodutiva e o intervalo desde o último parto condicionam o sucesso desta técnica (Halbert *et al.*, 1990b). O método de sincronização utilizado, (progesterónios ou prostaglandina) não parece afectar a taxa de penetração uterina.

#### **5.4.4. Inseminação Intra-Uterina por Laparoscopia**

Esta técnica consiste na deposição de pequenas quantidades de sémen directamente nos cornos uterinos via laparoscopia (Keisler, 1991; Mylne *et al.*, 1997). Embora seja uma intervenção cirúrgica, que requer material sofisticado e mão de obra especializada, permite no entanto obter resultados bastante satisfatórios. Esta técnica

permite obter taxas de concepção tão elevadas como 75% com sémen congelado. Estes valores são significativamente superiores aos 30% ou menos, que se obtêm quando o sémen é depositado na vagina ou entrada do cérvix (Buckrell *et al.*, 1991).

A aplicação do sémen nos dois cornos uterinos permite obter taxas de fertilidade mais elevadas comparativamente à inseminação num único corno (Killen *et al.*, 1982 cit. por Findlater, 1991).

### **5.5. Momento Óptimo para a Inseminação**

Qualquer que seja a técnica considerada, a determinação exacta do momento da ovulação é crucial para o sucesso da inseminação, já que o óvulo tem uma duração de vida fértil muito curta (12 a 24 horas segundo Evans e Maxwell, 1987). Assim, o objectivo será o de que o espermatozóide atinja o oviducto no momento em que aí exista um óvulo viável. A opção por um determinado método de sincronização ou a utilização de cio natural, a técnica de inseminação utilizada e o tipo de sémen aplicado (fresco ou conservado), influenciam a escolha do momento óptimo para a IA (Mylnes *et al.*, 1997). Na inseminação de ovelhas em cio natural utiliza-se a principalmente a inseminação vaginal e cervical, a qual deverá ser praticada 12 a 18 horas após o início do cio. Assume-se que o número máximo de espermatozóides pode ser encontrado no oviducto 12 a 24 horas após a inseminação cervical (Evans e Maxwell, 1987).

Em programas de IA com recurso à sincronização, a detecção de cios não é indispensável, realizando-se a IA em tempo fixo. Assim, a inseminação cervical

deverá ocorrer 48 a 60 horas após remoção das esponjas de progestagénios, referindo a maioria dos autores como momento óptimo para a inseminação as 55 horas para uma única inseminação e 48 e 60 horas quando se utiliza inseminação dupla (Buckrell *et al.*, 1991). Quando se utilizam prostaglandinas, a IA deverá processar-se 72 a 96 horas após a administração das mesmas (Buckrell *et al.*, 1991). De acordo com Evans e Maxweel (1987), a inseminação intra-uterina por laparoscopia com sémen congelado deverá efectuar-se 60 a 66 horas após a remoção do progestagénio. Em fêmeas superovuladas, o intervalo entre a remoção do progestagénio e a inseminação deverá ser de 36 a 48 horas, para sémen fresco, e de 44 a 48 horas para sémen congelado.

A utilização repetida de tratamentos de sincronização, com esponjas de FGA e PMSG, origina a produção de anticorpos anti-PMSG. Tal altera o momento da onda pré-ovulatória de LH e consequentemente o momento da ovulação. Assim, a IA efectuada às 55 horas pode, nesta situação, não respeitar os tempos mínimos para a fertilização, resultando em baixas taxa fertilidade e prolificidade (Bodin *et al.*, 1997).

Apesar da exposição a machos vasectomizados para detecção de cios não ser geralmente usada em programas de IA, em que se aplicaram tratamentos de sincronização, a sua utilização pode ser vantajosa. Isto porque a exposição ao macho induz maior sincronia de ovulação e assegura que apenas as fêmeas em cio vão ser inseminadas, resultando em taxas de fertilidade superiores.

### **III Procedimento Experimental**

#### **Estudo 1. Utilização da Inseminação Artificial em Ovelhas Merino Branco, Merino Preto e Campanço**

##### **Resumo**

O objectivo deste estudo foi avaliar a eficácia da técnica da inseminação artificial (IA) em ovelhas das raças Merino Branco (**MB**; n = 97), Merino Preto (**MP**; n = 128) e Campança (**C**; n = 175), durante a Primavera. Para estudar a fertilidade nas diversas raças foram considerados os seguintes factores: idade da ovelha, condição corporal, tipo de inseminação (cervical ou vaginal), diluidor (Laiciphos ou Triladil<sup>R</sup>), tipo de sémen (fresco ou refrigerado) e concentração por dose de sémen. A fertilidade variou consoante a concentração por dose de sémen na raça **MB** (32.6% ± 7.2 e 54.9% ± 6.9; P<0.05) e na **MP** (35.0% ± 6.4 e 54.4% ± 6.0; P<0.05). Na raça **C** a fertilidade foi significativamente afectada pelo tipo de sémen (36.6% ± 3.9 vs 15.4% ± 8.0; P<0.01) e pela concentração por dose de sémen (18.5% ± 5.6 vs 33.5% ± 5.7; P<0.05). Os resultados deste estudo sugerem que o sucesso da IA está dependente dose de sémen aplicada e do facto de se utilizar sémen fresco ou refrigerado. As taxas de fertilidade observadas foram inferiores às obtidas em anos anteriores neste mesmo Centro, o que poderá estar relacionado com a manipulação excessiva do sémen utilizado, inerente à multiplicidade dos factores estudados.

**Palavras Chave:** Inseminação Artificial, Ovinos, Fertilidade, Prolificidade, Concentração, Sémen.

## **Introdução**

A técnica da inseminação artificial tem vindo a ser desenvolvida comercialmente desde a década de 70. Actualmente, na Europa podem observar-se três grupos com diferentes graus de aplicação desta técnica: a França com cerca de 773 000 ovelhas inseminadas anualmente, a Noruega, a Itália, o Reino Unido e a Espanha com 10 000 a 40 000 ovelhas e os restantes países com menos de 10 000 ovelhas inseminadas, geralmente associadas a situações experimentais (Perret *et al.*, 1997). Portugal insere-se neste último grupo, sendo o recurso à IA limitado quase exclusivamente a título experimental.

A existência actual de programas de melhoramento e conservação genética para as raças autóctones nacionais, implica um conhecimento mais aprofundado da técnica de IA, considerada indispensável para a execução destes programas (Foulley *et al.*, 1990; Schulte-Coerne, 1992). O Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Herdade da Abóbada, tem vindo a desenvolver estudos neste âmbito, tendo obtido resultados algo encorajadores (Bettencourt *et al.*, 1996).

Neste estudo procurámos avaliar a eficácia da IA durante a Primavera, em ovelhas das raças ovinas nacionais Merina Branca (**MB**), Merina Preta (**MP**) e Campaniça (**C**) considerando alguns factores que poderão influenciar o sucesso da sua aplicação. Assim, avaliámos o impacto de diferentes doses de sémen, do tipo de diluidor e do tempo de conservação na fertilidade obtida por IA nas raças consideradas.

## **Materiais e Métodos**

Este estudo foi realizado na Primavera (Março/Abril de 1996), na Herdade da Abóbada, Serpa (Latitude 38° N e Longitude 2° W).

Animais. Foram inseminadas ovelhas das raças **MB** (n=97), **MP** (n=128) e **C** (n=175), pertencentes aos efectivos do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, localizados nas Herdades da Abóbada e Vale Formoso. Utilizaram-se 6 carneiros da raça **MB**, 4 da raça **MP** e 7 da raça **C**.

Maneio Alimentar e Sanitário. Os animais foram mantidos em regime de pastoreio extensivo durante os meses de Primavera em pastagens de boa qualidade, naturais ou semeadas, e posteriormente, durante o Verão, em restolhos de cereais e girassol. Um mês antes do início da época de partos foram suplementados com concentrados (aproximadamente 350 gr/animal/dia) mantendo-se esta suplementação durante todo o período de partos. Três semanas antes da IA e da época de partos, todas as ovelhas foram tratadas contra parasitas gastrointestinais e pulmonares e vacinados contra Enterotoxémias e Pasteurelose.

Programa de Inseminação. O programa de IA consistiu na sincronização e indução de cios e ovulação, através da aplicação de esponjas vaginais impregnadas com 30 mg de Acetato de Fluorogestona (FGA), mantidas durante 12 dias, seguida da administração de PMSG (500 a 600 Unidades Internacionais) no dia da retirada das esponjas. A inseminação realizou-se, sempre que possível, por via cervical com sémen fresco, 50 a 60 horas após a retirada das esponjas (Evans e Maxwell, 1987). A inseminação foi considerada vaginal ou cervical, consoante se verificou ou não refluxo de sémen no fundo vaginal, no momento da sua aplicação. O sémen utilizado

foi recolhido por vagina artificial, em machos previamente treinados, sendo posteriormente avaliado em relação ao volume, côr, cheiro e consistência, mobilidade massal e concentração. Optou-se por diluir o sémen nos diluidores Laiciphos e Triladil<sup>R</sup>, em diluições fixas (1:2, 1:3 e 1:6), com o objectivo de obter o máximo de variação nas doses individuais de sémen aplicadas. Foram considerados dois intervalos de tempo entre a colheita e a aplicação do sémen: ou o mais precocemente possível após a recolha (fresco) ou após um período de aproximadamente 3 horas a 5ºC (refrigerado). Para todas as raças, e dependendo da data da IA, foram introduzidos carneiros férteis 15 dias após a IA.

Registo de Dados. Os registos referentes ao período de IA incluiram a idade da ovelha, o seu peso e condição corporal, o tipo de inseminação (cervical ou vaginal), o carneiro utilizado, a concentração da dose de sémen utilizada, o diluidor e o tipo de sémen. No período de partos foi registado a data de parto, tipo de parto (simples=1 ou duplo=2), o peso e condição corporal da mãe e o peso do borrego.

Análise Estatística. A fertilidade em cada raça foi avaliada através da análise de variância, utilizando o procedimento GLM (SAS, 1985). Os modelos iniciais para as diversas raças continham todos os factores (Tabela 1.1.). Posteriormente, os factores considerados que não se revelaram estatisticamente significativos ( $P<0.05$ ) foram excluídos do modelo. O modelo final para as raças **MB** e **MP** continha apenas o efeito da dose de sémen e para a raça **C**, para além deste efeito, o tipo de sémen (fresco vs. refrigerado). Em relação à concentração por dose de sémen (milhões de espermatozóides), e de acordo com a distribuição das observações para cada raça, consideraram-se duas classes assumindo como critério a mediana de cada distribuição

(292 na raça **MB**; 254 na raça **MP** e 221 na raça **C**). Os valores da concentração por dose de sémen variaram entre 192 e 583 milhões, entre 58 e 581 milhões e entre 97.5 e 508 milhões, respectivamente para as raças **MB**, **MP** e **C**.

| Efeitos                    | Merina Branca | Merina Preta | Campaniça |
|----------------------------|---------------|--------------|-----------|
| <b>Idade da Ovelha</b>     | √             | √            | √         |
| <b>Condição Corporal</b>   | √             | √            | √         |
| <b>Tipo de Inseminação</b> | √             | √            | √         |
| <b>Diluidor</b>            | --            | √            | √         |
| <b>Tipo de Sémen</b>       | --            | --           | √         |
| <b>Dose de Sémen</b>       | √             | √            | √         |

**Tabela 1.1.** Efeitos inicialmente considerados para avaliar a fertilidade à IA nas raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça.

## Resultados

Os resultados da análise de variância, assim como os valores de taxas de fertilidade obtidos encontram-se nas Tabelas 1.2. e 1.3., respectivamente. A fertilidade global obtida foi de 44.3% para a raça **MB**, 45.3% para a **MP** e 32.6% para a **C**. Verificou-se, para todas as raças, que uma das fontes de variação mais importante foi a concentração por dose de sémen aplicada. A fertilidade obtida, em função das categorias de concentração por dose de sémen definidas, foi de 32.6% ± 7.2 e 54.9% ± 6.9 para a raça **MB** ( $P<0.05$ ), de 35.0% ± 6.4 e 54.4% ± 6.0 para a raça **MP** ( $P<0.05$ ) e de 18.5% ± 5.6 e 33.5% ± 5.7 para a raça **C** ( $P<0.05$ ). Para esta última raça, a fertilidade foi também significativamente afectada pelo tipo de sémen

(fresco ou refrigerado) utilizado ( $36.6\% \pm 3.9$  e  $15.4\% \pm 8.0$ , respectivamente;  $P<0.05$ ). Nenhum dos restantes factores considerados (idade da ovelha, condição corporal, tipo de inseminação e diluidor) afectaram significativamente as taxas de fertilidade observadas ( $P<0.05$ ). A prolificidade média (Tabela 1.4.) à IA foi de  $1.44 \pm .7$ ,  $1.26 \pm .06$  e  $1.56 \pm .09$  para as raças **MB**, **MP** e **C**, respectivamente.

| <b>Fontes de Variação</b> | <b><u>Merina Branca</u></b> |          | <b><u>Merina Preta</u></b> |          | <b><u>Campança</u></b> |          |
|---------------------------|-----------------------------|----------|----------------------------|----------|------------------------|----------|
|                           | <b>g.l.</b>                 | <b>F</b> | <b>g.l.</b>                | <b>F</b> | <b>g.l.</b>            | <b>F</b> |
| <b>Dose de Sêmen</b>      | 1                           | 5.02 *   | 1                          | 4.96 *   | 1                      | 4.7 *    |
| <b>Tipo de Sêmen</b>      | --                          | --       | --                         | --       | 1                      | 5.74 *   |
| <b>Resíduo</b>            | 95                          |          | 126                        |          | 172                    |          |
| <b>R<sup>2</sup> (%)</b>  |                             | 5.02     |                            | 3.79     |                        | 5.78     |
| <b>C.V. (%)</b>           |                             | 110.36   |                            | 108.61   |                        | 140.87   |

\* $P<0.05$

**Tabela 1.2.** Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação (**R<sup>2</sup>**) e coeficientes de variação (**C.V.**) para a fertilidade à IA na raças Merina Branca, Merina Preta e Campança.

| <b>Factor</b>        | <b>Merina Branca</b> |                                      | <b>Merina Preta</b> |                                      | <b>Campaniça</b> |                                      |
|----------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|
|                      | <b>n</b>             | <b>(<math>\bar{X} \pm EP</math>)</b> | <b>n</b>            | <b>(<math>\bar{X} \pm EP</math>)</b> | <b>n</b>         | <b>(<math>\bar{X} \pm EP</math>)</b> |
| <b>Dose de Sêmen</b> |                      |                                      |                     |                                      |                  |                                      |
| <b>Dose 1</b>        | 46                   | 32.61 ± 7.21 <sup>a</sup>            | 60                  | 35.00 ± 6.35 <sup>a</sup>            | 88               | 18.48 ± 5.60 <sup>a</sup>            |
| <b>Dose 2</b>        | 51                   | 54.90 ± 6.85 <sup>b</sup>            | 68                  | 54.41 ± 5.97 <sup>b</sup>            | 87               | 33.52 ± 5.66 <sup>b</sup>            |
| <b>Tipo de Sêmen</b> |                      |                                      |                     |                                      |                  |                                      |
| <b>Fresco</b>        | --                   | --                                   | --                  | --                                   | 142              | 36.62 ± 3.85 <sup>a</sup>            |
| <b>Refrigerado</b>   | --                   | --                                   | --                  | --                                   | 33               | 15.38 ± 7.99 <sup>b</sup>            |

Para cada raça e factor, médias com diferentes letras do alfabetos diferem ( $P < 0.05$ )  
Dose de Sêmen: **Merina Branca:** 1 < 292 milhões de espermatozóides; 2 ≥ 292 milhões de espermatozóides. **Merina Preta:** 1 < 254 milhões de espermatozóides; 2 ≥ 254 milhões de espermatozóides. **Campaniça:** 1 ≤ 221 milhões de espermatozóides; 2 > 221 milhões de espermatozóides.

**Tabela 1.3.** Médias Marginais ± Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n º de observações (n) para a fertilidade à IA (%) e para cada raça de acordo com os factores incluídos nos respectivos modelos de análise.

| <b>Raça</b>          | <b>Prolifidade IA</b> | <b>Prolifidade Cobrição com o Carneiro</b> | <b>Prolifidade Global</b> |
|----------------------|-----------------------|--|---------------------------|
|                      |                       |  |                           |
| <b>Merina Branca</b> | 1.44 (0.07)           | 1.16 (0.06)                                | 1.31 (0.05)               |
| <b>Merina Preta</b>  | 1.26 (0.06)           | 1.18 (0.06)                                | 1.22 (0.04)               |
| <b>Campaniça</b>     | 1.56 (0.09)           | 1.16 (0.04)                                | 1.32 (0.05)               |

**Tabela 1.4.** Prolifidade Média (Erro Padrão) após Inseminação Artificial, Cobrição pelo Carneiro e Prolifidade Média Global para as Raças Merina Branca, Merina Preta e Campaniça.

