

Sincronização de cios e inseminação artificial em ovelhas Churra Galega Bragançana Branca

Anderclei, Conradi¹; Mateus, Óscar²; Álvaro, Armindo³, Correia, Teresa⁴; Maurício, Raimundo⁵; Helder Quintas⁶; Valentim, Ramiro⁷

¹ anderclei.ca.conradi@alunos.ipb.pt, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

² oscarmateus@live.com.pt, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

³ acna1665@hotmail.com, Instituto Superior Politécnico do Kwanza-Sul, Angola

⁴ tcorreia@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, CIMO, Portugal

⁵ ram@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, ESA, Portugal

⁶ helder5tas@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, CIMO, Portugal

⁷ valentim@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, CIMO, Portugal

RESUMO

No Instituto Politécnico de Bragança, a raça local Churra Galega Bragançana Branca tem sido sujeita, nos últimos 3 anos, a um programa sistemático de aplicação da técnica de inseminação artificial (IA) com sémen fresco e refrigerado. O presente trabalho foi desenvolvido para testar a eficácia dos seguintes factores – administração prévia de melatonina exógena, um tratamento progestagénico curto (FGA) + eCG, dois diluidores seminais (INRA 96[®] vs. OviXcell[®]) e dois processos de preservação de sémen (Fresco vs. Refrigerado) – e os seus efeitos sobre a taxa de fertilidade aos 41 dias pós-IA. Foram ainda avaliados alguns parâmetros registados quando da IA – cor e lubrificação da mucosa vaginal, tipo de Os externo, viscosidade do muco cervical, local de deposição do sémen, refluxo cervical e inseminador.

Na primeira quinzena de Abril, todas as ovelhas Churras Bragançanas estavam cíclicas. Todas elas responderam ao tratamento FGA + eCG, independentemente de terem sido tratadas ou não com melatonina exógena. Quarenta e um dias após a inseminação artificial, 84,1% das ovelhas estavam gestantes. A taxa de fertilidade foi afectada pelo carneiro dador de sémen, pelo tipo de Os externo, pela viscosidade das secreções cervicais e pelo local de deposição do sémen. A taxa de fertilidade não foi influenciada pela administração prévia de melatonina, pelo método de preservação do sémen, pelo tipo de diluidor, pela cor e pelo grau de lubrificação da mucosa vaginal, pelo refluxo cervical ou pelo inseminador.

Palavras-Chave: ovinos; churra galega bragançana branca; sincronização de cios; inseminação artificial.

Synchronization of cios and artificial insemination in sheep Churra Galega Bragançana Branca

Anderclei, Conradi¹; Mateus, Óscar²; Álvaro, Armindo³, Correia, Teresa⁴; Maurício, Raimundo⁵; Helder Quintas⁶; Valentim, Ramiro⁷

¹ anderclei.ca.conradi@alunos.ipb.pt, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil

² oscarmateus@live.com.pt, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal

³ acna1665@hotmail.com, Instituto Superior Politécnico do Kwanza-Sul, Angola

⁴ tcorreia@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, CIMO, Portugal

⁵ ram@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, ESA, Portugal

⁶ helder5tas@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, CIMO, Portugal

⁷ valentim@ipb.pt, Instituto Politécnico de Bragança, CIMO, Portugal

ABSTRACT

For the last 3 years, Churra Galega Bragançana local ewes have been used in a program of artificial insemination (AI) with fresh and refrigerated sperm developed at the Braganza Polytechnic Institute. Present study aimed to test the efficiency of different factors – exogenous melatonin pre-treatment, a short-term progestogen treatment (FGA) + eCG, two seminal extenders (INRA 96[®] vs. OviXcell[®]) and two sperm preservation procedures (Fresh vs. Refrigerated) – on ovary activity and fertility rate at forty one days post-AI. During AI several issues were assessed: vagina mucosa color and lubrication rate, external Os type, cervical mucus viscosity, sperm deposition place, cervical reflux incidence and two inseminators skills.

All ewes were cycling at the first half of April. Short-term progestogen treatments + eCG was 100% efficient. Melatonin previous administration had no effect in the percentage of ovulated ewes. About 84.1% of ewes were pregnant at 41 days after AI. Fertility rate was condition by male sperm donor, external Os type, cervical mucus viscosity and sperm deposition place. In opposition fertility rate was not affect by exogenous melatonin pre-treatment, sperm preservation procedure, sperm extender, vagina mucosa color and lubrication, cervical reflux prevalence or inseminator.

Keywords: sheep; churra galega bragançana branca; ovarian activity synchronization; artificial insemination.

II. TRABALHO EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na cidade de Bragança, mais precisamente na Quinta do Pinheiro Manso (Latitude 41° 48' 33"N, Longitude 6° 44' 3"W e Altitude 670 metros), pertencente à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (ESA-IPB), entre 13 de Março e 8 de Julho 2016.

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

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

1.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizadas 63 ovelhas da raça Churra Galega Bragançana Branca, com idades compreendidas entre 2-10 anos (múltiparas). Todas as ovelhas tinham parido 6 meses antes do início do estudo e estavam secas há cerca de 4 meses.

1.2. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE OVÁRICA

A atividade ovárica das ovelhas foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de progesterona (P₄). A recolha das amostras de sangue foi feita com o auxílio de tubos de ensaio vacuonizados e heparinizados, através de punção da veia jugular. Após centrifugação do sangue, a 3.000 r.p.m., durante 15 minutos, procedeu-se à separação do sobrenadante (plasma sanguíneo), que foi pipetado para tubos de Eppendorf devidamente identificados. Posteriormente, estes foram congelados numa arca ultracongeladora (-70°C) (Thermo 960[®], Electron Cooperation, Marlotta, EUA) até ao momento do seu processamento.