## **Discussão**

O objectivo de determinar a influência de vários factores na eficácia da IA em algumas raças ovinas autóctones, implicou uma manipulação excessiva do sémen utilizado. Este facto poderá de certo modo estar na origem dos baixos valores fertilidade, comparativamente aos descritos na bibliografia e aos obtidos em anos anteriores neste Centro. Bettencourt *et al.* (1996), referem taxas de fertilidade de 57.6%, 66.7% e 65% para ovelhas das raças **MB**, **MP** e **C**, respectivamente.

A fertilidade mais elevada neste estudo, atendendo às classes consideradas, obteve-se para concentrações por dose de sémen iguais ou superiores a 292, 254 e 221 milhões de espermatozóides, respectivamente para as raças **MB**, **MP** e **C**. Estes resultados não se afastam muito das doses de sémen recomendadas por Evans e Maxwell (1987) e que são de 100 milhões para inseminação cervical com sémen fresco e de 300 milhões para inseminação vaginal ou inseminação cervical com sémen refrigerado.

Na raça **C**, a fertilidade foi também significativamente afectada pelo tipo de sémen, com valores significativamente superiores quando se utilizou sémen fresco. Muito provavelmente, e tendo em vista os resultados obtidos, a temperatura de refrigeração adoptada neste estudo, atendendo ao intervalo de tempo considerado (3 horas), não se justifica em termos práticos. À semelhança do que é praticado em França, Bodin *et al.* (1997) referem que durante um intervalo de tempo curto entre a colheita de sémen e a sua aplicação, talvez seja aconselhável manter o sémen a uma temperatura de 15° C. Keisler (1991) refere que amostras de sémen conservadas a esta temperatura, mantêm capacidade de fertilização por um período de 12 a 24 horas.

O processo de arrefecimento e aquecimento, mais do que qualquer alteração relacionada com a formação de gelo, poderá provocar alterações no estado evolutivo dos espermatozóides semelhantes às que se observam durante o processo de capacitação, ultrapassando assim esse estado evolutivo (Fuller *et al.* 1994; Watson, 1996 cit. por Maxwell e Watson, 1996).

A fertilidade global do rebanho não foi comprometida uma vez que, duas semanas após a IA, foram introduzidos carneiros férteis no rebanho para um período de cobrição natural. No entanto, a utilização da IA permitiu o registo de 40 a 50% das paternidades, factor indispensável à execução de programas de conservação e melhoramento genético.

A prolificidade resultante da IA foi superior à que se obtém de cobrição natural. Tal diferença é fundamentalmente resultante da administração de PMSG utilizada no programa de indução e sincronização de cios e ovulação. Este aumento artificial da prolificidade, ao aumentar o nº de descendentes por ovelha e por carneiro, permite aumentar a intensidade de selecção.

O facto de nenhum dos restantes factores considerados, nomeadamente o tipo de inseminação, idade e condição corporal das ovelhas e o diluidor, ter afectado significativamente a fertilidade, não é de todo surpreendente, na medida em que a maioria das inseminações foram efectuadas cervicalmente, a quase totalidade das ovelhas tinham idades compreendidas entre os 3 e os 5 anos e encontravam-se em boa condição corporal (3-3.5) e ambos os diluidores utilizados terem sido amplamente testados com sucesso em programas de inseminação artificial.

## **Conclusões**

Os resultados deste estudo sugerem que o sucesso da inseminação artificial está condicionado pela dose de sémen aplicada e do facto de se utilizar sémen fresco ou refrigerado. As taxas de fertilidade observadas foram inferiores às obtidas em anos anteriores neste mesmo Centro. Tal facto poderá ser devido à manipulação excessiva do sémen utilizado, inerente à multiplicidade dos factores estudados. A inseminação artificial com sémen fresco na Primavera em ovelhas de raças autóctones do Sul de Portugal perfila-se como uma técnica reprodutiva alternativa, e a sua utilização deverá ser expandida, tendo em vista os programas de conservação e melhoramento genético dessas populações.

## **Referências Bibliográficas:**

- Bettencourt, C.M.V., Gonçalves, C., Simões, J.P.C. e Matos, C.A.P. (1996). Utilização potencial da inseminação artificial em raças ovinas autóctones. Resumo das comunicações do VI Congresso de Zootecnia, Évora, pp. 24.
- Bodin, L., Anio, Algo. (1997). Use of artificial insemination in sheep production and genetics. 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 25-28 August. Vienna, Austria.
- Evans, G. e Maxwell, W.M.C. (1987). Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth & (Publishers) Lda., 88 Kingsway, London, UK.
- Foulley, J.L., Bouix, J., Goffinet, B. e Elsen, J.M. (1990). Connectedness in genetic evaluation. Advances in Statistical Methods for Genetic Improvement of Livestock Springer Verlag, 277-308. Gianola, D. and Hammond, K. (Eds). London, UK.

- Fuller, L.R., Wood, M.J., Whittingham, D.G. e Watson, P.F. (1994). Cooling mouse sperm to 4° does not affect fertilization or embryonic development. Abstr. Nº 16. J. Reprod. Fertil., Abstr. Ser. 14: 8.
- Keisler, D.H. (1991). Sheep Reproductive Management and Artificial Insemination Clinic. June 25 and 26, Columbia Missouri. University of Missouri-Columbia, Licon University, Missouri Sheep Merchandizing Council, Missouri Sheep Producers.
- Maxwell, W.M.C. e Watson, P.F. (1996). Recent progress in the perservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci., 42: 55-65.
- Perret, G., Brice, G. e Folch, J. (1997) Review of AI use and Limiting Factors in Small Ruminants in Europe. 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 25-28 August. Vienna, Austria.
- SAS (1985). User's Guide: Statistics (version 5 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schulte-Coerne, H. (1992). Forms of preservation. Proceedings of a CEC Workshop and Training Course. Data Collection, Conservation and Use of Farm Animal Genetic Resources, December 7-9. Institute of Animal Breeding and Genetics, School of Veterinary Science, Hannover, Germany.

## **Estudo 2. Avaliação da Eficácia de Sistemas de Maneio Reprodutivo em Ovelhas Merino Branco e Merino Preto no Período de Cobrição de Primavera**

### **Resumo**

Neste estudo foi avaliada a eficácia de vários sistemas de maneio reprodutivo na época de cobrição de Primavera em ovelhas Merino Branco (**MB**) e Merino Preto (**MP**) pertencentes aos rebanhos da Herdade da Abóbada (Lat. 38° N; Long. 2° W). Dentro de cada raça, os animais foram distribuídos aleatoriamente por quatro grupos. As ovelhas foram ou pré-expostas a carneiros vasectomizados durante 15 dias (grupo **EM**; **MB**, n = 54; **MP**, n = 64), ou pré-tratadas com progestagénios durante os 12 dias que antecederam a introdução de carneiros férteis (grupo **AP**; **MB**, n = 75; **MP**, n = 55). Noutro grupo foi efectuada a sincronização de cios (progestagénio + PMSG) seguida de inseminação artificial, sendo as ovelhas posteriormente (15 dias) expostas a carneiros férteis (grupo **IN**; **MB**, n = 71; **MP**, n = 52). Finalmente, definiu-se um grupo controlo em que se utilizou a cobrição natural (**CN**; **MB**, n = 53; **MP**, n = 58). A fertilidade e a prolificidade foram avaliadas através de análise de variância considerando os efeitos do grupo, raça e idade da ovelha. A produtividade foi avaliada em Kg de borrego desmamado por ovelha exposta à cobrição (**P1**) e em Kg de borrego desmamado por ovelha parida (**P2**). Na análise de variância foram incluídos os efeitos do grupo e raça (**P1**) e do grupo, raça e tipo de parto (**P2**). A fertilidade global obtida foi de 86% não se verificando diferenças significativas entre grupos. A fertilidade da raça **MP** ( $89.4\% \pm 2.5$ ) foi significativamente superior ( $P<0.05$ ) à da raça **MB** ( $82.8\% \pm 2.2$ ). Para a

prolificidade, o único factor significativo ( $P<0.001$ ) foi a idade da ovelha. Ovelhas com idades  $\geq 6$  anos apresentaram prolificidade superior ( $1.44 \pm .05$ ) a ovelhas com 3 ( $1.18 \pm .04$ ), 4 ( $1.29 \pm .06$ ) ou 5 anos ( $1.35 \pm .04$ ). A produtividade global **P1** foi de 26.8 Kg e não foi afectada por nenhum dos factores considerados. Todos os factores afectaram significativamente a **P2** ( $P<0.05$ ). O sistema de maneio reprodutivo que resultou em maior **P2** foi o pré-tratamento com progestagénios ( $36.45$  Kg  $\pm 1.03$ ) comparativamente à **CN** ( $32.56$  Kg  $\pm 1.05$ ) ou ao grupo **EM** ( $33.32$  Kg  $\pm 1.04$ ). A **P2** obtida no grupo de **IN** ( $35.46$  Kg  $\pm 1.04$ ) foi superior à observada nas ovelhas sujeitas à **CN** ( $P<0.05$ ). Os resultados globais demonstram que, a utilização de qualquer destes sistemas de maneio reprodutivo, permite a obtenção de taxas de fertilidade elevadas na época de cobrição de Primavera. As ovelhas pré-expostas ao macho ou submetidas a tratamentos hormonais apresentaram produtividade global superior, resultante dum a antecipação e maior concentração de partos, comparativamente às ovelhas do grupo controlo.

**Palavras Chave:** Efeito Macho, Inseminação Artificial, Progestagénios, Raça Merina

## **Introdução**

Devido a condicionalismos de mercado, a maioria dos criadores de ovinos no Sul de Portugal utiliza preferencialmente a época de cobrição de Primavera (Abril a Junho), seguida de um segundo período de cobrição no Outono (Agosto a Outubro), geralmente destinado à cobrição do efectivo de substituição e das ovelhas que não ficaram gestantes na Primavera.

As elevadas taxas de fertilidade obtidas na época de Primavera, embora esta seja considerada como época de anestro sazonal (Wheeler e Land, 1977), justificam-se com base em estudos prévios, que referem que ovelhas Merinas em Portugal, apesar de apresentarem alguma sazonalidade reprodutiva, esta não é tão marcada como a que se verifica noutras países (Bettencourt, 1988; Silva e Calheiros, 1980). Uma prática comum em Portugal desde longa data, é a de seleccionar borregas nascidas de ovelhas cobertas na Primavera. Na medida em que a capacidade de cobrição fora da estação reprodutiva é, segundo Hanrahan (1987), transmitida geneticamente, é provável que, a longa estação reprodutiva que se observa nestas raças tenha resultado, pelo menos em parte, de uma selecção efectiva de ovelhas capazes de se cobrirem durante os meses de Primavera.

Nos países onde existe uma actividade reprodutiva com estações bem demarcadas de actividade sexual e de anestro (Hafez, 1952; Wheeler e Land, 1977; Haresign e McLeod, 1985; Lincoln, 1992), a utilização de épocas de cobrição não coincidentes com a estação reprodutiva implica a utilização de tratamentos à base de luz (Cheminneau *et al.*, 1992) ou tratamentos hormonais (Cognie, 1988). Pelo contrário, em países tropicais e subtropicais em que os ovinos manifestam um padrão

de actividade reprodutiva mais uniforme, a reprodução pode ser iniciada com o recurso a estímulos naturais tais como o “efeito macho” (Bettencourt, 1988), e/ou o reforço alimentar (Cheminau, 1989). A eficácia da indução da actividade sexual com estímulos naturais depende da oportunidade do tratamento relativamente à fase de actividade cíclica espontânea em que este é efectuado (Silva, 1993). A sincronização de cios pela utilização do “efeito macho” pode ser melhorada por um tratamento prévio com progestagénios (Pearce e Oldham, 1984).

Os objectivos deste estudo foram avaliar a eficácia reprodutiva e produtiva de quatro opções de maneio reprodutivo: 1) Cobrição Natural (**CN**); 2) Pré-exposição a carneiros vasectomizados seguida de cobrição natural (**EM**); 3) Tratamento prévio com progestagénios seguida de cobrição natural (**AP**); e 4) Inseminação artificial, seguida duas semanas depois, de cobrição natural (**IN**).

## **Material e Métodos**

Este estudo foi realizado na época de cobrição de Primavera (meses de Março, Abril e Maio) de 1997, na Herdade da Abóbada, Serpa (Latitude 38° N e Longitude 2° W).

Animais. Foram utilizadas ovelhas Merino Branco (**MB**; n = 253) e Merino Preto (**MP**; n = 229) pertencentes aos efectivos do Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, que apresentavam condição corporal entre 3.0 e 4.5 e idades compreendidas entre os 2 e os 11 anos. As ovelhas foram divididas aleatoriamente pelos vários grupos de tratamento e agrupadas em classes de idade de acordo com a distribuição

de observações. Foram consideradas 4 classes etárias: animais de idade igual ou inferior a 3 anos, de 4, de 5 anos e de idade igual ou superior a 6 anos.

Maneio Alimentar e Sanitário. Os animais foram mantidos em regime de pastoreio extensivo, em pastagens naturais e semeadas durante o final do Outono e Primavera e restolhos de cereais e girassol no Verão. Dum modo geral, a suplementação alimentar (concentrados, fenos e palhas) inicia-se um mês antes da época de partos. Semestralmente (Outono e Primavera) os animais são desparasitados (endo e ectoparasitas) e vacinados (Enterotoxémias e Pasteurelose).

Tratamentos. Para todos os grupos foi considerado o Dia ‘0’ como o dia do início do período de cobrição (final de Março). Todas as ovelhas estiveram em estrito isolamento do contacto com os carneiro durante os seis meses que precederam o início da cobrição. Foram criados os seguintes grupos de ovelhas de acordo com o sistema de maneio utilizado:

Grupo de cobrição natural (CN): Ovelhas **MB** (n = 53) e **MP** (n = 58) expostas à cobrição no Dia ‘0’.

Grupo de “efeito macho” (EM): Ovelhas **MB** (n = 54) e **MP** (n = 64), expostas a carneiros vasectomizados durante as duas semanas anteriores ao Dia ‘0’.

Grupo de sincronização por progestagénios (AP): Ovelhas **MB** (n = 75) e **MP** (n = 55) a que foram aplicadas esponjas vaginais impregnadas com 30 mg de Acetato de Fluorogestona (FGA) durante os 12 dias anteriores ao Dia ‘0’.

Grupo da IA seguida de cobrição natural (IN): Ovelhas **MB** (n = 71) e **MP** (n = 52) inseminadas 15 dias antes do Dia ‘0’. O programa de IA consistiu na sincronização de cios por aplicação de esponjas vaginais impregnadas com 30 mg de

FGA durante 12 dias com administração de PMSG (500 a 600 UI) no dia da retirada das esponjas e inseminação com sémen fresco, sempre que possível por via cervical, 50 a 60 horas mais tarde. O sémen utilizado foi recolhido por vagina artificial, em machos previamente treinados, e diluído numa diluição fixa de 1:3 em leite UHT, após avaliação macro e microscópica.

O período de cobrição teve a duração de 6 semanas para os grupos **CN**, **EM** e **AP**. Os grupos de **CN** e **EM** de cada genótipo permaneceram em conjunto durante o período de cobrição com 5 carneiros das raças respectivas. No grupo **AP** foram utilizados dois carneiros para cada raça. O grupo **IN** iniciou a época de cobrição natural 2 semanas depois dos outros grupos, com duração de 4 semanas. Utilizaram-se neste grupo 2 carneiros para cada raça. Os carneiros utilizados no período de cobrição foram equipados com arreios marcadores sendo a côr dos marcadores mudada de 15 em 15 dias. O registo de cios foi efectuado semanalmente por contagem do número de ovelhas marcadas.

A época de partos iniciou-se a 11 de Agosto de 1997 prolongando-se por um período de 8 semanas. Os borregos foram vacinados (Enterotoxémias e Pasteurelose) e desparasitados (endoparasitas) ao mês de idade. Todos os borregos foram desmamados em data fixa estando a idade ao desmame condicionada pela data do nascimento.