Os níveis plasmáticos de P₄ foram determinados através da técnica de RIA (radioimunoensaio). Esta foi realizada com recurso a um leitor de

cintilações DPC® Gamma C12 (Bertholt Technologies, Bad Wildbad, Alemanha), segundo a técnica indicada pelo fabricante dos *kits* (DiaSource® ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Bélgica). Os coeficientes médios de variação intra e inter-ensaio foram, respectivamente, de 7,7 e 15,8%.

1.2.1. AVALIAÇÃO DA CICLICIDADE PRÉ-TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS

Nas duas semanas anteriores à realização dos tratamentos progestagénicos curtos + eCG (4-17 de Abril de 2017), com o objetivo de determinar o estado fisiológico das ovelhas (Cíclicas vs. Anestro), procedeu-se à colheitas de amostras de sangue, com 3-4 dias de intervalo. As colheitas foram feitas sempre no período da manhã. A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.2.

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

1.2.2. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA OVÁRICA AOS TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS + eCG

Com o intuito de identificar a formação do primeiro corpo lúteo (CL) pós-tratamentos progestagénicos curtos + eCG, nos cinco dias pós-administração de eCG, procedeu-se à recolha de amostras de sangue periférico, para posterior determinação dos níveis plasmáticos de P₄. A metodologia utilizada foi a mesma indicada no item 1.2.

Considerou-se que o primeiro CL se havia formado quando os níveis plasmáticos de progesterona ultrapassaram, pela primeira vez, os 0,5 ng/ml.

1.3. TRATAMENTOS APLICADOS

O presente trabalho teve início a 13 de Março de 2017, com a colocação de um implante subcutâneo de melatonina – 18 mg (Melovine®, CEVA, Portugal) em 26 ovelhas (grupo Melatonina) (Figura). As demais ovelhas constituíram o grupo Controlo (n = 37).

No dia 19 de Abril de 2017, todas as ovelhas (Controlo e Melatonina) receberam uma esponja vaginal impregnada com 20 mg de FGA (Chrono-

Gest[®], Intervet, Portugal) (Figura). Quando da colocação das esponjas vaginais, elas receberam uma injeção intramuscular (i.m.) de 100 µg de cloprostenol (Estrumate[®], MSD Animal Health, Portugal) – análogo sintético de Prostaglandina F_{2α}. O tratamento progestagénico teve a duração de 5 dias.

QUADRO I – Divisão das ovelhas de acordo com os tratamentos de controlo da actividade reprodutiva aplicados

Número Total de Ovelhas	
(n = 63)	
Controlo (n = 37)	Melatonina (n = 26)
PGF _{2α} + FGA (5 dias)	
(n = 63)	

Quando da remoção das esponjas vaginais (24 de Abril de 2017), todas as ovelhas receberam uma injeção i.m. de 500 UI de eCG (Intergonan[®], Intervet, Portugal).

1.4. RECOLHA DE SÉMEN

Neste estudo foram utilizados 3 carneiros (3-4 anos de idade) da raça Churra Galega Bragançana Branca. O sémen foi recolhido com recurso a vaginas artificiais pré-aquecidas a 42°C (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). De cada macho foram recolhidos 4 ejaculados: 2 no período da manhã e 2 no período da tarde. Os machos não ejaculavam há 3 dias.

Depois da colheita, os tubos colectores foram transportados para o laboratório, em menos de 10 minutos, onde foram mantidos a 37°C em um banho-maria (Grant International, Cambridge, Inglaterra). No mesmo equipamento foram conservados os diluidores seminais devidamente preparados.

1.5 – ANÁLISES SEMINAIS

O volume foi medido através da graduação dos tubos colectores e a motilidade e a concentração espermática foram estimadas com o auxílio do sistema CASA da Minitube (Androvision[®], Minitüb, Tiefenbach, Alemanha), constituído por um microscópio de contraste de fase Carl Zeiss Axio Lab A1

(Gottngun, Alemanha), com placa aquecida (37°C) e uma camera de vídeo (Basler camera A301b, Basler AG, Ahrensburg, Alemanha). Foram tiradas cerca de 30 fotos/0,5 minutos. Foram usadas lâminas não reutilizáveis com 4 câmaras Leja 20 (Leja Products, B.V., Nieuw-Vennep, Holanda). O *software* foi programado para gravar 7 campos (motilidade) e 30 campos (concentração espermática) sob contraste de fase negativo e uma ampliação de X 200. No laboratório existiam duas placas de aquecimento (37°C) que permitiam manter todos os demais materiais (pontas de pipetas, tubos, lâminas com 4 câmaras Leja 20).

Os ejaculados utilizados tinham um volume $\geq 2,1$ ml, uma motilidade progressiva $\geq 83\%$ e uma concentração espermática $\geq 2,6 \times 10^9$ espermatozoides/ml.

1.6. DOSES SEMINAIS (FRESCAS E REFRIGERADAS)

Cada ejaculado foi diluído (1:1) com um de dois diluidores comerciais: INRA 96® (IMV Technologies, L'Aigle, França) ou OviXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, França) (Quadro).

QUADRO II – Doses de sémen fresco ou refrigerado diluídos com INRA 96® ou com OviXcell®

Número Total de Ovelhas (n = 63)							
Controlo (n = 37)				Melatonina (n = 26)			
Sémen Fresco (n = 18)		Sémen Refrigerado (n = 19)		Sémen Fresco (n = 13)		Sémen Refrigerado (n = 13)	
OviXcell (n = 9)	Inra 96 (n = 9)	OviXcell (n = 9)	Inra 96 (n = 10)	OviXcell (n = 6)	Inra 96 (n = 7)	OviXcell (n = 6)	Inra 96 (n = 7)

Após 10 minutos de repouso a 37°C, a temperatura dos ejaculados recolhidos de manhã foi reduzida, durante cerca de 120 minutos, de 37°C para 15°C, com recurso a um banho-maria refrigerado (Neslab® RTE 221, Newington, EUA). Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado

para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. As palhinhas brancas continham sémen diluído com INRA 96® (n = 17) e as vermelhas sémen diluído com OviXcell® (n = 15). As inseminações ocorreram todas no intervalo máximo de 120 minutos pós-refrigeração (15°C).