A distribuição dos animais, pelos diferentes grupos de tratamento e de acordo com a raça e idade encontra-se na Tabela 2.1.

| <b>Grupo</b> | <b>Raça</b> | <b>Idade</b> | <b>Nº de observações</b> |
|--------------|-------------|--------------|--------------------------|
| CN           | MB          | 3            | 15                       |
| CN           | MB          | 4            | 9                        |
| CN           | MB          | 5            | 17                       |
| CN           | MB          | 6            | 12                       |
| CN           | MP          | 3            | 17                       |
| CN           | MP          | 4            | 3                        |
| CN           | MP          | 5            | 21                       |
| CN           | MP          | 6            | 17                       |
| EM           | MB          | 3            | 26                       |
| EM           | MB          | 4            | 18                       |
| EM           | MB          | 5            | 8                        |
| EM           | MB          | 6            | 2                        |
| EM           | MP          | 3            | 28                       |
| EM           | MP          | 4            | 9                        |
| EM           | MP          | 5            | 16                       |
| EM           | MP          | 6            | 11                       |
| AP           | MB          | 3            | 28                       |
| AP           | MB          | 4            | 10                       |
| AP           | MB          | 5            | 23                       |
| AP           | MB          | 6            | 14                       |
| AP           | MP          | 3            | 20                       |
| AP           | MP          | 4            | 2                        |
| AP           | MP          | 5            | 24                       |
| AP           | MP          | 6            | 9                        |
| IN           | MB          | 3            | 22                       |
| IN           | MB          | 4            | 13                       |
| IN           | MB          | 5            | 18                       |
| IN           | MB          | 6            | 18                       |
| IN           | MP          | 3            | 19                       |

**CN:** Cobrição Natural **EM:** Efeito Macho **AP:** Progestagénios **IN:**Inseminação e Cobrição Natural; **MB:** Merino Branco **MP:** Merino Preto; **Idade 3:** 3 anos **Idade 4:** 4 anos **Idade 5:** 5 anos **Idade 6:** idade igual ou superior a 6 anos.

**Tabela 2.1.** Distribuição das observações em função do Grupo de Maneio, Raça e Idade.

Registo de dados. No período de cobrição foram feitas contagens semanais das ovelhas marcadas e foi determinado o peso e a condição corporal. Ao parto, registaram-se a data de parto, o tipo de parto (simples = 1 ou duplo = 2), o peso e condição corporal da ovelha e o peso do borrego recém nascido. Na altura do desmame anotaram-se a data de desmame, a idade e o peso individual dos borregos.

Análise Estatística. A fertilidade, prolificidade, idade ao desmame e produtividade em cada raça e grupo foram avaliadas através de análise de variância, utilizando o procedimento GLM (SAS, 1985). A produtividade foi avaliada em Kg de borrego desmamado por ovelha exposta à cobrição (Produtividade 1) e em Kg de borrego por ovelha parida (Produtividade 2). A distribuição de cobrições foi avaliada apenas para os grupos **CN**, **EM** e **AP** utilizando o registo da semana em que as ovelhas foram marcadas a 1<sup>a</sup> vez. A distribuição de partos foi avaliada em semanas de parto a contar da data do primeiro parto. Os efeitos incluídos nos modelos finais para fertilidade e prolificidade foram o grupo, a raça e a idade da ovelha. Na análise da idade ao desmame foi apenas incluído o efeito do grupo. Na análise da produtividade foram incluídos o efeitos do grupo e raça para a Produtividade 1 e os efeitos do grupo, raça e tipo de parto para a Produtividade 2.

## Resultados

Os resultados da análise de variância e as médias marginais para taxas de fertilidade e prolificidade encontram-se nas Tabelas 2.2. e 2.3. A fertilidade global obtida foi de 86% não se verificando diferenças significativas entre os sistemas de

maneio alternativos utilizados ( $P<0.05$ ). Dos outros factores considerados, a raça foi a fonte de variação mais importante ( $P<0.05$ ) com uma fertilidade média de 89.4% para a raça **MP** e de 82.8% para a raça **MB**. As taxas de fertilidade variaram também de acordo com as classes etárias consideradas ( $P<0.10$ ), sendo este valor superior no grupo de ovelhas de 5 e 6 de idade comparativamente ao das ovelhas de 3 e 4 anos (89% e 92%, respectivamente). A prolificidade média foi de 1.30 sendo a idade da ovelha o único factor que influenciou significativamente esta variável de resposta ( $P<0.001$ ). Obtiveram-se valores de prolificidade médios de 1.18, 1.29, 1.35 e 1.44, respectivamente, para as classes de idade 3, 4, 5 e 6 de acordo com a distribuição definida anteriormente.

| Fontes de Variação         |      | Fertilidade |      | Prolificidade |  |
|----------------------------|------|-------------|------|---------------|--|
|                            | g.l. | F           | g.l. | F             |  |
| <b>Grupo</b>               | 3    | 1.29        | 3    | 0.43          |  |
| <b>Raça</b>                | 1    | 4.08 *      | 1    | 0.50          |  |
| <b>Idade</b>               | 3    | 2.41 †      | 3    | 6.04 ***      |  |
| <b>Resíduo</b>             | 474  |             | 405  |               |  |
| <b>R<sup>2</sup> ( % )</b> |      | 3.39        |      | 4.99          |  |
| <b>C.V. ( % )</b>          |      | 40.51       |      | 34.71         |  |

\*\*\* $P < 0.001$    \*  $P < 0.05$    †  $P < 0.10$

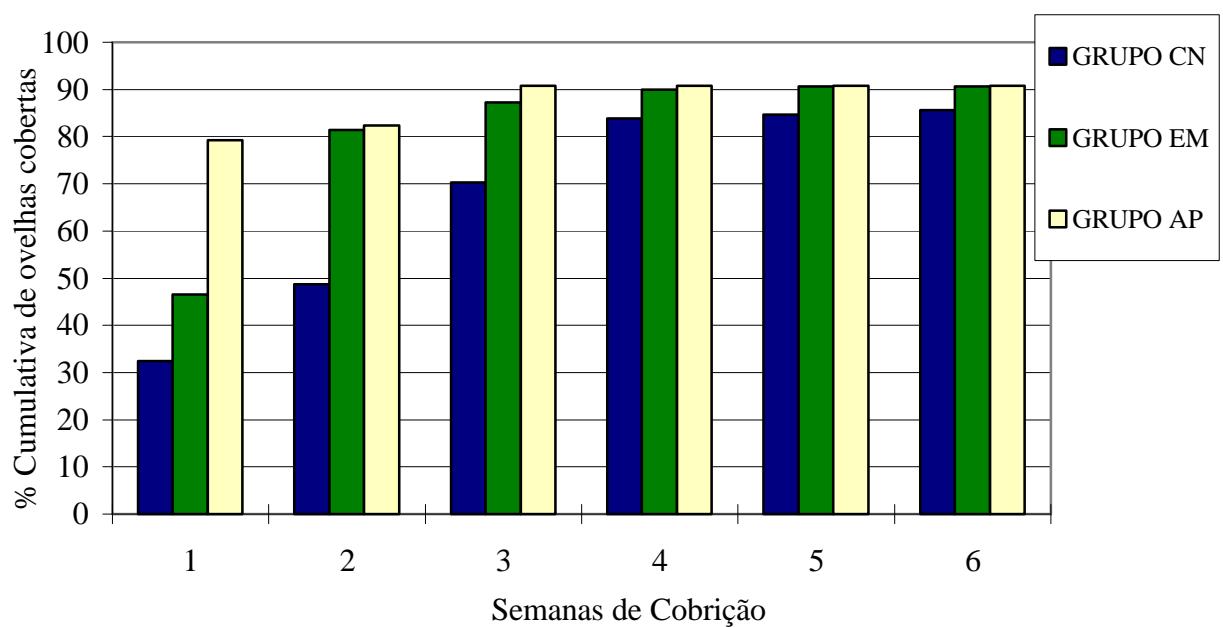
**Tabela 2.2.** Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação (**R<sup>2</sup>**) e coeficientes de variação (**C.V.**) para a Fertilidade e Prolificidade

| <b>Factor</b>       |          | <b>Fertilidade</b>                   |  | <b>Prolificidade</b> |                                      |
|---------------------|----------|--------------------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|
|                     | <b>n</b> | <b>(<math>\bar{X} \pm EP</math>)</b> |  | <b>n</b>             | <b>(<math>\bar{X} \pm EP</math>)</b> |
| <b><u>Grupo</u></b> |          |                                      |  |                      |                                      |
| <b>CN</b>           | 111      | 87.29 ± 3.36                         |  | 98                   | 1.36 ± 0.05                          |
| <b>EM</b>           | 118      | 90.46 ± 3.29                         |  | 105                  | 1.31 ± 0.04                          |
| <b>AP</b>           | 130      | 81.89 ± 3.18                         |  | 106                  | 1.30 ± 0.05                          |
| <b>IN</b>           | 123      | 84.89 ± 3.20                         |  | 104                  | 1.29 ± 0.04                          |
| <b><u>Raca</u></b>  |          |                                      |  |                      |                                      |
| <b>MB</b>           | 253      | 82.85 ± 2.24 <sup>a</sup>            |  | 207                  | 1.33 ± 0.03                          |
| <b>MP</b>           | 229      | 89.41 ± 2.46 <sup>b</sup>            |  | 206                  | 1.30 ± 0.03                          |
| <b><u>Idade</u></b> |          |                                      |  |                      |                                      |
| <b>3</b>            | 175      | 81.75 ± 2.64 <sup>c</sup>            |  | 143                  | 1.18 ± 0.04 <sup>a</sup>             |
| <b>4</b>            | 68       | 81.56 ± 4.33 <sup>b, c</sup>         |  | 55                   | 1.29 ± 0.06 <sup>a, b</sup>          |
| <b>5</b>            | 147      | 89.45 ± 2.89 <sup>a, b, c</sup>      |  | 131                  | 1.35 ± 0.04 <sup>b, c</sup>          |
| <b>6</b>            | 92       | 91.75 ± 3.64 <sup>a, b</sup>         |  | 84                   | 1.44 ± 0.05 <sup>b, c</sup>          |

Para cada factor e caracter, médias com diferentes letras do alfabetos diferem ( $P<0.05$ )

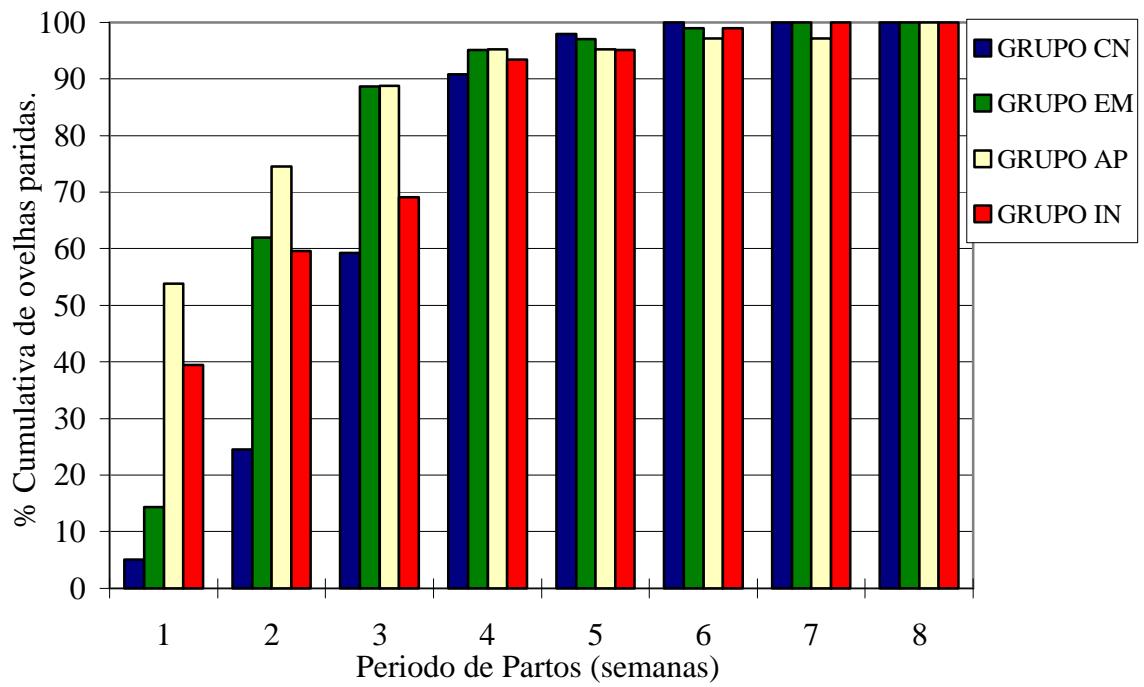
**Tabela 2.3.** Médias Marginais ± Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n º de observações (n) para a fertilidade (%) e Prolificidade em função do Grupo de Maneio, da Raça e Idade da Ovelha

A distribuição dos regtos semanais de cobrição, para os grupos **CN**, **EM** e **AP** encontra-se na Figura 1. Pode observar-se que 80% das ovelhas do Grupo **AP** foram cobertas na 1ª semana do período de cobrição e que igual valor se observou nas ovelhas do grupo **EM** passadas duas semanas de cobrição. Nas ovelhas do grupo **CN**, para o mesmo intervalo, apenas 50% se apresentaram marcadas.



**Figura 1** Distribuição dos registos semanais de 1<sup>a</sup> cobrição de acordo com o sistema de maneio utilizado (**CN**: cobrição natural; **EM**: pré-exposição a carneiros vasectomizados; **AP**: pré-tratamento com progestagénios).

A distribuição das ovelhas paridas em função da semana de parto encontra-se graficamente ilustrada na Figura 2. Pela observação deste gráfico pode constatar-se que a maior concentração de partos, com 90 % das ovelhas paridas em três semanas de parição, ocorreu nos grupos **AP** e **EM** verificando-se uma maior dispersão de parições nos grupos **CN** e **IN**. Tal distribuição reflecte em certa medida o padrão observado durante a época de cobrição na frequência semanal de ovelhas cobertas.



**Figura 2** Distribuição semanal de partos de acordo com o sistema de manejo utilizado (CN: cobrição natural; EM: pré-exposição a carneiros vasectomizados; AP: pré-tratamento com progestagénios; IN: inseminação artificial seguida de cobrição natural).

Os resultados referentes à análise de variância e médias marginais de Produtividade 1 e 2 encontram-se summarizados nas Tabelas 2.4. e 2.5. A média de Kg de borrego por ovelha exposta à cobrição (Produtividade 1) foi de 26.79, não existindo diferenças significativas entre os grupos de manejo e as raças consideradas. Para a Produtividade 2 (Kg de borrego desmamado por ovelha parida) a média global foi de 31.26, com diferenças significativas para todos os factores de variação considerados. O tipo de parto foi a fonte de variação mais importante ( $P<0.001$ ), seguido da raça e do sistema de manejo utilizado ( $P<0.01$  e  $P<0.05$ , respectivamente).

Os valores médios de Produtividade 2 foram significativamente superiores para os partos duplos (42.6 Kg) e para a raça **MB** (36.1 Kg) comparativamente às outras classes consideradas ( $P<0.001$  e  $P<0.01$ ). Em relação ao tipo de maneio reprodutivo, o grupo **AP** registou um valor médio de 36.4 Kg, significativamente superior aos grupos **CN** e **EM**.

| <b>Fontes de Variação</b> | <b>Produtividade 1</b> |          | <b>Produtividade 2</b> |            |
|---------------------------|------------------------|----------|------------------------|------------|
|                           | <b>g.l.</b>            | <b>F</b> | <b>g.l.</b>            | <b>F</b>   |
| <b>Grupo</b>              | 3                      | 0.08     | 3                      | 3.13 *     |
| <b>Raça</b>               | 1                      | 0.21     | 1                      | 10.07 **   |
| <b>Tipo de Parto</b>      | --                     | --       | 1                      | 215.85 *** |
| <b>Resíduo</b>            | 477                    |          | 407                    |            |
| <b>R<sup>2</sup> (%)</b>  |                        | 0.1      |                        | 36.8       |
| <b>C.V. (%)</b>           |                        | 60.81    |                        | 33.08      |

\*\*\* $P < 0.001$    \*\* $P < 0.01$    \* $P < 0.05$

**Tabela 2.4.** Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação (**R<sup>2</sup>**) e coeficientes de variação (C.V.) para a **Produtividade 1** (Kg borrego por ovelha exposta à cobrição) e **Produtividade 2** (Kg borrego por ovelha parida)

| Factor                      | Produtividade 1 |                      |  | Produtividade 2 |                              |
|-----------------------------|-----------------|----------------------|--|-----------------|------------------------------|
|                             | n               | ( $\bar{X} \pm EP$ ) |  | n               | ( $\bar{X} \pm EP$ )         |
| <b><u>Grupo</u></b>         |                 |                      |  |                 |                              |
| <b>CN</b>                   | 111             | 26.73 ± 1.55         |  | 98              | 32.56 ± 1.06 <sup>a</sup>    |
| <b>EM</b>                   | 118             | 26.19 ± 1.50         |  | 105             | 33.32 ± 1.04 <sup>a, b</sup> |
| <b>AP</b>                   | 130             | 27.00 ± 1.43         |  | 106             | 36.45 ± 1.03 <sup>c</sup>    |
| <b>IN</b>                   | 123             | 27.11 ± 1.47         |  | 104             | 35.46 ± 1.04 <sup>b, c</sup> |
| <b><u>Raca</u></b>          |                 |                      |  |                 |                              |
| <b>MB</b>                   | 253             | 27.10 ± 1.03         |  | 207             | 36.07 ± 0.75 <sup>a</sup>    |
| <b>MP</b>                   | 229             | 26.42 ± 1.08         |  | 206             | 32.83 ± 0.76 <sup>b</sup>    |
| <b><u>Tipo de Parto</u></b> |                 |                      |  |                 |                              |
| <b>1</b>                    | --              | --                   |  | 288             | 26.28 ± 0.61 <sup>a</sup>    |
| <b>2</b>                    | --              | --                   |  | 125             | 42.61 ± 0.93 <sup>b</sup>    |

Para cada factor e caracter, médias com diferentes letras do alfabetos diferem ( $P<0.05$ )

**Tabela 2.5.** Médias Marginais ± Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n º de observações (n) para a **Produtividade 1** e **Produtividade 2** de acordo com os factores incluídos nos respectivos modelos de análise.