Os espermatozóides recolhidos de tarde também foram diluídos (1:1) com INRA 96® ou com OviXcell®. Após 10 minutos de repouso, o sémen diluído foi aspirado para palhinhas de sémen francesas de 0,25 ml e seladas com pó polivinílico. As palhinhas brancas continham sémen diluído com INRA 96® (n = 16) e as vermelhas sémen diluído com OviXcell® (n = 15). As palhinhas de sémen refrigerado foram transportadas numa arca refrigeradora da Minitüb (Tiefenbach, Alemanha) à temperatura de 15°C. As palhinhas de sémen fresco foram transportadas num banho-maria de transporte da IMV (L'Aigle, França), a 37°C. Entre a preparação das doses seminais de sémen fresco e o começo da IA passaram menos de 30 minutos.

1.7. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL A TEMPO FIXO

Todas as ovelhas foram inseminadas, independentemente de terem manifestado cio, 55 + 1 horas depois da administração de eCG (Baril *et al.*, 1993, Greyling *et al.*, 1997, Palacios, 2010, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017, Fornazari *et al.*, 2017 e Fornazari, 2018). Começou-se por inseminar as ovelhas com sémen fresco.

As IA foram realizadas por dois inseminadores (A vs. B). Quando da IA registaram-se os seguintes parâmetros: cor da mucosa vaginal (Rosa vs. Rosa Pálido vs. Rosa Hemorrágico), grau de lubrificação vaginal (Reduzida vs. Boa vs. Intensa), tipo de Os externo (Kershaw *et al.*, 2005) (Figura), viscosidade do muco cervical (Líquida vs. Viscosa), local de deposição de sémen (Vaginal vs. 1ª prega vs. 2ª prega) e se houve refluxo (Sem vs. Ligeiro vs. Com). A deposição do sémen foi feita sempre de forma a não forçar a penetração, evitando inflamar ou ferir a mucosa do canal cervical. No procedimento, utilizaram-se vaginoscópios, sistemas de luz LED e pistoletes Quicklock® e bainhas Minitub® (Tiefenbach, Alemanha).

Terminadas as IA, o pessoal técnico envolvido retirou-se calmamente do local, as ovelhas foram libertadas e deixadas sózinhas durante 4 horas. Por

outro lado, é importante salientar que, nos 30 dias seguintes, se manteve o aporte energético/proteico da dieta.



FIGURA – Classificação do Os externo: a) bico de pato, b) aba, c) rosa, d) papila e e) fenda (Kershaw *et al.*, 2005).

1.7.1. POSIÇÃO DAS FÊMEAS DURANTE A INSEMINAÇÃO

As ovelhas foram inseminadas presas ao *cornadis* de alimentação. Para facilitar a observação de Os externo, dois membros da equipa elevaram os membros posteriores das ovelhas, mantendo, no entanto, os membros anteriores sempre em contacto com o solo.

1.8. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Quarenta e um dias (5 de Junho de 2017) após a IA (26 de Abril de 2017) procedeu-se ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia em tempo real, com o auxílio de um ecógrafo Mindray Z5Vet e de uma sonda rectal multi-frequência (5,0-10,0 MHz). A frequência mais utilizada foi a de 5,0 MHz.

1.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No início deste estudo, a idade média das ovelhas Churras Bragançanas era de $3,3 \pm 1,9$ anos (c.v. = 56,5%). As diferenças de idade registadas entre as ovelhas dos grupos Controlo e Melatonina revelaram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$) (Quadro II). Pelo contrário, as diferenças de idade encontradas entre as ovelhas dos grupos inseminados com sémen fresco ou refrigerado ($P \leq 0,001$) ou diluído com INRA 96[®] ou com OviXcell[®] diferiram de modo estatisticamente significativamente ($P \leq 0,05$). De acordo com Esmailzadeh *et al.* (2009) (citados por Santolaria *et al.*, 2011), entre os 2-7 anos de idade, a taxa de fertilidade tende a elevar-se. Santolaria *et al.* (2011) recomendam que as ovelhas só sejam inseminadas com idades compreendidas entre os 2-5 anos de idade. Anel *et al.* (2006) recomendam que, em programas de IA, não sejam utilizadas ovelhas com mais de 5 anos de idade. Fornazari (2018) recomenda a não inseminação de ovelhas com mais de 7 anos de idade.

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

	Idade (anos)	Peso (kg)	CC (pontos)
Controlo	$3,1^a \pm 2,1$	$58,5^a \pm 8,6$	$3,5^a \pm 0,6$
Melatonina	$3,6^a \pm 1,6$	$60,5^a \pm 5,0$	$3,7^a \pm 0,5$
Fresco	$2,4^a \pm 1,2$	$58,1^a \pm 7,6$	$3,6^a \pm 0,6$
Refrigerado	$4,2^b \pm 2,8$	$60,3^a \pm 9,1$	$3,6^a \pm 0,6$
INRA 96[®]	$3,8^a \pm 2,1$	$59,1^a \pm 10,2$	$3,6^a \pm 0,6$
OviXcell[®]	$2,8^c \pm 1,4$	$59,5^a \pm 7,5$	$3,6^a \pm 0,6$

a=a, para $P > 0,05$; a \neq b, para $P \leq 0,001$; a \neq c, para $P \leq 0,05$ (entre linhas, mesmo parâmetro).

As ovelhas pesavam, em média, $59,4 \pm 7,3$ kg (c.v. = 12,3%) e apresentavam uma CC média de $3,5 \pm 0,6$ (c.v. = 16,4%). As diferenças de peso corporal e de CC entre ovelhas Controlo e Melatonina, inseminadas com sémen fresco ou refrigerado, diluído com INRA 96[®] ou com OviXcell[®] foram estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). As ovelhas apresentavam um peso e uma CC média adequados à cobertura (2,5-3,5) (Scaramuzzi e Martin, 2008 e Karikari e Blasu, 2009).