Os resultados da análise de variância e médias marginais referentes à idade dos borregos ao desmame encontram-se nas Tabelas 2.6. e 2.7. A idade média dos borregos ao desmame foi de 100.5 dias, sendo afectada significativamente pelo sistema de maneio reprodutivo ( $P<0.001$ ). Assim, enquanto os borregos do grupo **AP** tinham idades ao desmame significativamente superiores às dos borregos dos restantes grupos (idade média de 104.5 dias), os borregos do grupo **CN** apresentaram idades ao desmame significativamente inferiores às médias dos restantes grupos (94.7

dias de idade). Tal diferença de idades ao desmame resulta dos diferentes ritmos de parição observado conforme anteriormente demonstrado (Figura 1).

| <b>Fontes de Variação</b>  |             | <b>Idade do Borrego ao Desmame</b> |
|----------------------------|-------------|------------------------------------|
|                            | <b>g.l.</b> | <b>F</b>                           |
| <b>Grupo</b>               | 3           | 16.74 ***                          |
| <b>Resíduo</b>             | 409         |                                    |
| <b>R<sup>2</sup> ( % )</b> |             | 10.94                              |
| <b>C.V. ( % )</b>          |             | 10.01                              |

\*\*\* P < 0.001

**Tabela 2.6.** Tabela de análise de variância, coeficiente de determinação (**R<sup>2</sup>**) e de coeficiente de variação (**C.V.**) para a idade dos borregos ao desmame.

| <b>Factor</b> | <b>Idade ao Desmame (dias)</b> |                                      |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------------|
|               | <b>n</b>                       | <b>(<math>\bar{X} \pm EP</math>)</b> |
| <b>Grupo</b>  |                                |                                      |
| <b>CN</b>     | 98                             | 94.67 ± 1.01 <sup>c</sup>            |
| <b>EM</b>     | 105                            | 101.28 ± 0.98 <sup>b</sup>           |
| <b>AP</b>     | 106                            | 104.46 ± 0.98 <sup>a</sup>           |
| <b>IN</b>     | 104                            | 100.96 ± 0.98 <sup>b</sup>           |

Médias com diferentes letras do alfabeto diferem (P<0.05)

**Tabela 2.7.** Médias Marginais ± Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n ° de observações (n) para a idade dos borregos ao desmame em função do grupo de manejo reprodutivo.

## **Discussão**

Os resultados globais de fertilidade encontrados (86%) estão de acordo com resultados de anos anteriores obtidos no efectivo ovino deste Centro durante o período de cobrição de Primavera (Matos *et al.*, 1997), bem como com resultados obtidos por outros autores, nomeadamente na raça Merino Branco (Silva e Calheiros, 1980) e Merino da Beira Baixa (Rodrigues *et al.*, 1989). A denominação do grupo **EM** como grupo de “efeito macho”, poderá não ser a mais appropriada. De facto, como todas as ovelhas se encontravam previamente separadas do macho no início da cobrição, o contacto com o carneiro deverá ter tido um efeito estimulador nas fêmeas em anestro de todos os grupos, sendo este efeito responsável por não haver diferenças significativas nas taxas de fertilidade entre os vários sistemas de maneio reprodutivo utilizados.

As diferenças de fertilidade observadas entre raças são descritas por vários autores, existindo no entanto pouca informação comparativa referente a estas duas raças (**MB** e **MP**). Estudos anteriores em que se comparou a eficácia da IA nestas duas raças referem taxas de fertilidade à IA de 66.7% na raça Merina Preta comparativamente a 57.6% na raça Merina Branca (Bettencourt *et al.*, 1996).

Um dos critérios de selecção aplicados ao efectivo ovino deste Centro incide sobre o intervalo entre partos. O facto da fertilidade ser significativamente superior para ovelhas da classe 5 e 6 de idade poderá ser resultado desta medida, uma vez que a existência de animais destas idades no rebanho significa que não apresentaram, de modo geral, problemas reprodutivos em épocas anteriores. A prolificidade média de 1.3 ligeiramente superior aos valores de 1.1-1.5 e de 1.1-1.2 geralmente indicados

para o **MB** e **MP**, (D.G.P., 1987) pode estar relacionada com o “efeito macho” e com a utilização de tratamentos hormonais. Pearce e Oldham (1984) referem o tratamento prévio com progestagénios como método alternativo que permite aproveitar a maior taxa de ovulação associada à primeira ovulação após a junção dos machos. Neste estudo não se registaram, no entanto, diferenças significativas entre os grupos de tratamento. O facto de a prolificidade aumentar com a idade da ovelha está de acordo com resultados obtidos por outros autores. Por volta dos três anos e meio a ovelha apresenta um pico na taxa de ovulação que mantém pelo menos até cerca dos dez anos (Bindon *et al.*, 1980).

O ritmo de cobrições observado está de acordo com dados obtidos noutras estudos em que foram utilizados tratamentos hormonais e reflecte, em certa medida, o efeito que a entrada do carneiro induz em ovelhas durante o período de anestro sazonal. Assim, a maior concentração de cobrições registou-se no grupo **AP** com 79% das ovelhas expostas à cobrição marcadas na 1<sup>a</sup> semana. A concentração de partos apresenta inúmeras vantagens permitindo um melhor acompanhamento dos animais no período que antecede o parto e durante a época de partos, com maiores facilidades de maneio alimentar e sanitário. Permite também a obtenção de lotes de borregos mais homogéneos, com inerentes vantagens de maneio e comercialização. A antecipação da época de partos na zona sul do país, assume particular importância actualmente se levarmos em linha de conta as exigências do mercado espanhol nos últimos anos. Animais do grupo **EM** e **AP** apresentaram uma distribuição de partos semelhante, com 89% das ovelhas paridas nas três primeiras semanas, comparativamente ao grupo **CN** em que apenas 59% das ovelhas se encontravam

paridas na 3<sup>a</sup> semana. Estes resultados indicam que a utilização destes tratamentos resulta numa antecipação e concentração da época de partos. Assim, a introdução dos carneiros vasectomizados, ao induzir a ovulação, acompanhada ou não de cio, levará à formação de um corpo lúteo de duração curta ou normal, (Pearce e Olham, 1984) o qual, ao sintetizar progesterona, exercerá um efeito semelhante ao que se obtém com a administração exógena de progestagénios através de esponjas vaginais.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com o descrito por Fontes (1991) cit. por Silva (1993) em ovelhas Merino Branco na época de Primavera. De acordo com este estudo, foram observadas 44% e 47% das ovelhas em cio, respectivamente entre os dias 17 e 20 e entre os dias 23 e 26 após a entrada dos carneiros. O primeiro grupo de ovelhas fez uma primeira ovulação silenciosa seguida de uma fase luteína de duração normal, enquanto o segundo grupo desenvolveu um corpo lúteo de curta duração após a primeira ovulação, sendo acompanhada de cio apenas a terceira ovulação, 23 a 26 dias após a introdução dos carneiros.

A distribuição de parições observada no grupo **IN**, com 59% dos partos no fim da 2<sup>a</sup> semana e apenas 9.6% durante a 3<sup>a</sup> semana, reflecte em certa medida a eficácia da IA e do método de sincronização de cios utilizado. Assim, as ovelhas que pariram na 4<sup>a</sup> semana (24%) correspondem à percentagem de ovelhas que não tendo ficado gestantes da IA, voltaram ser cobertas ao fim dos 17 dias, tendo ficado gestantes dos carneiros introduzidos no rebanho duas semanas após a IA.

A Produtividade 1 foi claramente influenciada por diferenças de fertilidade entre as duas raças. A maior taxa de fertilidade que se observou no **MP** compensou, de certo modo, as diferenças existentes, em termos de potencial de crescimento, entre

as duas raças (Matos *et al.*, 1996). Na análise da Produtividade 2, quando retirado o efeito da fertilidade e incluído o efeito do tipo de parto, este revela-se, como era de esperar, a fonte de variação mais importante. As diferenças de Produtividade 2 observadas entre os diferentes grupos de maneio, reflectem a influência da idade dos borregos ao desmame. Assim, e de acordo com a distribuição de partos observada, borregos desmamados com idade mais avançada terão logicamente maiores pesos ao desmame. No que diz respeito ao efeito da raça, os dados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores em que se registaram pesos superiores ao nascimento (+ 250 gr) e ao desmame (+ 1.9 kg) de borregos Merino Branco em relação a borregos Merino Preto (Matos *et al.*, 1996). De acordo com estes autores, existem duas razões principais para a existência deste diferencial produtivo. Em primeiro lugar destaca-se a influência do Merino Precoce Francês nos nossos efectivos Merino Branco. Esta raça foi introduzida em Portugal por volta dos anos 30, tendo exercido a sua influência particularmente a partir de finais dos anos 50, com a criação do Livro Genealógico Português da Raça Merino Precoce (Bento *et al.*, 1986). Apesar de existir uma referência em relação à produção de Merino Precoce Preto na década de 60 (Portugal e Calheiros, 1968), parece evidente que esta não terá tido um impacto na raça Merina Preta comparável ao resultante da introdução do Merino Precoce na raça Merina Branca. A segunda razão, está relacionada com os efectivos utilizados nestes estudos, pertencentes ao Centro de Experimentação de Baixo Alentejo, Herdade da Abóbada. Enquanto a raça Merina Branca (aproximadamente 300 animais adultos) foi introduzida na Herdade da Abóbada em 1983, iniciando-se nessa altura a sua selecção fenotípica, a raça Merina Preta foi introduzida em 1986, com um número

bastante reduzido de animais, cujo efectivo foi aumentado apenas em 1993. Deste modo, a selecção para caracteres de crescimento nestes efectivos é muito mais recente para o Merino Preto do que para o Merino Branco.

## **Conclusões**

A utilização de técnicas como a inseminação artificial, o “efeito macho” e o tratamento com progestagénios, permite a obtenção de taxas de fertilidade da ordem dos 80% na época de cobrição de Primavera. A utilização tradicional da época de cobrição principal na Primavera em Portugal, relaciona-se fundamentalmente com condicionalismos de mercado, sendo possível, tal como os resultados deste estudo indicam, a obtenção de taxas de fertilidade elevadas nas nossas raças e condições de exploração.

Para a raça Merina Preta obtiveram-se valores de fertilidade superiores às da raça Merina Branca. A utilização do “efeito macho” através da exposição prévia a carneiros vasectomizados ou o tratamento prévio com progestagénios, permite a antecipação e melhor concentração do período de partos, e consequentemente, a obtenção de lotes de borregos mais homogéneos e com maior peso ao desmame. A IA seguida de cobrição natural não compromete a fertilidade global do rebanho, permitindo a vantagem adicional do registo de paternidades, indispensável para os programas de melhoramento e conservação destas duas raças.

## **Reverências Bibliográficas**

- Bento, A.A. Tavares, J.M., Castro, J.L. e Mendes, J.G. (1986). O Merino Precoce em Portugal. Comunicação apresentada na II Conferência Mundial do Merino, 21-23 Abril, Madrid.
- Bettencourt, C.M.V. (1988). Effects of season of year and ram exposure on estrus and ovarian activity in four breeds of sheep in Portugal. Master Thesis Utah State University, Logan, Utah, USA.
- Bettencourt, C.M.V., Gonçalves, C., Simões, J.P.C. e Matos, C.A.P. (1996). Utilização potencial da inseminação artificial em raças ovinas autóctones. Resumo das comunicações do VI Congresso de Zootecnia, Évora, pp. 24.
- Bindon, B.M., Piper, L.R. e Evans, R. (1980). Proc. Booroola Workshop, Armidale C.S.I.R.O. (Melb), 21-33.
- Cheminau, P. (1989). L'effet bouc: mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus. INRA, Prod. Anim., 2: 97-104.
- Cheminau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., e Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim. Reprod. Sci., 30: 157-184.
- Cognié, Y. (1988). Nouvelles méthodes utilisés pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. INRA, Prod. Anim., 1: 83-92.
- DGP (1987). Recursos Genéticos Animais. Raças Autóctones : Ovinos e Caprinos.
- Hafez, E.S.E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction on the ewe. J. Agric. Sci. Camb., 42: 189-265.
- Hanrahn, J.P. (1987). Genetic variation in seasonal reproduction in sheep. Proc. 38th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. 2: 906 (abst.).
- Haresign, W. e McLeod, B.J. (1985). Physiological criteria in genetic selection for seasonality. In: Genetics of Reproduction in Sheep, 291-300. Butterworths, Londres, UK.
- Lincoln, G.A. (1992.) Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. Anim. Reprod. Sci., 28: 203-217.

- Matos, C.A.P., Bettencourt, C.M.V., Camilo, M.R.L. e Fialho, J.B.R.. (1996). Análise de pesos ao nascimento e desmame em borregos das raças ovinas Merino Branco e Merino Preto. Resumo das comunicações do VI Congresso de Zootecnia, Évora, pp. 61.
- Matos, C.A.P., Bettencourt, C.M.V., Simões, J.P.C. e Fialho, J.B.R.. (1997). Efficiency of AI on fertility and prolificacy in a Portuguese Merino flock. 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Sheep and Goat Production-Session V. 25-28 August. Vienna, Austria.
- Pearce, D.T. e Oldham, C.M. (1984). The “Ram Effect”, its mechanism and application to the management of Sheep. In: Reproduction in Sheep, 26-34. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Portugal, J.S. e Calheiros, F.C. (1968). Merino Preto Precoce. Síntese de uma nova raça. Boletim Pecuário, ano XXXVI, 1: 383-391.
- Rodrigues, V.J.P., Rebello de Andrade, C.S.C. e Fragoso de Almeida, J.P. (1989). Contribuição para a caracterização reprodutiva do Merino da Beira Baixa. IV Simposium Internacional de Reprodução Animal. SessãoVI. 8-10 Fevereiro. Lisboa, Portugal.
- SAS (1985). User's Guide: Statistics (version 5 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Silva, J.R. (1993) Maneio reprodutivo em ovinos: indução da ciclicidade e concentração de fecundações em ovelhas da raça Merina. Trabalho apresentado nas XVI Jornadas Médico-Veterinárias: Ovinos e Caprinos. Lisboa.
- Silva, J.R. e Calheiros, F.C. (1980). Ritmo reprodutivo anual em ovelhas da raça Merina. Direcção Geral dos Serviços Veterinários.
- Wheeler, A.G. e Land, R.B. (1977). Seasonal variation in oestrus and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. Anim.Prod., 24: 363-376.

**Estudo 3. Avaliação da Variação Sazonal de Algumas Características Reprodutivas em Carneiros das Raças Merina Branca, Merina Preta e Campança**

**Resumo**

Os objectivos deste estudo foram identificar a existência de possíveis variações sazonais de algumas características reprodutivas de carneiros das raças Campança (**C**), Merina Branca (**MB**) e Merina Preta (**MP**), em duas épocas distintas: Outono e Primavera. Em cada época, durante um periodo de oito semanas, procedeu-se à avaliação semanal de carneiros da cada uma das raças (**MB**, n = 3; **MP**, n = 3; **C**, n = 4). Determinaram-se valores de perímetro testicular (**PT**), volume de sémen (**Vol**), concentração (**Conc**), mobilidade massal (**MM**), mobilidade individual (**MI**) e teores sanguíneos de testosterona. O **PT** (cm) variou de acordo com a época do ano, (32.96 ± .27 e 35.19 ± .25, respectivamente para Outono e Primavera; P<0.001) e a raça com valores significativamente superiores (P<0.05) para a raça **MB** (35.06 ± .38) comparativamente às raças **MP** e **C** (33.88 ± .30 e 33.29 ± .36). O peso vivo influenciou positivamente o valor do **PT** (P<0.05). Não houve diferenças significativas entre épocas do ano e raças no volume de sémen obtido por colheita (P<0.05). A concentração de sémen (por ml) variou significativamente com a época do ano (P<0.001) com valores superiores na época de Outono em relação à Primavera (4.95 \*10<sup>9</sup> ± .11 vs 3.18 \*10<sup>9</sup> ± .10) e foi influenciada positivamente pela concentração sanguínea de testosterona (P<0.05). A época do ano foi o único factor que influenciou significativamente a **MM** (1-5) e **MI** (%), com valores no superiores

na época de Outono comparativamente à Primavera. Não se registaram diferenças significativas nas restantes características macro e microscópicas do sémen. Podemos concluir que, apesar do reduzido tamanho da amostra e embora se tenham observado variações sazonais em algumas características avaliadas, os carneiros mantiveram a capacidade de produzir sémen ao longo do ano.