2.1. ESTADO FISIOLÓGICO PRÉ-TRATAMENTOS PROGESTAGÉNICOS

Nas duas semanas anteriores à aplicação do tratamento progestagénico curto (FGA) + eCG, todas as ovelhas apresentaram em, pelo menos uma das tomas de sangue, níveis plasmáticos de progesterona superiores a 0,5 ng/ml, ou seja, estavam “cíclicas”. Este resultado é superior ao encontrado por Dendena (2017), em ovelhas da mesma raça: 74,6% ($\chi^2 = 28,6$; $P \leq 0,001$). É possível que esta diferença resulte de diferenças anuais nas condições climáticas (Anel *et al.*, 2005), que condicionam o desenvolvimento das pastagens natural, as condições climáticas e, conseqüentemente o estado de saúde e os gastos em termorregulação.

Nem a idade, nem o peso corporal, nem a CC afectaram significativamente o estado fisiológico pré-tratamentos progestagénicos curtos + eCG ($P > 0,05$). A administração prévia de melatonina também não teve qualquer efeito significativo ($P > 0,05$), provavelmente porque as ovelhas (Controlo vs. Melatonina) já estavam cíclicas.

2.2. RESPOSTA OVÁRICA AO TRATAMENTO PROGESTAGÉNICO CURTO + eCG

Nas ovelhas Churras Bragançanas Brancas, a eficácia do tratamento FGA + eCG foi total – 100,0%. Os efeitos da administração prévia de melatonina exógena foram estatisticamente não significativos ($P > 0,05$). As condições ambientais particularmente favoráveis, a ciclicidade apresentada pelas ovelhas, o seu peso e a sua CC são alguns dos factores que terão contribuído para este resultado.

No presente trabalho, quando da colocação dos implantes subcutâneos de melatonina, desconhecia-se o estado fisiológico (Cíclicas vs. Anestro) das ovelhas. A decisão de os colocar teve por objectivo melhorar as taxas reprodutivas, particularmente, se as ovelhas estivessem em anestro. De acordo com os resultados obtidos, o tratamento prévio com melatonina não influenciou a percentagem de ovelhas que ovularam em resposta ao tratamento de controlo da actividade ovárica (Controlo: 100,0% vs. Melatonina: 100,0%) ($\chi^2 = 0,0$; $P > 0,05$).

A primeira elevação dos níveis plasmáticos de progesterona (PENPP₄) foi detectado em todas as ovelhas cerca de 32 horas após a administração de eCG. A administração prévia de melatonina não afectou significativamente este parâmetro ($P > 0,05$). Ele diferiu significativamente do observado por Conradi *et al.* (2017) em ovelhas Lacaune – $50,9 \pm 33,5$ dias – e por Dendena (2017) em ovelhas Churras Bragançanas – $53,1 \pm 15,6$ horas (em 2016). Contudo, em 2017, Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018) registaram resultados semelhante aos encontrados no presente trabalho, respectivamente em ovelhas Assaf ($28,9 \pm 11,5$ dias) e ovelhas Awassi x Sarda ($30,5 \pm 12,6$ dias). Este resultados sugerem variações raciais e anuais na resposta temporal das ovelhas aos tratamentos progestagénicos curtos + eCG.

O tempo da inseminação artificial pós-tratamento de sincronização de ciclos é muito importante (Kukovics *et al.*, 2011). A melhor altura difere segundo o autor: 46 horas (Fernandez-Abella *et al.*, 2003; citados por Kukovics *et al.*, 2011), 48-72 horas (Karagiannidis *et al.*, 2001; citados por Kukovics *et al.*, 2011), 55 horas (Baril *et al.*, 1993, Valentim *et al.*, 2009, Palacios, 2010, Conradi *et al.*, 2017, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2017 e Fornazari, 2018) e 58-63 horas (Donovan *et al.*, 2004; e Donovan *et al.*, 2001; citados por Kukovics *et al.*, 2011). Apesar da PENPP₄ ter ocorrido nas primeiras 32 horas pós-administração de eCG, a realização da IA 55 horas pós-tratamento progestagénico curto e eCG resultou numa boa taxa de fertilidade aos 41 dias.

2.3. RESPOSTA À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Quarenta e um dias após a inseminação artificial, 84,1% das ovelhas Churras Bragançanas estavam gestantes. Neste trabalho, a taxa de fertilidade foi positiva quando comparada com os valores médios de fertilidade indicados na bibliografia para ovinos: 50-65% (Baril *et al.*, 1993, Ax *et al.*, 2004 e Valentim *et al.*, 2009) e 65-75% (Colas e Guérin, 1979; citados por Cognié, 1988). Vários autores referem valores de fertilidade de igualmente elevados – 70,0-82,0% (Donovan *et al.*, 2004; Donovan *et al.*, 2001; citados por Kukovics *et al.*, 2011), 74,5% (Fornazari, 2018), de 76,5% (Fornazari *et al.*, 2017), de 82,2% (Hill *et al.*, 1998 e Ehling *et al.*, 2003; citados por Kukovics *et al.*, 2011),

85,1% (Dendena, 2017), 88,0% (Conradi *et al.*, 2017) e de 80-90% (Kukovics *et al.*, 2011).

2.3.1. IDADE, PESO E CONDIÇÃO CORPORAL

A idade não afectou a taxa de fertilidade ($P>0,05$). Segundo Forcada (2010), as ovelhas com idades superiores a 10 anos apresentam uma redução significativa das funções hipotalâmicas e hipofisárias. De acordo com Fornazari (2017), esta redução surge em ovelhas Awassi x Sarda aos 8-9 anos. Anel *et al.* (2006) recomendam que, em programas de IA, não sejam utilizadas ovelhas com mais de 5 anos de idade. Fornazari (2018) sugere que se evite a inseminação de ovelhas com mais de 7 anos de idade. No presente trabalho, apenas 6 ovelhas tinham mais de 5 anos e 3 mais de 7 anos de idade.