**Palavras Chave:** Sazonalidade, Carneiro, Sémen, Perímetro Testicular, Merina, Campaniça.

## **Introdução**

A fertilidade e a produtividade global de um rebanho estão directamente condicionadas com a capacidade reprodutiva do carneiro. Assim, o líbido e a capacidade de cópula, a produção de espermatozóides e o seu poder de fertilização, são atributos que, em conjunto, definem o grau de eficiência do reprodutor masculino.

O carneiro adulto é um produtor permanente de sémen ao longo do ano, embora alguns autores descrevam variações sazonais em algumas características, tais como a quantidade e qualidade do sémen obtido (Courot, 1979), o diâmetro testicular (Tulley e Burfening, 1983; Bremner *et al.*, 1984; Silva, 1991), e o líbido (Schanbacher e Lunstra, 1976; Bremner *et al.*, 1984).

Em latitudes temperadas, o fotoperíodo é o factor sazonal que mais interfere no processo reprodutivo no macho (Pelletier e Ortavant, 1975). Outros factores tais como a temperatura (Colas, 1983), o nível alimentar (Oldham *et al.*, 1978), a doença e factores de *stress* podem também afectar a secreção de gonadotrofinas. O contacto com a fêmea pode de algum modo estimular a produção de LH em carneiros, sendo este efeito mediado possivelmente através de estímulos olfactivos e visuais (Sanford *et al.*, 1974). Além do fotoperíodo, factores como as condições de maneio nutricional e ambiental podem ter um papel tão ou mais importante na actividade reprodutiva do macho (Masters e Fels, 1984).

A caracterização de diferentes raças, no referente a padrões reprodutivos, exige que, na avaliação, os critérios considerados não sejam analisados isoladamente mas sim de uma forma combinada. Deste modo, consegue-se obter uma melhor estimativa das diferenças que eventualmente possam existir entre raças.

Os objectivos deste estudo foram identificar a possível existência de variações sazonais de algumas características reprodutivas de carneiros das raças Campanha (C), Merina Branca (MB), e Merina Preta (MP), em duas épocas reprodutivas distintas: Outono e Primavera. Especificamente, determinaram-se valores de perímetro testicular, características macro e microcópicas do sémen e níveis sanguíneos de testosterona.

## Materiais e Métodos

Este estudo realizou-se na Herdade da Abóbada, Serpa (Latitude 38° N e Longitude 2° W). Foram recolhidos dados em duas épocas do ano distintas (Outono e Primavera), decorrendo o primeiro período entre 31 de Outubro e 13 de Dezembro de 1996 (7 semanas) e o segundo entre 11 de Abril e 6 de Junho de 1997 (8 semanas).

Animais. Foram utilizados inicialmente 12 carneiros (4 de cada raça; C, MB e MP). Este número foi reduzido a 10 por inutilização de um carneiro MB e outro da raça MP. Todos os animais se encontravam em condição corporal 3 e 4 (escala de 1-5) e tinham idades compreendidas entre os 2 e 5 anos.

Procedimento experimental. Todos os animais foram pesados e determinada a sua condição corporal no início de cada época. Semanalmente, de cada animal, foram colhidos os seguintes elementos:

- Perímetro testicular (PT). Medido com fita flexível de nylon na zona de maior diâmetro mantendo-se o animal em pé.
- Colheita e exame de sémen. Uma colheita diária com periodicidade semanal. As

colheitas de sémen foram feitas nos carneiros que tinham sido previamente treinados para recolha de sémen por vagina artificial. Antes de cada colheita era permitido ao carneiro efectuar uma falsa monta.

- Avaliação de sémen em relação a características macroscópicas (volume, côr, cheiro e consistência) e microscópicas (mobilidade massal e individual e concentração em mil milhões por ml).
- Níveis de testosterona. Semanalmente, no dia da colheita de sémen, foram realizadas 3 colheitas de sangue consecutivas (às 10, 12 e 15 horas) por venopunctura jugular, para doseamento dos níveis serológicos de testosterona. As amostras de sangue foram centrifugadas durante 15 minutos, a 3000 rotações por minuto e o soro extraído conservado a -20° C até ser enviado para análise laboratorial. Os doseamentos hormonais foram realizados por radioimunoensaio (RIA) na Divisão Nacional de Seleção e Reprodução Animal da Venda Nova.

Análise estatística. Os valores de perímetro testicular, mobilidade individual e massal, e concentração foram avaliados através análise de variância utilizando o procedimento GLM (SAS, 1985). Os modelos incluiram os efeitos da época do ano e da raça e para o perímetro testicular e concentração. Para além destes factores, foram introduzidos o peso vivo (perímetro testicular) e o nível sanguíneo de testosterona (concentração) como covariáveis. A avaliação do volume de ejaculado e das concentrações séricas médias de testosterona (média semanal das 3 colheitas diárias) é apresentada apenas a título descritivo. As características macroscópicas do sémen, côr cheiro e consistência não apresentaram diferenças significativas nos modelos

utilizados, não sendo por isso incluídas no modelo estatístico utilizado.

## Resultados

Os valores médios calculados e respectivos coeficientes de variação para o perímetro testicular, volume de ejaculado, concentração de sémen, mobilidade massal e individual e concentrações sorológicas de testosterona para cada raça e época considerada encontram-se descritos na Tabela 3.1.

| <b><u>Merino Branco</u></b> |                             |               |                             | <b><u>Merino Preto</u></b> |                             |               |                             | <b><u>Campaniço</u></b> |                             |               |                             |             |
|-----------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|-------------|
| <b>Primavera</b>            |                             | <b>Outono</b> |                             | <b>Primavera</b>           |                             | <b>Outono</b> |                             | <b>Primavera</b>        |                             | <b>Outono</b> |                             |             |
|                             | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>C.V.</b>   | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>C.V.</b>                | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>C.V.</b>   | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>C.V.</b>             | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>C.V.</b>   | <b><math>\bar{X}</math></b> | <b>C.V.</b> |
| <b>PT</b>                   | 37.2                        | 4.4           | 33.8                        | 6.8                        | 34.8                        | 4.5           | 33.3                        | 6.4                     | 34.3                        | 6.4           | 31.2                        | 5.0         |
| <b>Vol.</b>                 | 1.03                        | 37.9          | 1.05                        | 29.0                       | 1.08                        | 34.7          | 1.16                        | 40.6                    | 1.15                        | 129.4         | 0.89                        | 27.1        |
| <b>Conc.</b>                | 3.19                        | 26.1          | 4.65                        | 28.9                       | 3.38                        | 25.1          | 4.93                        | 18.8                    | 3.11                        | 23.1          | 5.11                        | 16.4        |
| <b>MM</b>                   | 4.96                        | 4.1           | 5.0                         | 0.0                        | 4.82                        | 10.4          | 4.89                        | 6.6                     | 4.77                        | 10.4          | 5.00                        | 0.0         |
| <b>MI</b>                   | 53.7                        | 24.7          | 72.2                        | 19.5                       | 63.1                        | 25.0          | 66.7                        | 23.1                    | 54.3                        | 25.8          | 66.0                        | 17.7        |
| <b>Test.</b>                | 4.94                        | 157.8         | 1.91                        | 56.2                       | 4.08                        | 67.9          | 3.94                        | 42.1                    | 3.29                        | 97.1          | 1.98                        | 114.7       |

**Tabela 3.1.** Médias ( $\bar{X}$ ) e coeficientes de variação (C. V.) para o perímetro testicular (PT; cm), volume de ejaculado (Vol; ml), concentração de sémen, (Conc;  $* 10^9$  / ml), mobilidade massal (MM; 1-5), mobilidade individual, (MI; %) e concentração plasmática de testosterona, (Test; ng/ml)) em função da raça e época considerada.

Os resultados da análise de variância para o perímetro testicular, concentração de sémen e mobilidade massal e individual, de acordo com as fontes de variação que se revelaram significativas para cada factor, encontram-se descritos nas Tabelas 3.2. e

3.3. A época do ano foi a fonte de variação mais importante para todos os parâmetros estudados (nível de significância de  $P<0.001$  para todas as variáveis excepto para a **MM**;  $P<0.05$ ). Independentemente do factor raça, o valor médio de **PT** foi superior no período de Primavera comparativamente ao Outono ( $35.19\text{ cm} \pm 0.25$  vs  $32.96\text{ cm} \pm 0.27$ ;  $P<.001$ ). O factor raça e peso vivo influenciaram também significativamente esta variável ( $P<.05$ ) com valores médios superiores na raça **MB** em relação às raças **MP** e **C** ( $35.06\text{ cm} \pm 0.38$ ,  $33.88\text{ cm} \pm 0.30$  e  $33.29\text{ cm} \pm 0.36$ , respectivamente). O peso vivo influenciou positivamente o **PT** tendo-se obtido um coeficiente de regressão de 0.058 ( $P<.05$ ).

No que diz respeito à concentração de sémen observaram-se na época de Outono valores superiores com concentrações médias de  $4.95*10^9 \pm 0.11$  espermatozóides por ml nesta época comparativamente às concentrações de  $3.18*10^9 \pm 0.10$  observadas na Primavera ( $P<.001$ ). Foi ainda encontrada uma relação positiva entre a concentração de sémen (0.045) e os níveis médios circulantes de testosterona (coeficiente de regressão de 0.045,  $P<.05$ ). Não se observaram diferenças significativas entre as três raças estudadas no referente à concentração de sémen. Em relação à **MM** e **MI** a época do ano parece ser o único factor que influenciou significativamente estas variáveis. Assim observaram-se valores médios de **MM** e **MI** significativamente superiores no Outono ( $4.97 \pm 0.04$  e  $68.4\% \pm 1.84$ , respectivamente) comparativamente aos registados na Primavera ( $4.84 \pm 0.04$  e  $56.9\% \pm 1.7$ , respectivamente).

| Fontes de Variação       | Perímetro Testicular |           | Concentração |            | Mobilidade Massal |        | Mobilidade Individual |           |
|--------------------------|----------------------|-----------|--------------|------------|-------------------|--------|-----------------------|-----------|
|                          | g.l.                 | F         | g.l.         | F          | g.l.              | F      | g.l.                  | F         |
| <b>Época</b>             | 1                    | 30.68 *** | 1            | 132.39 *** | 1                 | 4.86 * | 1                     | 22.55 *** |
| <b>Raça</b>              | 2                    | 4.22 *    | 2            | 0.81       | 2                 | 1.71   | 2                     | 1.47      |
| <b>Peso</b>              | --                   | 4.23 *    | --           | --         | --                | --     | --                    | --        |
| <b>Testosterona</b>      | --                   | --        | 1            | 5.42 *     | --                | --     | --                    | --        |
| <b>Resíduo</b>           | 136                  |           | 138          |            | 138               |        | 133                   |           |
| <b>R<sup>2</sup> (%)</b> |                      | 48.7      |              | 49.2       |                   | 5.66   |                       | 16.0      |
| <b>C.V. (%)</b>          |                      | 5.61      |              | 22.59      |                   | 6.88   |                       | 22.84     |

\*\*\*P < 0.001 \*\*P < 0.01 \*P < 0.05

**Tabela 3.2.** Tabela de análise de variância, coeficientes de determinação (**R<sup>2</sup>**) e coeficientes de variação (C.V.) para o perímetro testicular, concentração, mobilidade massal e mobilidade individual.

| Factor           | Perímetro Testicular |                           | Concentração             |                          | Mobilidade Massal       |                      | Mobilidade Individual |                      |
|------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
|                  | n                    | ( $\bar{X} \pm EP$ )      | ( $\bar{X} \pm EP$ )     | ( $\bar{X} \pm EP$ )     | ( $\bar{X} \pm EP$ )    | ( $\bar{X} \pm EP$ ) | ( $\bar{X} \pm EP$ )  | ( $\bar{X} \pm EP$ ) |
| <b>Época</b>     |                      |                           |                          |                          |                         |                      |                       |                      |
| <b>Primavera</b> | 80                   | 35.19 ± 0.25 <sup>a</sup> | 3.18 ± 0.10 <sup>a</sup> | 4.84 ± 0.04 <sup>a</sup> | 56.9 ± 1.7 <sup>a</sup> |                      |                       |                      |
| <b>Outono</b>    | 70                   | 32.96 ± 0.27 <sup>b</sup> | 4.95 ± 0.11 <sup>b</sup> | 4.97 ± 0.04 <sup>b</sup> | 68.4 ± 1.8 <sup>b</sup> |                      |                       |                      |
| <b>Raca</b>      |                      |                           |                          |                          |                         |                      |                       |                      |
| <b>MB</b>        | 45                   | 35.06 ± 0.38 <sup>a</sup> | 3.92 ± 0.14              | 4.98 ± 0.05              | 62.7 ± 2.2              |                      |                       |                      |
| <b>MP</b>        | 45                   | 33.88 ± 0.30 <sup>b</sup> | 4.13 ± 0.14              | 4.86 ± 0.05              | 65.2 ± 2.3              |                      |                       |                      |
| <b>C</b>         | 60                   | 33.29 ± 0.36 <sup>b</sup> | 4.13 ± 0.12              | 4.88 ± 0.04              | 60.1 ± 1.9              |                      |                       |                      |

Para cada factor e caracter, médias com diferentes letras do alfabetos diferem (P<0.05)

**Tabela 3.3.** Médias Marginais ± Erro Padrão ( $\bar{X} \pm EP$ ) e n ° de observações (n) para o Perímetro Testicular (cm), Concentração (\*10<sup>9</sup> / ml) de Sêmen, Mobilidade Massal (1-5) e Mobilidade Individual (%), em função da época: Primavera e Outono e da Raça Merina Branca (MB), Merina Preta (MP) e Campaniça (C).

## **Discussão**

Um dos objectivos deste estudo era o de contribuir, dentro dos limites impostos pelo número de animais e pelo próprio delineamento experimental adoptado, para a caracterização reprodutiva de carneiros de três raças ovinas nacionais. Os elementos recolhidos, se bem que não possam ser considerados conclusivos, são no entanto inovadores atendendo ao facto que não existe na literatura muita informação referente a animais das raças utilizadas neste estudo.

As diferenças sazonais verificadas no perímetro testicular dos carneiros utilizados neste estudo contrariam de algum modo as descritas pela maioria dos autores, que referem valores superiores desta medida na época de Outono (Lincoln e Davidson, 1977; Karsh *et al.*, 1984; Silva, 1991). Alguns autores, sugerem no entanto, que em carneiros de raças do Sul, como o Merino, a sazonalidade que se observa no respeitante ao nível de actividade testicular e comportamento sexual, é menos marcada do que a observada em países nórdicos (Lincoln *et al.*, 1990). De acordo com outros autores, esta é fundamentalmente condicionada por outras alterações de ordem ambiental que não o fotoperíodo, nomeadamente pelo nível alimentar. O efeito da temperatura ambiente no diâmetro e função testicular tem sido documentado por vários autores. Sarlos *et al.* (1996) referem a existência de uma correlação positiva (0.26) entre o volume testicular e a temperatura média. Assim, as temperaturas elevadas, que se fizeram sentir durante os meses de Primavera em que decorreu este estudo poderão, de algum modo, explicar a variação que se observou, entre épocas, no diâmetro testicular médio. Os valores mais elevados de perímetro testicular que se registaram na raça **MB** estão provavelmente relacionados com

diferenças de peso vivo entre as raças consideradas. Carneiros da raça **MB** apresentam valores médios de peso vivo da ordem dos 80 Kg comparativamente a carneiros **MP** e **C** com pesos da ordem dos 70 Kg e 65 Kg, respectivamente (D.G.P., 1987). De acordo com Notter *et al.* (1985) as diferenças de perímetro testicular que se observam entre raças resultam fundamentalmente de diferenças de tamanho corporal.

As variações sazonais que se observam em parâmetros usualmente utilizados na avaliação de sémen são mais evidentes em características quantitativas, nomeadamente a concentração, do que qualitativas, como por exemplo a mobilidade e morfologia (Courot, 1979). As maiores concentrações de sémen observadas na época de Outono, estão de acordo com resultados obtidos por outros autores que referem a existência de alguma variação sazonal na produção de sémen, aumentando esta quando a duração dos dias começa a diminuir (Courot, 1979; Karsh *et al.*, 1984; Silva, 1991). Verifica-se que a produção de sémen aumenta no início da estação reprodutiva, em simultâneo com concentrações elevadas de gonadotrofinas e testosterona.

Apesar de menos evidente, também estão descritas variações sazonais em características qualitativas do sémen com valores superiores para a **MM** e **MI** na época de Outono. Os resultados por nós obtidos estão de acordo com vários autores, nomeadamente Dufour *et al.* (1984) que referem que a mobilidade do sémen é afectada por o fotoperíodo, aumentando com a diminuição da duração do período de luz. Por observação da Tabela 3.1. podemos constatar a existência de maior variação na **MM** e **MI** na época de Primavera comparativamente à época de Outono. Colas

(1983) indica a existência de maiores variações individuais em características qualitativas do sémen na época de Primavera. Do ponto de vista prático, podemos assim considerar que a escolha de um carneiro reprodutor baseada nestas características será mais eficaz nesta época.

A existência de alterações sazonais na morfologia dos espermatozóides tem sido apontada por alguns autores (Silva, 1991; Derycke *et al.*, 1988). A proporção de espermatozóides anormais e mortos parece ser um dos factores que mais se correlaciona com os resultados de fertilidade *in vivo*. Os métodos de avaliação seminal utilizados neste estudo poderão assim ser insuficientes para a avaliação reprodutiva. Testes como a coloração vital (Hafez, 1987) ou, mais recentemente, o teste de endosmose celular (Cortes *et al.*, 1993) deverão ser incluídos nesta avaliação.

As variações referentes ao volume de ejaculado e concentração média de testosterona não foram consideradas neste estudo sendo apresentadas apenas a título descritivo. No entanto, por observação da Tabela 3.1., podemos observar que as médias de volume de ejaculado foram superiores na época de Outono nas raças **MB** e **MP**, tendo variado no sentido inverso na raça **C**. Tal facto poderá estar associado à agressividade patenteada pelos carneiros de raça Campaniça o que dificultou por vezes o procedimento normal de colheita de sémen, nomeadamente no referente à realização de falsa monta antes da colheita. Alguns autores, no entanto, referem a não existência de variação do volume do ejaculado relacionada com variações do fotoperíodo (Boland *et al.*, 1985). A variação na concentração sanguínea de testosterona é também apresentada a título descritivo na medida em que as alterações sazonais na secreção de LH e testosterona são influenciadas pela exposição

prolongada a ovelhas em estro (Illus *et al.*, 1976). O aumento da actividade reprodutiva induz aumentos transitórios nas concentrações de LH, FSH e testosterona (Sanford *et al.*, 1974, Sanford *et al.*, 1976). Assim, os resultados obtidos não poderiam ser considerados relevantes para o objectivo global deste trabalho.

## **Conclusão**

A avaliação reprodutiva realizada neste estudo pode considerar-se muito superficial, sendo necessária uma investigação mais aprofundada, de modo a se poder inferir acerca da existência de sazonalidade reprodutiva em animais destas três raças. O treino prévio dos animais para colheita utilizando a vagina artificial e a frequência semanal das colheitas poderão ter modificado características importantes na avaliação do macho como sejam libido, volume de sémen, concentração de sémen e características microscópicas do sémen, bem como concentrações hormonais.

Podemos no entanto concluir que apesar de se verificar alguma sazonalidade reprodutiva em carneiros das raças estudadas, estes mantêm actividade reprodutiva ao longo do ano. O treino dos carneiros para colheitas de sémen com vagina artificial permite a obtenção de ejaculados de boa qualidade mesmo na época de Primavera, possibilitando a sua utilização em programas de IA.

## **Referências Bibliográficas**

- Boland, M.P., Al-Kamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B., Howles, C.M., Kelleher, D.L. e Gordon, I. (1985). The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. *Anim. Reprod. Sci.*, 9: 241-252.
- Bremner, W.J. (1984). A study of the reproductive performance of mature Romney and Merino rams throughout the year. In: *Reproduction in Sheep*, 16-19. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Colas, G. (1983). Factors affecting the quality of ram semen. In: *Sheep Production*, 453-465. Butterworths, London, UK.
- Cortes, S.; Nuñez, R. e Vazquez, I. (1993). Capacidad de reacción a endosmosis del espermatozoide de macho cabrio. Proc. of the 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, 225-230.
- Courot, M. (1979). Semen quality and quantity in the ram. In: *Sheep Breeding*, 495-504. G.J.Thomes, D.E.Robertson and R.J. Lighfoot (Editors) Butterworths, London,UK.
- Derycke, G., Bister, J.L. e Paquay, R. (1988). Contribution to comparative study of season variations of sexual activity of rams from different breeds. Proc. of the 3rd World Congress on Sheep and Beef Cattle, Paris, 2: 664-666.
- DGP (1987). Recursos Genéticos Animais. Raças Autóctones : Ovinos e Caprinos.
- Dufour, J.J.; Fahmy, M.H. e Minvielle, F. (1984). Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *J. of Anim. Sci.*, vol.58, Nº 2: 500-511.
- Hafez, E.S.E. (1987). *Reproduction in farm animals*. Fifth Edition. (Eds.) Philadelphia, Lea & Febiger.
- Illius, A.W., Haynes, N.B. e Lamming, G.E. (1976). Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behavior in the ram. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 25-32.
- Karsch, F.J.; Bittman, E.L.; Foster, D.L.; Goodman, R.L.; Legan, S.J. e Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 40: 185-225.

- Lincoln, G.A.e Davidson, W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour and pituitary and testicular activity during seasonal sexual cycle of rams and the influence of photoperiod. *J. Endocrinol.*, 72: 337-349.
- Lincoln, G.A., Lincoln, C.E. e McNeilly, A.S. (1990). Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 88: 623-633.
- Masters, D.G. e Fels, H.E. (1984). Seasonal changes in the testicular size of grazing rams. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 444-447.
- Notter, D.R., Lucas, J.R., McClaugherty, F.S. e Copenhaver, J.S. (1985). Breed group differences in testicular growth patterns in spring-born lambs. *J. Anim. Sci.*, 60: 622-631.
- Oldham, C.M., Adams, N.R., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R. e Mackintosh, J.B. (1978). The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust. J. Agric. Res.*, 29: 173-179.
- Pelletier, J. e Ortavant, R. (1975). Photoperiodic control of LH release in the ram. I. Influence of increasing and decreasing light photoperiods. *Acta Endocrinologica*, 78: 435-441.
- Sanford, L.M.; Winter, W.M.; Palmer, W.M. e Howland, B.E. (1974). The profile of LH and testosterone secretion in the ram. *Endocrinology*, 95: 627-634.
- Sanford, L.M.; Faiman,C.; Howland, B.E. e Palmer, W.M. (1976). The profile of follicle-stimulating hormone secretion in the ram. *Endocrinology*, 99: 752-760.
- Sarlos, P., Molnar, A., Huszar, S., Ratky, J. e Brussow, K.P. (1996). Seasonal changes of andrological characteristics in British Milk ram. *Archiv fur Tierzucht.*, 39: 265-275.
- SAS (1985). User's Guide: Statistics (version 5 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schanbacher, B.D. e Lunstra, D.D. (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J. Anim. Sci.*, 43: 644-650.

Silva, J.C.C. (1991). Variações sazonais das características dos ejaculados obtidos por electroejaculação de ovinos Saloios. IV Simposium International de Reprodução Animal. Resumos, 2: 140-157.

Tulley, D. e Burfening, P.J. (1983). Libido and scrotal circumference of rams as affected by season of the year and altered photoperiod. Theriogenology, 20: 435-448.

## **IV BIBLIOGRAFIA**

- Ainsworth, L. (1985). Effects of Norgestomet-implants anf fluorogestone acetate-impregnated sponges on oestrous cycle length and luteal function of ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 9: 63-73.
- Alberio, R. e Colas, G. (1976). Influence of photoperiodism on sexual development of the young Ile-de-France ram. *Proc. VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Cracow, 3: 26-29.
- Amann, R.P. (1970). Sperm production rates. In: *The Testis*, 2: 433-488. A.D. Johnson, W.R. Gomes e N.L. Van-Demark (Editors) Academic Press, New York, USA.
- Arend, J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive funtion in mammal. In: *Reviews of Reproductive Biology*, 8: 266-320. J.R. Clarke (Editor) Oxford, UK.
- Artiga, C.G. (1993). Test de endosmosis en ovino. *Proc. of the 7th International Meeting on Animal Reproduction*, Murcia, 77-81.
- Baird, D.T. (1978). Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrus cycle. *Biol. of Reprod.*, 18: 359-364.
- Banks, E.M. (1964). Some aspects of sexual behaviour in domestic sheep. *Behaviour*, 23: 249-279.
- Barbas, J.P., Vasquez, M.I. e Mascarenhas,R.D. (1991). Actividade Ovárica da Ovelha Serra da Estrela: Variação Sazonária. Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia (colectânea), 151-158.
- Bartness, T.J. e Goldman, B.D. (1988). Peak duration of serum melatonin and short day responses in adult Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.*, 255: R812-R822.
- Bearden, H. J. e Fuquay, J. (1984). *Applied Animal Reproduction*. 2nd Edition. Reston Publis. Virginia, USA.
- Bento, A.A. Tavares, J.M., Castro, J.L. e Mendes, J.G. (1986). O Merino Precoce em Portugal. Comunicação apresentada na II Conferência Mundial do Merino, 21-23 Abril, Madrid.
- Bettencourt, C.M.V. (1988). Effects of season of year and ram exposure on estrus and ovarian activity in four breeds of sheep in Portugal. Master Thesis Utah State University, Logan, Utah, USA.

- Bettencourt, C.M.V. (1995). Sazonalidade reprodutiva e efeito macho em ovelhas Merinas. A Terra e o Futuro. Revista de Informação da D.R.A.A. Ano 1, 1.
- Bettencourt, C.M.V., Gonçalves, C., Simões, J.P.C. e Matos, C.A.P. (1996). Utilização potencial da inseminação artificial em raças ovinas autóctones. Resumo das comunicações do VI Congresso de Zootecnia, Évora, pp. 24.
- Bindon, B.M., Piper, L.R., Cummins, L.J., O'Shea, T., Millard, M.A., Findlay, J.K. e Robertson, D.M. (1979). Reproductive endocrinology of prolific sheep: studies of the Booroola Merino. In: Genetics of Reproduction in Sheep, 217-235. Butterworths, London, UK.
- Bindon, B.M., Thimonier, J. e Piper, L.R. (1978). Timing of the pre-ovulatory LH discharge in hight fecundity sheep. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 10: 82. (Abst.).
- Bindon, B.M., Piper, L.R. e Evans, R. (1980). Proc. Booroola Workshop, Armidale C.S.I.R.O. (Melb), 21-33.
- Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D. e Sharpe, C. (1991). Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. Biol. Reprod., 44: 398-403.
- Bodin, L., Anio, Algo. (1997). Use of artificial insemination in sheep production and genetics. 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 25-28 August. Vienna, Austria.
- Boland, M.P. e Crosby, T.F. (1993). Fecundin: An immunological approach to enhance fertility in sheep. Anim. Reprod. Sci., 33: 143-158.
- Boland, M.P., Al-Kamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B., Howles, C.M., Kelleher, D.L. e Gordon, I. (1985). The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. Anim. Reprod. Sci., 9: 241-252.
- Boundy, T. (1993). Collection and interpretation of ram semen under general practice conditions. In Practice, September, 219-223.
- Braun, W.F., Thompson, J.M.e Ross,C.V. (1980). Ram scrotal circumference measurements. Theriogenology, 13: 221-229.
- Bremner, W.J. (1984). A study of the reproductive performance of mature Romney and Merino rams throughout the year. In: Reproduction in Sheep, 16-19. Camb. Univ. Press. Austrália.

- Brooks, A.N., Lees, P.D., Cheeks, R.E. Lamming, G.E. e Haynes, N.B. (1983). Proc. Ann. Confr. Soc. for the Study of Fertility, Manchester (Abstr.).
- Buckerell, B.C., Halbert, G.W., Gartley, C.J. e Bretzlaff, K.N. (1991). Artificial Insemination of Small Ruminants. Theriogenology Handbook, 0-2 (10/91): 87-91.
- Cahill, L.P. (1984). Folliculogenesis and ovulation rate in sheep. In: Reproduction in Sheep, 92-98. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Cameron, A.W.N., Fairnie, I.J. e Keogh, E.J. (1984) Semen quality, quantity and flock fertility. In: Reproduction in Sheep, 79-85. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Cameron, A.W.N., Fairnie, I.J., Curnow, D.H., Keogh E.J. e Lindsay, D.R. (1984a). The output of espermatozoa of naturally mated rams. Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. University of Illinois, U-C, Vol. II: 266.
- Cameron, A.W.N., I.J. Fairnie, Curnow, D.H., Keogh E.J. e Lindsay, D.R.,(1984b). The effect of frequency of semen collection and testicular size on the output of espermatozoa by ram. Proc. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination University of Illinois, U-C, Vol. II: 267.
- Cameron, A.W.N., Tiltbrook, A.J., Lindsay, D.R., Keogh, E.J. e Fairnie, I.J. (1986). The effect of testicular wheight and insemination technique on fertility of sheep. Ani. Reprod. Sci., 12: 189-194.
- Carter, B.D. e Goldman, B.D. (1983). Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomised male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*). Duration is the critical parameter. Endocrinology, 124: 2135-2143.
- Cheminau, P. (1989). L'effet bouc: mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus. INRA, Prod. Anim., 2: 97-104.
- Cheminau, P., Malpaux, B., Delgadillo, J.A., Guerin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J. e Pelletier, J. (1992). Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim. Reprod. Sci., 30: 157-184.
- Christensen, A.K. (1975). Handbook of Physiology. Male Reproductive System, 5: 453-465. American Physiological Society, Washington D.C., USA.

- Clarke, I.J. e Tilbrook, A.J. (1992). Influence of non-photoperiodic environmental factors on reproduction in domestic animals. *Ani. Reprod. Sci.*, 28: 219-228.
- Clarke, I.J.(1984). Neuroendocrine Control of the Ovine Estrus Cycle. In: *Reproduction in Sheep*, 1-6. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Cognié, Y. (1988). Nouvelles méthodes utilisés pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. INRA, Prod. Anim., 1: 83-92.
- Colas, G. (1981). Variation saisonnière de la qualité du sperme chez le bétail Ile-de-France. II Fécondation: relation avec les critères qualitatifs observés *in vitro*. *Reproduction, Nutricion, Développement*, 21: 399-407.
- Colas, G. (1983). Factors affecting the quality of ram semen. In: *Sheep Production*, 453-465. Butterworths, London, UK.
- Colas G., Personnic, D., Courot, M. e Ortavant, R. (1975). *Annales de Zootechnie*, 24: 189-196.
- Conduto, Rui (1996). A Ovelha Campanha. Origem, Efectivos, Livro Geneológico, Características Genéticas, Morfológicas e Produtivas. Sistemas de Exploração. Colectânea da Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia, 13-18.
- Cortes, S., Nuñez, R. e Vazquez, I. (1993). Capacidad de reaccion a endosmosis del espermatozoide de macho cabrio. Proc. of the 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, 225-230.
- Courot, M. (1962a). Développement du testicule chez l'agneau. Etablissement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 2: 25-41.
- Courot,M. (1962b). Action des hormones gonadotropes sur le testicule de l'agneau impubère. Réponse particulière de la lignée sertolienne. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 2: 157-162.
- Courot, M. (1979). Semen quality and quantity in the ram. In: *Sheep Breeding*, 495-504. G.J.Thomes, D.E.Robertson and R.J. Lighfoot, Butterworths, London, UK.
- Courot, M., Reviers, M.M. e Pelletier, J. (1975). Variation in pituitary and blood LH during puberty in the male lamb. Relation to time of birth. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 15: 509-516.

- Daniel, P.M. e Prichard, M.M.L. (1957). The vascular arrangements in the pituitary gland of the sheep. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 42: 237-238.
- Danov, D.T., Kovachev, K.D. e Popov, D.V. (1983). Changes in the ultrastructure of ram spermatozoa due to freezing. 1 The effect of the Triladil and saccharose-based semen diluents (in Bulgarian). In: *Cryobiology of Reproductive Cells*. Bulgarian Academy of Science, Sofia, 155-173.
- Denamur, R., Martinet, J. e Short, R.V. (1966). Secretion of progesterone by corpus luteum of the ewe after hypophysectomy, pituitary stalk section and hysterectomy. *Acta Endocrinol.*, 52: 72-90.
- Derycke, G., Bister, J.L.e Paquay, R. (1988). Contribution to comparative study of season variations of sexual activity of rams from different breeds. Proc. of the 3rd World Congress on Sheep and Beef Cattle, Paris, 2: 664-666.
- Dey, S.K., Hoverland, R.C. e Jonhson, D.C. (1982). Phospholipase A<sub>2</sub> activity in the rat uterus: modulation by steroid hormones. *Prostaglandins*, 23: 619-630.
- DGP (1987). Recursos Genéticos Animais. Raças Autóctones : Ovinos e Caprinos.
- DGP (1992) Relatório enviado à Direcção Geral de Planeamento e Agricultura-Ministério da Agricultura.
- Donovan, A., Boland, M.P., Roche, J.F. e O'Callaghan, D.O. (1994) The effect of supplementary long days, a subcutaneos melatonin implant and exposure to a ram on the onset of the breeding season in ewes. *Ani. Reprod. Sci.*, 34: 231-240.
- Downey, B.R. (1980). Regulation of the Estrous Cycle in Domestic Animals: A review. *Can. Vet. J.* November, 21: 301-306.
- Driancourt, M. A., Gibson, W. R. e Cahill, L. P. (1985). Follicular dynamics throughout the oestrus cycle in sheep. A review. *Reprod. Nutr. Develop.*, 25 (1A), 1-15.
- Ducker, M.J. e Boyd, J.S. (1977). The effect of body size and body condition on the ovulation rate of sheeps. *Anim. Prod.*, 24: 377-385.
- Dufour, J.J., Fahmy, M.H. e Minvielle, F. (1984). Seasonal Changes in Breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. *J. of Anim. Sci.*, Vol. 58 N° 2: 500-511.