Nem o peso nem a CC condicionaram a taxa de fertilidade ($P>0,05$). Para além das ovelhas estarem secas há cerca de 4 meses, o regime alimentar praticado era adequado, como demonstra o peso e a CC média (3,5 pontos). Segundo O'Brein (2002), Scaramuzzi e Martin (2008) e Karikari e Blasú (2009) a CC ideal, no momento da inseminação, deve situar-se entre 2,5-3,5 pontos.

2.3.2. MELATONINA EXÓGENA

Em França, a administração de melatonina exógena melhora as taxas reprodutivas de fertilidade e de prolificidade (Valentim *et al.*, 2006 e Forcada, 2010). Em Espanha, os seus efeitos são evidentes essencialmente no que se refere à taxa de prolificidade (Forcada, 2010). A melhoria da taxa de fertilidade está associada à indução da actividade ovárica (Forcada, 2010). No presente estudo, a administração prévia de melatonina exógena não influenciou a taxa de fertilidade (Controlo: 86,5% vs. Melatonina: 84,0%) ($\chi^2 = 0,2$; $P>0,05$). É possível que este resultado esteja relacionado com o facto de todas as ovelhas já estarem cíclicas quando da aplicação do tratamento progestagénico curto + eCG. Contudo, há que ter presente que os efeitos de um bom regime alimentar podem camuflar os efeitos positivos da administração de melatonina exógena sobre as taxas reprodutivas (Valentim

et al., 2006 e Forcada, 2010). O mesmo sucede com os tratamentos progestagénicos + gonadotropinas (Valentim *et al.*, 2006).

2.3.3. CARNEIRO

Segundo Anel *et al.* (2005), o carneiro dador de sémen influencia significativamente a taxa de fertilidade pós-inseminação artificial cervical, particularmente quando esta é feita com sémen refrigerado. Salamon e Maxwell (2000) acreditam que estas diferenças entre carneiros podem ter tanto origem genética como ambiental. Neste trabalho foram usados 3 carneiros como dadores de sémen. As diferenças de fertilidade entre carneiros foram estatisticamente significativa (Carneiro 219: 87,5% vs. Carneiro 220: 91,7% vs. Carneiro 224: 78,5%) ($\chi^2 = 8,6$; $P \leq 0,05$). As diferenças de fertilidade observadas entre os carneiros 219 e 220 e os carneiros 219 e 224 revelaram-se estatisticamente não significativas ($P > 0,05$). Pelo contrário, as diferenças de fertilidade registadas entre os carneiros 220 e 224 foram estatisticamente significativas ($\chi^2 = 7,7$; $P \leq 0,01$). Nos ovinos de leite, os machos reprodutores influenciam a taxa de fertilidade pós-IA (Campbell *et al.*, 1996, Anel *et al.*, 2005, Anel *et al.*, 2006 e Fornazari, 2018). Todavia, Conradi *et al.* (2017) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre carneiros Lacaune.

2.3.4. MÉTODO DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN

De um modo geral, as taxas de fertilidade são mais altas após inseminação com sémen fresco do que com sémen refrigerado (Aral *et al.*, 2011). No presente trabalho, a taxa de fertilidade também não variou significativamente em função da técnica de preservação do sémen utilizada (Fresco: 80,6% vs. Refrigerado: 87,5%) ($\chi^2 = 1,7$; $P > 0,05$). No mesmo sentido, Fornazari *et al.* (2017) (Fresco: 81,3% vs. Refrigerado: 72,2%) e Fornazari (2018) (Fresco: 78,6% vs. Refrigerado: 70,4%) não encontraram diferenças estatisticamente significativas na taxa de fertilidade pós-IA com sémen fresco ou com sémen refrigerado. Pelo contrário, Dendena (2017) obteve uma taxa de fertilidade superior entre as fêmeas IA com sémen refrigerado do que com sémen fresco (Fresco: 79,4% vs. Refrigerado: 90,9%). Conradi *et al.* (2017)

também observou uma elevada taxa de fertilidade com sêmen refrigerado (88,0%).

2.3.5. DILUIDOR SEMINAL

O tipo de diluidor seminal não afectou significativamente a taxa de fertilidade (INRA 96[®]: 90,9% vs. OviXcell[®]: 83,3%) ($\chi^2 = 2,8$; $P > 0,05$). Fornazari *et al.* (2017) obteve resultados semelhantes (Andromed[®]: 77,8% vs. OviXcell[®]: 75,0%). A taxa de fertilidade obtida após IA com sêmen diluído com OviXcell[®] foi igual à registada por Fornazari *et al.* (2017) ($\chi^2 = 1,9$; $P \leq 0,05$). Dendena (2017) também não encontrou diferenças significativas nas taxas de fertilidade associadas ao tipo de diluidor seminal utilizado (Andromed[®]: 83,9% vs. INRA 96[®]: 83,3%). Ainda que o INRA 96[®] tenha sido desenvolvido para preservar sêmen de equino e o OviXcell[®] para preservar sêmen de ovino, os efeitos de ambos sobre a fertilidade do sêmen diluído de carneiros Churros Bragançanos são iguais.

2.3.6. Os EXTERNO

No presente trabalho foram encontrados todos os tipos de Os externo da Tabela de Kershaw *et al.* (2005) (Quadro IV). O mesmo sucedeu no trabalho desenvolvido por Conradi *et al.* (2017), Dendena (2017), Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018). No presente trabalho, a distribuição percentual foi relativamente uniforme, com excepção do tipo Fenda (mais elevada). Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018) também encontraram uma distribuição percentual relativamente uniforme, com excepção do tipo Aba (mais reduzida). A distribuição percentual registada no presente trabalho e por Dendena (2017), em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana, por Fornazari *et al.* (2017), em ovelhas da raça Assaf, e Fornazari (2018), em ovelhas Awassi x Sarda, foi diferente e reflecte possíveis diferenças genéticas, de idade e do número de partos (Kershaw *et al.*, 2005 e Aral *et al.*, 2011).

O tipo de Os externo influenciou a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 14,5$; $P \leq 0,01$) (Quadro IV). O mesmo foi verificado por Conradi *et al.* (2017), Dendena (2017), Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018). No presente trabalho, os

que produziram taxas de fertilidade mais elevadas foram a Aba (90,9%) e a Fenda (89,5%). O Papila (75,0%) e o Bico de Pato (77,8%) determinaram as piores taxas de fertilidade. O Rosa resultou num valor intermédio (83,3%). Conradi *et al.* (2017) obteve os melhores resultados com os tipos Bico de pato (100%), Papila (100%) e Fenda (100%). Dendena (2017) encontraram as melhores taxas de fertilidade com os tipos Papila e Fenda. Fornazari *et al.* (2017) registou as melhores taxas de fertilidade com os tipos Bico de pato (85,7%), Papila (100,0%), Fenda (88,9%) e Rosa (80,0%). Por seu turno, Fornazari (2018) observou a melhor taxa de fertilidade após IA com o tipo Aba (83,3%).

QUADRO IV – Configuração anatómica da entrada no canal cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Os externo	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Bico de Pato	14,3% ^a (9/63)	77,8% ^x (7/9)
Aba	17,5% ^{a,c} (11/63)	90,9% ^y (10/11)
Rosa	19,0% ^{a,b} (12/63)	83,3% ^{x,y} (10/12)
Papila	19,0% ^{a,b} (12/63)	75,0% ^x (9/12)
Fenda	30,2% ^b (19/63)	89,5% ^y (17/19)

a=a e b=b, para P>0,05; b≠c, para P≤0,05; a≠b, para P≤0,01; x=x e y=y, para P>0,05; x≠y, para P≤0,01 (entre linhas, mesmo parâmetro).

2.3.7. COR DA MUCOSA E LUBRIFICAÇÃO VAGINAL E VISCOSIDADE DAS SECREÇÕES CERVICAIS

Todas as ovelhas Churras Bragançanas apresentavam uma mucosa vaginal de cor rosa (100,0%). Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018) obtiveram resultados iguais. Conradi *et al.* (2017) e Dendena (2017) encontraram maioritariamente uma mucosa vaginal de cor rosa. No presente trabalho, o grau de lubrificação vaginal variou significativamente entre ovelhas ($\chi^2 = 62,0$; P≤0,001) (Quadro V).

QUADRO V – Tipo de lubrificação na entrada do canal cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Lubrificação	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Reduzida	9,5% ^a (6/63)	83,3% ^x (5/6)
Boa	61,9% ^b (39/63)	87,2% ^x (34/39)
Abundante	28,6% ^c (18/63)	88,9% ^x (16/18)

a≠b, a≠c e b≠c, para P≤0,001; x=x, para P>0,05 (entre linhas, mesmo parâmetro).

No presente trabalho, o grau de lubrificação não afectou significativamente a taxa de fertilidade ($\chi^2 = 1,6$; $P > 0,05$). O mesmo foi referido por Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018). Conradi *et al.* (2017) e Dendena (2017) observaram melhores taxas de fertilidade quando a lubrificação é abundante.

Cerca de 76,5% das ovelhas apresentaram um muco cervical líquido e 23,8% um muco cervical viscoso ($\chi^2 = 54,1$; $P \leq 0,001$). Dendena (2017) também observou maioritariamente uma lubrificação líquida. Conradi *et al.* (2017), Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018) verificaram que 100% das ovelhas apresentavam um muco cervical líquido. Os resultados encontrados relacionam-se, certamente, com os tratamentos aplicados, com o momento em que surgiu a PENPP₄ e o momento em que se procedeu à IA e mostram que as ovelhas estavam bem alimentadas, saudáveis e maioritariamente num período avançado da fase folicular.

As secreções cervicais líquidas facilitam a entrada e a progressão dos espermatozóides através do canal cervical (McKusick *et al.*, 1998 e El-Shahat e Alsafy, 2009). No presente trabalho, verificou-se precisamente o oposto. A taxa de fertilidade foi superior entre as ovelhas que apresentaram secreções cervicais viscosas do que entre aquelas que revelaram secreções cervicais líquidas (Líquidas: 81,3% vs. Viscosas: 93,3%) ($\chi^2 = 6,4$; $P \leq 0,05$).

2.3.8. LOCAL DE DEPOSIÇÃO DE SÉMEN

Na inseminação cervical, a taxa de fertilidade é maior quanto mais profundamente for deixado o sémen (Candappa e Bartlewski, 2011). De acordo com Kaabi *et al.* (2006) (citados por Anel *et al.*, 2006), as raças espanholas com menores taxas de fertilidade (Assaf e Churra) têm um cérvix mais complexo que impede a sua penetração profunda. No presente trabalho, o sémen foi depositado maioritariamente após a 1ª prega (Quadro VI).

A melhor taxa de fertilidade verificou-se nas IA cervicais menos profundas (pós-1ª prega) ($\chi^2 = 12,6$; $P \leq 0,001$). Resultado contrário foi observado por Conradi *et al.* (2017). Nos estudos de Fornazari *et al.* (2017) e Fornazari (2018), as melhores taxas de fertilidade foram conseguidas após IA cervical. Pelo contrário, Dendena (2017) registou as piores taxas de fertilidade

nas inseminações cervicais mais profundas. Mais, as IA vaginais produziram uma taxa de fertilidade igual à conseguida após a ultrapassagem da 1ª prega.

QUADRO VI – Local da deposição do sémen (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Local deposição do sémen	Percentagem	Taxa de Fertilidade
1ª prega	95,2% ^a (60/63)	88,3% ^x (53/60)
2ª prega	4,8% ^b (3/63)	66,7% ^y (2/3)

a≠b, para P≤0,001; x≠y, para P≤0,001 (entre linhas, mesmo parâmetro).