- Dyrmundsson, O.R., Sigtryggsson, P.e Thorsteinsson, S.S.(1981). Seasonal variation in testis size of Icelandic sheep. *J. Agric. Res. Icel.*, 13: 55-60.
- Ebling, F.J.P., Lincoln, G.A., Cunningham, R.A., Anderson, N. e Lambert, L. (1983). Proc. Ann. Confr. Soc. for the Study of Fertility, Manchester (Abstr.).
- Elsen, J.M., Bodin, L., Bibé, B., Poivey, J.P. e Tchamitchian, L. (1984). Utilization des techniques modernes de reproduction pour l'amélioration génétique. 9<sup>ème</sup> Journées Rech. Ovine et Caprine. INRA-TOVIC-SPEOC Eds., TOVIC-SPEOC, Paris, 361-398.
- Espinosa, E., Solanilla, E., Josa, A., Gil, L., Falceto, M.V., Del Niño, A. e Muñoz, I. (1993). Relación entre el test de endosmosis y los parámetros de contrastación seminal (tinción vital, concentración y motilidad) en ganado vacuno. Proc. of the 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, 181-186.
- Evans, G. e Maxwell, W.M.C. (1987) Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth & (Publishers) Lda., 88 Kingsway, London, UK.
- Evans, G. e Robinson, T.J. (1980). Reproductive potential and endocrinological responses of sheep kept under controlled lighting. II. Pituitary and gonadal responses of ewes and rams to a six-monthly light cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 3: 39-56.
- Fahy, G.M. (1986). The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23: 1-13.
- FAO. Report. (1992). Expert consultation on the management of global animal genetic resources. Rome, April 7-10.
- Fawcett, D.W., Long, J.A. e Jones, A.L. (1969) The ultrastructure of endocrine glands. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 25: 315-368.
- Fletcher, I.C., (1979). Sexual activity in Merino rams. In: *Sheep Breeding*, 487-493. G.J. Tomes, D.E. Robertson R.J. Lighfoot (Editors). Butterworths, London, UK.
- Findlater, R.C.F., Haresing, W., Curnock, R.M. e Beck, N.F.G. (1991). Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen: effects of time of insemination and semen dose on conception rates. *Anim. Prod.*, 53: 89-96.
- Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L., McCann, T.J. e Jones, D.S.C. (1990). Luteal oxytocin: characteristics and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF<sub>2α</sub> secretion at luteolysis in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 7: 111-124.

- Folch, J.P. (1993). Estacionalidad sexual de los ovinos y caprinos en la Península Ibérica. V Simposium Internacional de Reprodução Animal Comunicações: 98-112. Luso, Portugal.
- Foote, R.H. (1974). Artificial Insemination. In: Reproduction in Farm Animals, 409-469. E.S.E. Hafez, Ed. Lea and Febiger, Philadelphia , USA.
- Foulley, J.L., Bouix, J., Goffinet, B. e Elsen, J.M. (1990) Connectedness in genetic evaluation. Advances in Statistical Methods for Genetic Improvement of Livestock, 277-308. Springer Verlag, London, UK.
- Fowler, D.G. (1984) Reproductive Behavior of Rams. In: Reproduction in Sheep, 47-49. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Fuller, L.R., Wood, M.J., Whittingham, D.G. e Watson, P.F. (1994). Cooling mouse sperm to 4º C does not affect fertilization or embryonic development, Abstr. Nº 16. J. Reprod. Fertil., Abstr. Ser. 14: 8.
- Garde, J., Gutiérrez, A., Artiga, G., Pérez Guzmán, C., Montoro, M. e Vázquez, I. (1993). Comparation del test de hamster com otras metodologias de contrastación seminal en la evaluacion del sémen congelado de morueco. Proc. of the 7th International Meeting on Animal Reproduction, Murcia, 286-291.
- Gomes, W.R., Butler, W.R.e Johnson, A.D. (1971) Effect of elevated ambient temperature on testes and blood levels and *in vitro* biosynthesis of testosterone in the ram. J. of Anim. Sci., 33: 804-807.
- Goodman, R.L. (1988). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: The Physiology of Reproduction, 1929-1969. E. Knobil and J.D. Neil, Raven Press, New York. USA.
- Goodman, R.L. e Karsch, F.J. (1980) Pulsatile secretion of luteinizing hormone. Diffferential suppression by ovarian steroids. Endocrinology, 107: 1286-1292.
- Gunn, R.G., Doney, J.M. e Russel, A.J.F. (1969). Fertility in Scottish Blackface ewes as influenced by nutricion and body condition at mating. J. Agric. Sci. Camb., 73: 289-294.
- Gunn, R.G., Doney, J.M. e Russel, A.J.F. (1972). Embryo mortality in Scottish Blackface ewes as influenced by body condition at mating and post-mating nutricion. J. Agric. Sci. Camb., 79: 19-25.

- Hafez, E.S.E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction on the ewe. *J.Agric. Sci. Camb.*, 42: 189-265.
- Hafez, E.S.E. (1987). Reproduction in farm animals. Fifth Edition. (Eds.) Philadelphia, Lea & Febiger.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Sharpe, P. e Buckrell, B.C. (1990a). A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, Vol.33 N° 5: 993-1010.
- Halbert, G.W., Dobson, H., Walton, J.S., Sharpe, P. e Buckrell, B.C (1990b). Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, Vol. 33 N° 6: 1231-1243.
- Hall, D. G., Fogarty, N.M. e Gilmour, A.R. (1986). Seasonality of Ovulation and Estrus, and the Ram Effect in Poll Dorset Ewes. *Theriogenology*, Vol. 25 N° 5: 455-461.
- Hanrahn, J.P. (1987). Genetic variation in seasonal reproduction in sheep. Proc. 38th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Vol. 2: 906 (abst.).
- Hanrahn, J.P.e Quirke, J.F. (1985). Contribution of variation in ovulation rate and embryo survival to within breed variation in litter size. In: Genetics of Reproduction in Sheep, 193-201. Butterworths, London, UK.
- Haresign, W. (1985). The physiological basis for variation in ovulation rate and litter size in sheep: A review. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 3-20.
- Haresign, W. e Lamming, G.E. (1978). Comparison of LH release luteal function in cyclic and LH-RH treated anoestrus ewes pretreated with PMSG or oestrogen. *J. Reprod. Fertil.*, 349-353.
- Haresign, W. e McLeod, B.J. (1985). Physiological criteria in genetic selection for seasonality. In: Genetics of Reproduction in Sheep, 291-300. Butterworths, London, UK.
- Haresign, W., McLeod, B.J. e Webster, B.M. (1983) Endocrine control of reproduction in the ewe. In: Sheep Production, 353-379. Butterworths, London ,UK.
- Haresign, W., McLeod, B.J., Webster, B.M. e Worthy, K. (1985). Endocrine basis of seasonal anoestrus in sheep. In: Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals, 201-300. Butterworths, London, UK.

- Haynes, N.B. e Howles, C.M. (1981). In: Environmental aspects of housing for animal production. (Ed. J.A. Clarke) Butterworth.
- Hixon, J.E., e Flint, A.P. (1987). Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F- $2\alpha$  secretion in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 79: 457-467.
- Howles, C.M., Craigon, J. e Haynes, N.B. (1982). Long-term rhythms of testicular volume and plasma prolactin concentrations in rams reared for 3 years in constant photoperiod. *J. Reprod. Fert.*, 65: 439-446.
- Howles, C.M., Webster, G.M. e 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 behavior in rams. *J. Reprod. Fert.*, 60: 437-447.
- Hulet C.V., Sheldon, M., Gallagher, J.R. e Price, D.A. (1974). Effects of origin and environment on reproductive phenomena in Rambouillet ewes. I. Breeding season and ovulation. *J. Anim. Sci.*, 100: 1210- 1217.
- Hulet, C.V., Ercanbrack, S.K., Price, D.A., Blackwell, R.L. e Wilson, L.O. (1962a). Mating behaviour of the ram in one-sire pen. *J. Anim. Sci.*, 21: 857-864.
- Hulet, C.V., Ercanbrack, S.K., Price, D.A., Blackwell, R.L. e Wilson, L.O. (1962b). Mating behaviour of the ram in the multi-sire pen. *J. Anim. Sci.*, 21: 865-869.
- Hulet, C.V., Foote, W.C. e Blackwell, R.L. (1965). Relationship of semen quality and fertility in the ram to fecundity in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 9: 311-315.
- Hunter, G.L. Belonje, P.C. e Van Niekerk, C.H. (1971). Synchronized mating and lambing in spring bred Merino sheep. The use of progestagen-impregnated intravaginal sponges and teaser rams. *Agroanimalia*, 3: 133-140.
- Huslig, R.L., Fogwell, R.L. e Smith, W.L. (1979). The prostaglandin forming cyclooxygenase of ovine uterus: relationship to luteal function. *Biol. Reprod.*, 21: 589-600.
- Hutchinson, J.S.M. (1979). Gonadotrophic hormones. In: The Hypothalamo-Pituitary Control of the Ovary, 48-63. D.F. Horrobin, Ed., Quebec, Eden Press.

- Illius, A.W., Haynes, N.B. e Lamming, G.E. (1976). Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behavior in the ram. *J. Reprod. Fertil.*, 48: 25-32.
- Jabbour, H.N. e Evans, G. (1991). Ovarian and endocrine responses of merino ewes to treatment with PMSG and or FSH-P. *Anim. Reprod. Sci.*, 26: 93-106.
- Jenkin, G., Heap, R.B. e Symons, D.B.A. (1977). Pituitary responsiveness to synthetic LH-RH and pituitary LH content at various reproductive stages in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 49: 207-218.
- Jeyendran, R.S., Van der Vem, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G. e 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. *J. Reprod. Fertil.*, 70: 219-228.
- Jones, R., Mann, T. e Sherrins, R.J. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 31: 531-537.
- Karsch, F.J. (1984a). Endocrine Control of LH secretion during the estrous cycle of sheep. *Proc. 10th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*. 4: 1-9.
- Karsch, F.J. (1984b). Endocrine and Environmental Control of Oestrus Cycle of the Ewe. In: *Reproduction in Sheep*, 10-15. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J. e Robinson, J.E. (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 40: 185-225.
- Karsch, F.J., Bittman, E.L., Foster, D.L., Goodman, R.L., Legan, S.J. (1980). Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. *J. Reprod. Fert.*, 58: 521-535.
- Katangole, C.B., Naftolin, F. e Short, R.V. (1974) Seasonal variation in blood luteinizing hormone and testosterone levels in rams. *J. Endocrinol.*, 60: 101-106.
- Keisler, D.H. (1991). Sheep Reproductive Management and Artificial Insemination Clinic. June 25 and 26, Columbia Missouri. University of Missouri-Columbia, Lincoln University, Missouri Sheep Merchandizing Council, Missouri Sheep Producers.

- Knight, T.W. (1977) Methods for indirect estimate of testis weight and sperm numbers in Merino and Romney rams. N.Z. J. Agric. Res., 27: 179-187.
- Kretser, D.M. (1982). The Testis. In: Reproduction in Mammals, 3: The Testis, 76-90. C.R. Austin and R.V. Short (editors). Camb.Univ. Press.
- Lamberson, W.L. e Thomas, D.L. (1982). Effects of season and breed of sire on incidence of estrus and ovulation rate in sheep. J. Anim. Sci., Vol. 54, 3: 533-538.
- Land, R.B. (1970). The mating behaviour and semen characteristics of Finnish Landrace and Scottish Blackface rams. Anim. Prod., 12: 551-560.
- Land, R.B., Drury, D.J. e Fordyce, M. (1979). Season of birth and the response to hemicastration in lambs. Anim Prod., 29: 379-384.
- Lapwood, K.R. (1986). Development of the Male Reproductive Tract, Spermatogenesis and Puberty. In: Current Therapy in Theriogenology, 867-869. Morrow, D.A. (Ed.), Philadelphia, W.B. Saunders Co.
- Lees, J. (1965). Seasonal variation in the breeding activity of rams. Nature, 207: 221-222. London, UK.
- Lincoln, G.A. (1992) Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. Anim. Reprod. Sci., 28: 203-217.
- Lincoln, G.A.e Davidson, W. (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour and pituitary and testicular activity during seasonal sexual cycle of rams and the influence of photoperiod. J. Endocrinol. 72: 337-349.
- Lincoln, G.A., Lincoln, C.E. e McNeilly, A.S. (1990). Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. J. Reprod. Fertil., 88: 623-633.
- Lincoln, G.A. e Maeda, K.I. (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. J. Endocrinology., 132: 201-215.
- Lindsay, D.R., Gherardi, P.B. e Oldham, C.M. (1979). The effect of feeding a high protein supplement before joining on testicular volume of rams. In: Sheep Breeding, 571-575. Butterworths, London, UK.

- Lindsay, D.R., Gray, S.J., Oldham, C.M. e Pearce, D.T. (1984). The single injection of progesterone: Alternative methods for synchronisation of ewes in spring using the “ram effect”. *Anim. Prod. Aust.*, 15: 158-170.
- Lino, B.F. (1972). The output of spermatozoa in rams. II. Relationship to scrotal circumference, testis weight, and the number of spermatozoa in different parts of the urogenital tract. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 359-366.
- Lino, B.F. e Braden, A.W.H. (1972). The output of spermatozoa in rams. II. Relationship with testicular output of spermatozoa and the effect of ejaculations. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25: 351-358.
- Lipsett, M.B. (1976). Regulation of testicular functions. *Andrologia*, 8: 43-60.
- Malpaux, B e Karsch, F.J. (1990) A role of short days in sustaining seasonal reproductive activity in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 100: 497-503.
- Malpaux, B., Monter, S.M., Wayne, N.L., Woodfill, C.J.J. e Karsch, F.J. (1988) Reproductive refractoriness of the ewe to inhibitory photoperiod not caused by alteration of the circadian secretion of melatonin. *Neuroendocrinology*, 48: 264-270.
- Malven, P.V. (1986). Inhibition of pituitary LH release resulting from endogenous opioid peptides. *Domestic Animal Endocrinology*, 3: 135-144.
- Martin, G.B., Oldham, C.M., Gognie, Y. e Pearce , D.T. (1986). The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams. A review. *Livest. Prod. Sci.*, 15: 219-247.
- Masters, D.G. e Fels, H.E. (1984). Seasonal changes in the testicular size of grazing rams. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 15: 444-447.
- Matos, C.A.P. e Thomas, D.L. (1992) Physiology and genetics of testicular size in sheep: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 32: 1-30.
- Matos, C.A.P., Thomas, D.L., Nash, T.G., Waldron, D.F. e Stookey, J.M. (1992) Genetic analyses of scrotal circumference in Rambouillet ram lambs. *J. Anim. Sci.*, 70: 43-50.
- Matos, C.A.P., Bettencourt, C.M.V., Camilo, M.R.L. e Fialho, J.B.R.. (1996). Análise de pesos ao nascimento e desmame em borregos das raças ovinas Merino Branco e Merino Preto. Resumo das comunicações do VI Congresso de Zootecnia, Évora, pp. 61.

- Matos, C.A.P., Bettencourt, C.M.V., Simões, J.P.C. e Fialho, J.B.R.. (1997). Efficiency of AI on fertility and prolificacy in a Portuguese Merino flock. 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Sheep and Goat Production-Session V. 25-28 August. Vienna, Austria.
- Maxwell, W.M.C. e Salamon, S. (1993). Liquid storage of ram semen . Reprod. Fertil. Dev., 5: 613-638.
- Maxwell, W.M.C. e Watson, P.F. (1996). Recent progress in the perservation of ram semen. Anim. Reprod. Sci., 42: 55-65.
- McCracken, J.A., Baird, D.T. e Goding, J.R. (1971). Factors affecting the secretion of steroids from the transplanted ovary in the ewe. Rec. Prog. Horm Res., 27: 557-647.
- McKelvey, W.A.C., Robinson, J.J. e Aitken, R.P (1985). The evaluation of laparoscopic insemination technique in ewes. Theriogenology, Vol.24 No 5: 519-535.
- McMillan, W.H. (1986). Hogget oestrous synchhronisation: a comparation of CIDR and sponges. Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod., 46: 225-228.
- McNeilly, A.S., Fraser, H.M. e Baird, D.T. (1984). J. Endocrin., 101: 69-79.
- McNeilly, A.S., O'Connell, M. e Baird, D.T. (1982). Induction of ovulation and normal luteal funtion by pulsed injections of lutenizing hormone in anestrous ewes. Endocrinology, Vol. 110 .3: 1292-1299.
- Meyer, S.L. e Goodman, R.L. (1986). Separate neural systemes mediate the steroid-dependent and steroid independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anoestrous ewe. Biol. Reprod., 35. 562-571.
- Morgan, P.J. e Williams, L.M. (1989). Central melatonin receptors: Implications for mode of action. Experientia, 45: 955-956.
- Montgomery, G.W. Kelly, R.W., Davis, G.H. e Allison, A.J. (1985). Ovulation rate and oestrus in Booroola genotypes: some effects of age, season and nutrition. In: Genetics of Reproduction in Sheep, 237-243. Butterworths, London, UK.
- Mylne, M.J.A., Hunton, J.R. e Buckrell, B.C. (1997). Artificial Insemination of Sheep. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology, 585-594 W.B. Saunders Company (Editors).