2.3.9. REFLUXO VAGINAL

As ovelhas que produzem refluxo cervical apresentam taxas de fertilidade mais baixas (Candappa e Bartlewski, 2011 e Morrell, 2011). O refluxo cervical deve ser evitado (Cseh *et al.*, 2012, Dendena, 2017 e Fornazari *et al.*, 2017), particularmente quando este é abundante (Dendena, 2017). De acordo com Marcus (1982) (citados por Santolaria *et al.*, 2011), Cseh *et al.* (2012) e Mehr *et al.* (2013), a inseminação cervical de uma pequena (2,5 ml), mas concentrada dose de sémen (200 x 10⁶ espermatozoides), é a mais apropriada a um cérvix difícil de ultrapassar, possibilitando uma redução da ocorrência de refluxo cervical.

QUADRO VII – Refluxo cervical (percentagem) e sua relação com a taxa de fertilidade

Refluxo Seminal	Percentagem	Taxa de Fertilidade
Sem	55,6% ^a (35/63)	85,7% ^x (30/35)
Ligeiro	44,4% ^b (28/63)	82,1% ^x (23/28)

a=a, para P>0,05; x=x para P>0,05 (entre linhas, mesmo parâmetro).

No presente trabalho, a percentagem de ovelhas que apresentou refluxo cervical foi estatisticamente igual à das ovelhas que não o fizeram ($\chi^2 = 2,8$; P>0,05) (Quadro VII). No estudo realizado por Dendena (2017), a maioria das ovelhas Churras Bragançanas não fez refluxo cervical. O mesmo resultado foi observado por Conradi *et al.* (2017), em ovelhas Lacaune, Fornazari *et al.* (2017), em ovelhas Assaf, e Fornazari (2018), em ovelhas Awassi x Sarda.

A taxa de fertilidade não foi significativamente influenciada pela ocorrência ou não de refluxo cervical ($\chi^2 = 0,6$; P>0,05). Segundo Dendena (2017), as taxas de fertilidade são superiores quando não existe refluxo ou

particularmente quando este é ligeiro. No mesmo sentido, Fornazari (2018) registou a melhor taxa de fertilidade entre as ovelhas que apresentaram um refluxo vaginal ligeiro. O contrário foi encontrado por Fornazari *et al.* (2017). Por seu turno, Conradi *et al.* (2017) não estabeleceram qualquer relação estatisticamente significativa entre a ausência de refluxo ou a ocorrência de um refluxo ligeiro.

2.3.10. INSEMINADOR

Na inseminação artificial, a taxa de fertilidade depende do inseminador (Gordon, 1997, Donovan *et al.*, 2004 e Anel *et al.*, 2005). A ultrapassagem do canal cervical depende muito da aptidão do inseminador (Eppleston e Maxwell, 1993; citados por Santolaria *et al.*, 2011). No presente trabalho, a taxa de sucesso do inseminador A foi estatisticamente igual à do inseminador B (A: 84,4% vs. B: 90,0%) ($\chi^2 = 1,5$; $P > 0,05$), o que revela a experiência e a qualidade técnica de ambos. O mesmo foi observado por Conradi *et al.* (2017). Pelo contrário, Dendena (2017) identificou diferenças de fertilidade associadas ao inseminador.

3. CONCLUSÕES

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

- Na primeira quinzena de Abril, todas as ovelhas Churras Bragançanas estavam cíclicas.
- Todas as ovelhas responderam ao tratamento FGA + eCG, independentemente de terem sido tratadas ou não com melatonina exógena.
- Quarenta e um dias após a inseminação artificial, 84,1% das ovelhas Churras Bragançanas estavam gestantes.
- A taxa de fertilidade foi significativamente influenciada pelo carneiro dador de sémen (Carneiro 220: 91,7% vs. Carneiro 224: 78,5%), pelo tipo de Os externo, pela viscosidade das secreções cervicais (Líquidas: 81,3% vs. Viscosas: 93,3%) e pelo local de deposição do sémen (1ª prega: 88,3% vs. 2ª prega: 66,7%).
- A taxa de fertilidade não foi significativamente alterada pela administração prévia de melatonina (Controlo: 86,5% vs. Melatonina: 84,0%), pelo método de preservação do sémen (Fresco: 80,6% vs. Refrigerado: 87,5%), pelo tipo de diluidor (INRA 96®: 90,9% vs. OviXcell®: 83,3%), pela cor (Rosa: 100%) e pelo grau de lubrificação (Reduzida: 83,3% vs. Boa: 87,2% vs. Abundante: 88,9%) da mucosa vaginal, pelo refluxo cervical (Sem: 85,7% vs. Ligeiro: 82,1%) ou pelo inseminador (A: 84,4% vs. B: 90,0%).

III –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E. e de Paz., P., 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, **41** (Suppl. 2), 30-42.
- Anel, L., Kaabi, M., Abroug, B., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., de la Fuente, L.F. e de Paz., P., 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in Churra ewes: A field assay. *Theriogenology*, **63**, 1235-1247.
- Aral, F., Temamoğullari, F. e Aral, S.S., 2011. Mechanical and pharmacologic applications of artificial insemination in ewes. *In: Veterinary Medicine and Science*, M. Manafi (Ed.), Cap 14, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B. e Bellin, M.E., 2004. Inseminação artificial. *In: Reprodução Animal*, Hafez, E.S.E. e Hafez, B. (Eds), 7ª edição, Manole Editor, São Paulo, Brasil, 531 pp.
- Baril, G., Chemineau, P., Cognié, Y., Guérin, Y., Leboeuf, B., Orgeur, P. e Vallet, J.-C., 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins. *In: Étude FAO Production et Santé Animales*, Roma, Itália, 193 pp..
- Campbell, J.A., Harvey, T.G., McDonald, M.F. e Sparksman, R.I., 1996. Transcervical insemination in sheep: An anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, **45**, 1535-1544.
- Candappa, I.B.R. e Bartlewski, P.M., 2011. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, **3**, 162-175.
- Cognié, Y., 1988. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *INRA Prod Anim*, **1** (2), 83-92.