- Notter, D.R., Lucas, J.R., McClaugherty, F.S. e Copenhaver, J.S. (1985). Breed group differences in testicular growth patterns in spring-born lambs. *J. Anim. Sci.*, 60: 622-631.
- Nugent, R.A.III, Notter, D.R. e Beal, W.E. (1988a). Effects of ewe breed and ram exposure on estrous behaviour in May and June. *J. Anim. Sci.*, 66: 1363-1370.
- Nugent, R.A.III, Notter, D.R. e McClure, W.H. (1988b). Effects of ram pre-exposure and ram breed on fertility of ewes in summer breeding. *J. Anim. Sci.*, 66: 1622-1626.
- O'Callaghan, D., Roche, J. F. e Karsch, F. J. (1987). Endocrine causes of seasonality in the ewe. Proc. 38th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. (abst), 2: 902.
- O'Doherty e Crosby, T.F. (1990). The effect of type, PMSG dosage and time of ram introduction on reproductive performance in ewe lambs. *Theriogenology*, Vol.33 No 6. 1279-1285.
- Oldham, C.M. (1978). The breeding season in the Merino. The use and abuse of teaser rams. Proc. 2nd Seminar on Sheep Fertility. Recent Research and its Application in Western Aust. Ed D.R. Lindsay. Aust. Soc.Anim. Prod., pp. 5-15.
- Oldham, C.M. e Martin, G.B. (1978). Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by rams II. Premature regression of ram-induced corpora lutea *Anim. Reprod. Sci.*, 1: 291-295.
- Oldham, C. M., Martin, G.B. e Knight, T.W. (1979). Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by rams I Time from introduction of the rams to the preovulatory LH surge and ovulation. *Anim. Reprod. Sci.*, 1: 283-290.
- Oldham, C.M. e Pearce, D.T. (1984) Alternative methods for synchronisation of ewes in spring using the "ram effect" *Anim. Prod. Aust.*, 15: 158-160.
- Oldham, C.M., Adams, N.R., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R. e Mackintosh, J.B. (1978). The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust. J. Agric. Res.*, 29: 173-179.
- Orji, B.J. e Steinbach, J. (1976). Postnatal development of testis and epididymis in the Nigerian Dwarf sheep. Proc. VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Krakow, 3: 73-76.

- Ortavant, R. (1959). In: Reproduction in Domestic Animals, 1st Ed., 1-50 Cole H.H. and Cupps. Academ. Press. New York. USA.
- Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J. e Volland-Nail, P. (1985). Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology, 7: 305-345. Clarendon Press, Oxford. UK.
- Ottobre, J.S., Lewis, G.S., Thayne, W.V., e Inskeep, E K. (1980). Mechanism by which progesterone shortens the estrous cycle of the ewe. Biol. Reprod., 23: 1046-1053.
- Pearce, D.T. e Oldham, C.M. (1984). The “Ram Effect”, its Mechanism and Application to the Management of Sheep. In: Reproduction in Sheep, 26-34. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Pearce, D.T. e Oldham, C.M. (1988). Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-induced ovulation in the ewe. J. Reprod Fertil., 84: 333-339.
- Pelletier, J. (1970). Mode of action of testosterone propionate on the secretion and release of luteinizing hormone (LH) in the castrated ram. Acta Endocrinol, 63: 290-297.
- Pelletier, J. (1974). Decrease in the pituitary response to synthetic LH-RF in castrated ram following testosterone propionate treatment. J. Reprod. Fertil., 41: 397-405.
- Pelletier, J. (1976) Influence of LH-RF on LH e FSH release in domestic animals . Annales de Biologie Animale Biochemie Biophysique, 16: 213-234.
- Pelletier, J. e Ortavant, R. (1975). Photoperiodic control of LH release in the ram. I. Influence of increasing and decreasing light photoperiods. Acta Endocrinologica, 78: 435-441.
- Pelletier, J., Garnier, D.H., Reviers, M.M., Terqui, M. e Ortavant, R. (1982). Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. J. Reprod. Fertil., 64: 341-346.
- Perkins, A. e Fitzgerald, J.A. (1994). The Behavioral Component of the Ram Effect: The Influence of Ram Sexual Behavior on the Induction of Estrus in Anovulatory Ewes. J. Anim. Sci., 72: 51-55.
- Perret, G., Brice, G. e Folch, J. (1997) Review of AI use and Limiting Factors in Small Ruminants in Europe. 48th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 25-28 August. Vienna, Austria.

- Pijoan, P.J. e Williams, W.L. (1984). The breeding season, ovarian activity and plasma prolactin levels in Poll Dorset ewes under two contrasting environments. Proc. 10th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, 2: 30-32.
- Polgue, C., Smith, A.U. e Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydratation at low temperatures. Nature, 164: 666-671.
- Portugal, J.S. e Calheiros, F.C. (1968). Merino Precoce. Síntese de uma nova raça. Boletim Pecuário, ano XXXVI, 1: 383-391.
- Poulton, A.L. e Robinson, T.J. (1987). The response of rams and ewes of three breeds to artificial photoperiod. J. Reprod. Fertil., 79: 609-626.
- Ramalho, S. C. A. M. (1995). Utilização Potencial do Teste de Descendência em Esquemas de Seleção de Ovinos. Relatório do Trabalho de final de Curso de Engenharia Agronómica. U.T.L., I.S.A.
- Radford, H.M., Avenell, J.A. e Szell, A. (1984). Human chorionic gonadotrophin induce multiple ovulation in sheep. In: Reproduction in Sheep, 342-344. Cam. Univ. Press. Australia.
- Rasmussen, D.D. (1991). The interaction between mediobasalhypothalamic dopaminergic neuronal systems as a key regulator of reproduction: a Hypothesis. J. Endocrinol. Invest., 14: 323-352.
- Rathore, .AK. (1968). Proc. of the Australian Soc. for Anim. Prod., 7: 270-278.
- Ravault, J.P. (1976). Prolactin in the ram: seasonal variation in the concentration of blood plasma from birth until three years old. Acta Endocrinol., 83: 720-725.
- Ravault, J.P. e Courot, M. (1975). Blood prolactin in the male lamb from birth to puberty. J. Reprod Fert., 42: 563-566.
- Reeves, J.J., Arimura, A., e Schally , A.V. (1974). Pituitary responsiveness to purified luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) at various stages of the estrous cycle in sheep. J. Anim. Sci., 32: 123-126.
- Regisford, E.G.C., Katz, L.S. (1993). Effects of bromocriptine-induced hypoprolactinaemia on gonadotrophin secretion and testicular function in rams (*Ovis aries*) during two seasons. J. Reprod. Fertil., 99: 559-537.

- Robinson, J.E. e Karsch, F.J. (1984). Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol. Reprod.*, 32: 656-663.
- Robinson, J.E. e Karsch, F.J. (1987). Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylength. *J. Reprod. Fertil.*, 80: 159-165.
- Robinson, J.E. e Karsch, F.J. (1988). Timing the breeding season of the ewe: what is the role of daylength? *Reprod. Nutr. Dev.*, 28: 365-374.
- Robinson, J.E., Wayne, N.L. e Karsch, F.J. (1989). Refractoriness to inhibitory daylengths initiates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol. Reprod.*, 32: 1024-1030.
- Robinson, T.J. e Scaramuzzi, R.J. (1994). Induction of breeding in anoestrous crossbred ewes with progestagen and PMSG with or without prior immunisation against na androstenedione-protein conjugate. *Anim. Reprod. Sci.*, 35: 57-72.
- Rodrigues, V.J.P., Rebello de Andrade, C.S.C. e Fragoso de Almeida, J.P. (1989). Contribuição para a caracterização reprodutiva do Merino da Beira Baixa. IV Simposium Internacional de Reprodução Animal. SessãoVI. 8-10 Fevereiro. Lisboa, Portugal.
- Sadlier, R.F.M.S. (1969). The ecology of reproduction in wild and domestic mammals, London, UK.
- Salamon, S. (1977). Fertility following deposition of equal numbers of frozen-thawed ram spermatozoa by single and double insemination. *Aust. J. Agric. Res.*, 28: 477-479.
- Salamon, S. e Maxwell, W.M.C. (1995a). Frozen storage of ram semen I Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination, *Anim. Reprod. Sci.*, 37: 185-249.
- Salamon, S. e Maxwell, W.M.C (1995b). Frozen storage of ram semen. II Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement, *Anim. Reprod. Sci.*, 38: 1-36.
- Salamonsen, L.A., Jonas, H.A., Burger, H.G., Buckmaster, J.M., Chamley, W.A., Cumming, I.A., Findlay, J.K. e Goding, J.R. (1973). A heterologous radioimmunoassay for folliculo-stimulating hormone: application to measurement of FSH in the ovine estrous cycle and in several other species including man. *Endocrinology*, 93: 610-618.

- Sanford, L.M., Winter, W.M., Palmer, W.M. e Howland, B.E. (1974). The profile of LH and testosterone secretion in the ram. *Endocrinology*, 95: 627-634.
- Sanford, L.M., Faiman,C., Howland, B.E. e Palmer, W.M. (1976). The profile of follicle-stimulating hormone secretion in the ram. *Endocrinology*, 99: 752-760.
- Sanford, L.M., Palmer, W.M. e 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. *J. Anim Sci.*, Vol. 45, nº 6: 1382-1391.
- Sanford, L.M., Beaton, D.B., Howland, B.E. e Palmer, W.M. (1978). Photoperiod induced changes in luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and testosterone secretion in the ram. *Can. J. Anim. Sci.*, 58: 123-128.
- Sarlos, P., Molnar, A., Huszar, S., Ratky, J. e Brussow, K.P. (1996). Seasonal changes of andrological characteristics in British Milk ram. *Archiv fur Tierzucht.*, 39: 265-275.
- SAS (1985). User's Guide: Statistics (version 5 Ed.). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sawyer, G.J., Lindsay, D.E. e Martin, G.B. (1979). The influence of radiant heat on reproduction in the Merino ewe. III. Duration of oestrus, cyclical oestrus activity, plasma progesterone, LH levels and fertility of ewes exposed to hight temperatures before mating. *Aust. J. Agric. Res.*, 30: 1151-1162.
- Scaramuzzi, R.J., Downing, J.A., Campbell, B.K. e Cognie, Y. (1988). Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41: 37-45.
- Schanbacher, B.D. e Lunstra, D.D. (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J. Anim. Sci.*, 43: 644-650.
- Schinckel, P.G. (1954). The effect of the presence of the ram on the ovarian activity of the ewe. *Aust. J. Agric. Res.*, 5: 465-469.
- Schulte-Coerne, H. (1992). Forms of preservation. Proceedings of a CEC Workshop and Training Course, Data Collection, Conservation and Use of Farm Animal Genetic Resources, December 7-9. Institute of Animal Breeding and Genetics, School of Veterinary Science, Hannover, Germany.

- Setchell, B.P., (1984). The functions of the testis and epididymis in rams. In: Reproduction in Sheep, 62-72. Camb. Univ. Press. Austrália.
- Silva, J.C.C. (1991). Variações sazonais das características dos ejaculados obtidos por electroejaculação de ovinos Saloios. IV Simposium International de Reprodução Animal. Resumos, 2: 140-157.
- Silva, J.R. (1993) Maneio reprodutivo em ovinos: indução da ciclicidade e concentração de fecundações em ovelhas da raça Merina. Trabalho apresentado nas XVI Jornadas Médico-Veterinárias Ovinos e Caprinos. Lisboa.
- Silva, J.R. e Calheiros, F.C. (1980). Ritmo reprodutivo anual em ovelhas da raça Merina. Direcção Geral dos Serviços Veterinários.
- Silvia, W.J., lewis, G.S., McCracken, J.A., Thatcher, W.W. e Wilson, Jr.,L. (1991). Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  during luteolysis in ruminants. Biol. Reprod., 45: 655-663.
- Skinner, J.D., Booth, W.D., Rowson, L.E.A. e Karg, H. (1968). The post-natal development of the reproductive tract of the Suffolk ram, and changes in the gonadotrophin content of the pituitary. J. Reprod. Fert., 16: 463-477.
- Sobral, M. e Ferreira, L. (1986). Importância da população Merina nas produções ovinas em Portugal e suas perspectivas futuras. II Conf. Mundial del Merino, Madrid.
- Staples, L.D., McPhee, S., Kennaway, D.J. e Williams, AH. (1992) The influence of exogenous melatonin on the seasonal patterns of ovulation and oestrus in sheep. Anim. Reprod. Sci., 30: 185-223.
- Stellflug, J.N., Weems, Y.S. e Weems, C.W. (1997). Clinical Reproductive Physiology of ewes. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology, 594-598. W.B. Saunders Company (Editors)
- Sweeney, T. e O'Callaghan,D. (1996) Breedig season and ovulation rate in ewes treated with long days in spring followed by a melatonin implant and exposure to a ram. Anim. Sci., 62: 507-512.
- Thimonier, J. e Mauléon, P. (1969). Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. Ann. Biol. Anim., Biochim., Biophys., 9: 223-250.

- Tulley, D. e Burfening, P.J. (1983). Libido and scrotal circumference of rams as affected by season of the year and altered photoperiod. Theriogenology, 20: 435-448.
- Underwood, E.J., Shier, F.L. e Davenport, N. (1944). Studies in sheep husbandry in W.A.V. The breeding season in Merino, crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. J. Agric. (Western Australia) II. Ser. 2: 135-143.
- Walker, S.K., D.H Smith,, Godfrey, B. e Seaman, R.F. (1989). Time of ovulation in the south Australian merino ewe following synchronization of estrus. 1. Variation within and between flocks. Theriogenology, vol.31 No 3: 545-553.
- Wallace, J.M., McNeilly, A.S. e Baird, D.T. (1986). Induction of ovulation during anoestrus in two breeds of sheep with multiple injections of LH alone or in combination with FSH. J. Endocr. III, 181-190.
- Watson, P.F. (1975). The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. J. Reprod. Fertil., 42: 105-111.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil. Dev., 7: 871-891.
- Watson, Whitmyre, M. e Stetson, M.H. (1983). Stimulation of peak melatonin release restores sensitivity to evening melatonin injections in pinealectomised hamsters. Endocrinology, 112: 763-765.
- Watson, R.H., Sapsford, C. S. e Melance, J. (1956). The development of testis, epididymis and penis in young Merino ram. Aust. J. Agric. Res., 7: 574-590.
- Wayne, N.L., Malpaux, B.e Karsch, F.J. (1988). How does melatonin code for daylength in the ewe: Duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period. Biol. Reprod., 39: 66-75.
- Wayne, N.L., Malpaux, B.e Karsch, F.J. (1990) Photoperiodic requirements for timing onset and duration of the breeding season of the ewe: synchronization of the endogenous rhythm of reproduction. Journal of Comparative Physiology, 166: 835-842.
- Wheaton, J.E., K.M. Carlson, Windels, H.F., Johnston, L.J. (1993). CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. Anim. Reprod. Sci., 33: 127-141.

- Wheeler, A.G., Land, R.B. (1977). Seasonal variation in oestrus and ovarian activity of Finnish Landrace, Tasmanian Merino and Scottish Blackface ewes. Anim. Prod., 24: 363-376.
- Williams, H. L. (1978). Proc 28th Ann. Meeting EAAP, Brussels.
- Williams, H. L. (1984). The effects of physical and social environment on reproduction in adult sheep and goats. Proc 10th International Cong. on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 2: 31-33.
- Williams, L.M. e Helliwell, R.J.A. (1993) Melatonin and seasonality in the sheep. Anim. Reprod. Sci. 33: 159-182.
- Williams, G.L., Ruttle, J.L. e Ezaz, Z. (1976). Plasma androgen levels in yearling and mature rams. J. Anim. Sci. 43, 310 (Abstr.).
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction, 2nd edition, vol I, 189-317. E.Knobil and J.D. Neill (Editors). Raven Press Ltd. New York, USA.
- Yeates, N. T. M.(1949) The breeding season of sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. J.Agric.Sci., 39: 1-43.