- Conradi, A., Correia, T., Mateus, O., Quintas, H., Maurício, R., Francisco, L., Fornazari, R., Pereira, F., Álvaro, A. e Valentim, R., 2017. Controlo Reprodutivo e Inseminação artificial com sémen refrigerado em ovelhas da raça Lacaune. *In: Actas do II Encontro Nacional das Escolas Superiores Agrárias, Elvas, Portugal. (In Press)*
- Cseh, S., Faigl, V. e Amiridis, G.S., 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, **130**, 187-192.
- Dendena, M.W., 2017. Controlo da actividade reprodutiva e inseminação artificial em ovelhas da raça Churra Galega Bragançana. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal, 52 pp.. (*Tese de Mestrado*)
- Donovan, A., Hanrahan, J.P., Kummen, E., Duffy, P. e Boland, M.P., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Animal Reproduction Science*, **84**, 359-368.
- Dunn, O.J., 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, **56**, 52-64.
- El-Shahat, K.H.M. e Alsafy A.M., 2009. The anatomical structures of sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating catheter into the uterine lumen. *Veterinary Medicine Journal of Giza*, **57** (2), 211-222.
- Forcada, F., 2010. Control de la actividad reproductiva mediante el tratamiento con melatonina. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*, J.A. Abecia e F. Forcada (Eds), Editora Servet, Saragoça, Espanha, 195 pp..
- Fornazari, R., 2018. Sincronização deaios e inseminação artificial em ovelhas Awassi x Sarda. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, Portugal. (*In Press*)
- Fornazari, R., Mateus, O., Correia, T., Quintas, H., Maurício, R., Conradi, A., Francisco, L., Álvaro, A. e Valentim, R., 2017. Sincronização deaios e inseminação artificial com sémen fresco e refrigerado em ovelhas da raça Assaf. *In: Actas do II Encontro Nacional das Escolas Superiores Agrárias, Elvas, Portugal. (In Press)*

- Gordon, I., 1997. Controlled reproduction in sheep and goats, CABI Publishing University Press, Cambridge, Reino Unido, 450 pp..
- Greyling, J.P.C., Erasmus, J.A., Taylor, G.J. e Van der Merwe S., 1997. Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Ruminant Research*, **26**, 137-143.
- Karikari, P.K. e Blasu, E.Y., 2009. Influence of nutritional flushing prior to mating on the performance of West African Dwarf goats mated in the rainy season. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8** (7), 1068-1073.
- Kershaw, C.M., Khalid, M., McGowan, M.R., Ingram, K., Leethongdee, S., Wax, G., Scaramuzzi, R.J., 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, **64**, 1225-1235.
- Kukovics, S., Gyökér, S., Németh, T. e Gergátz, E., 2011. Artificial insemination of sheep – possibilities, realities and techniques at the farm level. *In: Veterinary Medicine and Science*, M. Manafi (Ed.), Cap 3, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- McKusick, B.C., Thomas, D.L., Gottfredson, R.G., Zelinsky, R.D. e Berger, Y.M., 1998. A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes. *In: Proceedings 46th Annual Spooner Sheep Day*, Universidade do Wisconsin-Madison, Wisconsin, EUA, 69-76 pp.
- Mehr, M.R.-A., Chambary, B. e Hossein-Zadeh, N.G., 2013. Effect of different diluents and storage time on field fertility of cooled ram semen after vaginal insemination. *Small Ruminant Research*, **115** (1-3), 82-85.
- Morrell, J.M., 2011. Artificial insemination: Current and future trends. *In: Artificial insemination in farm animals*, M. Manafi (Ed), InTech, Rijeka, Croácia, 300 p..
- O'Brein, A., 2002. Flushing the ewe flock: Is it beneficial? *In: Animal Science FactSheets*, Ministério da Agricultura e Alimentação, Ontário, Canadá, 2 pp..

- Palacios, C.R., 2010. Manejo del semen e inseminación artificial. *In: Manejo reproductivo en ganado ovino*. A.M. Abecia, y F.M. Forcada. (Eds), Editora SERVET, Saragoça, España, 216 pp..
- Russel, A.J.F., Doney, J.M. e Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of fat in live sheep. *J Agr Sci*, **72**, 451-454.
- Salamon, S. e Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 77-111.
- Santolaria, P., Palacin, I. e Yaniz, J., 2011. Management factors affecting fertility in sheep. Cap 11, InTech, Rijeka, Croácia, 312 pp..
- Scaramuzzi, R.J. e Martin, G.B., 2008. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reprod Dom Anim*, **43** (Suppl 2), 129-36.
- Snedecor, G.W. e Cochran, W.G., 1980. Statistical methods. 7ª Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 185 pp..
- Steel, R.G.D. e Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. 2ª Edição, McGraw-Hill Company, Nova Iorque, EUA, 633 pp..
- Steyn, J.J., 2003. Application of artificial insemination (AI) on commercial sheep and goat production. *In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte*, 2. Simpósio Internacional sobre Agronegócio da Caprinocultura Leiteira. EMEPA-DA, João Pessoa, Brasil, 367-379.
- Valentim, R., Fernandes, M., Azevedo, J., Mendonça, A., Almeida, J., Velasco, H., Simões, J., Fontes, P., Maurício, R., Cardoso, M., y Correia, T., 2009. Antecipación de la estación reproductiva en ovejas de la raza Churra Galega Bragançana. Inseminación artificial. *In: 34 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Barbastro, Espanha, 403-407.
- Valentim, R.C. Correia, T.M. e Azevedo, J.M., 2006. Utilização de implantes de melatonina em ovinos. *Albêitar Portuguesa*, **2** (6), 18-22.