

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PAULA FERNANDA DE SOUSA BRAGA

**RELAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DOS ESPERMATOZOIDES NO
OVIDUTO DE PERUAS COM A FERTILIDADE E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS

2016

PAULA FERNANDA DE SOUSA BRAGA

**RELAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DOS ESPERMATOZOIDES NO
OVIDUTO DE PERUAS COM A FERTILIDADE E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B813r
2016 Braga, Paula Fernanda de Sousa, 1987
Relação do tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com a fertilidade e desenvolvimento embrionário / Paula Fernanda de Sousa Braga. - 2016.
57 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Peru (Ave) - Teses. 3. Reprodução animal - Teses. 4. Espermatozoides - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**RELAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DOS ESPERMATOZOIDES NO
OVIDUTO DE PERUAS COM A FERTILIDADE E DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO**

Dissertação aprovada para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (MG), pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 26 de Agosto de 2016.

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Belchiolina Beatriz Fonseca, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Susana Elisa Rieck, IFTM/MG

Aos meus pais, Jair e Maria José.

Minha irmã Joyce e meu cunhado Saulo.

Meu noivo Ricardo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e aos meus anjos da guarda por ouvirem minhas orações e sempre me guiarem no caminho do bem.

Aos meus pais, Jair e Maria José, pelo amor incondicional e por postergarem seus sonhos em prol dos meus.

À minha irmã, Joyce (mais conhecida como Tchonguinha), como sempre pelo exemplo de pessoa positiva e por me encorajar a enxergar a vida do melhor ângulo possível (minha melhor psicóloga).

Ao meu cunhado Saulo, pelo exemplo de persistência, responsabilidade, compromisso e disciplina. E por me entender tão bem, digno de um irmão.

Ao meu noivo Ricardo, pelo companheirismo nas lutas de todos os dias, paciência e por me oferecer o mais singelo amor que já recebi. Também por cuidar dos preparativos do casamento com tanto carinho. Prometo que agora vou participar dos preparativos e me apresentar para o padre.

À minha sogra Anjinha, quem me inspira nos meus objetivos de vida. Meu sogro Gelcimar, à Tia Joca, Tio Josué, Marinoca e Marcelinho, por estarem presentes como família no meu dia-a-dia.

Ao meu orientador, Beletti, pela paciência e por não deixar de acreditar no meu trabalho. Obrigada também pelas palavras sinceras, puxadas de orelha, que só contribuíram para meu crescimento.

Ao Juliano Biava, gerente agropecuário, quem reconheceu meu esforço e me permitiu abdicar de horas de trabalho para cumprimento dos créditos. Meu sincero agradecimento.

Ao Francisco (Chiquinho), por me apoiar nos meus projetos mais loucos e me incentivar a fazê-los. Grande exemplo de proatividade e sucesso. Te desejo o melhor, sempre.

Ao Camilo Lellis, quem me acompanhou por noites e noites após dias exaustivos de expediente para realizar as análises laboratoriais mesmo com criança para pegar na escola e dar comida. Obrigada pela força!

Aos colegas de trabalho, Adriana, Kátia, Valmor, Marcelinho, por serem referências de ótimos profissionais que gostam do que fazem e trabalham com muita responsabilidade. Saibam que me inspiro em cada um de vocês.

Ao meu supervisor e colega de trabalho, José Henrique, pelas palavras de motivação, reconhecimento e por me dar força em tudo que preciso. Zé, tenho certeza que sua carreira será um sucesso!

À Professora Tatiana e à Isabelle, da Universidade Estadual de Maringá, pelo compartilhamento de experiências e colaboração no trabalho. Considero vocês um presente que o mestrado me deu.

À Professora Belchiolina Beatriz Fonseca, por me auxiliar com as análises estatísticas e estar sempre de prontidão. Um dia quero ser como você, não só pela sua competência, mas também pela cara de novinha!

Aos meus aluninhos de inglês, Rubinho, Chiquinho, Sônia, Symone, Mariluce e Camilo, pela paciência em ficar sem aulas na fase final do mestrado. Prometo voltar às aulas e levar bastante musiquinha pra gente treinar "linking sounds". Depois a gente ainda pode drink beer juntos, se vocês quiserem!

À empresa BRF, por doar parte dos recursos para esse trabalho e permitir que o trabalho fosse realizado.

Aos animais que fizeram parte do meu estudo, meu respeito.

À todas as pessoas que contribuíram para a conclusão do meu trabalho, as quais poderia citar inúmeros nomes, muito obrigada por fazerem parte da minha caminhada. Levarei um pouquinho de cada um comigo!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

O trabalho objetivou determinar a relação do tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com a fertilidade e desenvolvimento embrionário. O experimento foi realizado em uma fazenda de reprodutores de perus, da linhagem Nicholas 700, localizada no município de Uberlândia. Um grupo de 140 peruas, de 54 semanas de idade, foi mantido sem inseminação durante o período de 30 dias. Após esse período, as fêmeas foram inseminadas todas no mesmo dia com sêmen fresco diluído, proveniente de um grupo de machos da mesma idade. Durante os 30 dias seguintes, não foi realizada nenhuma outra inseminação. Nesse período, os ovos foram coletados entre as 7h e 18h, a cada 40 minutos e armazenados em uma sala com temperatura de 19°C. Metade dos ovos era encaminhada a cada 02 dias para o laboratório, para análise da perfuração espermática na membrana perivitelina interna na região do disco germinativo, e a outra metade, encaminhada até o incubatório. Os ovos foram reunidos em três grupos: de dois a seis dias (G1), de sete a 20 dias (G2) e de 21 a 30 dias (G3) após a inseminação, totalizando aproximadamente 1500 ovos coletados. Durante a incubação, foram realizadas as seguintes avaliações: fertilidade aos 14 dias (%), eclosão (%) e fases de mortalidade embrionária (%). A média dos números de perfuração espermática na membrana perivitelina interna foi analisada por teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Para verificar a relação entre o tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com a fertilidade e desenvolvimento embrionário foi realizado o teste de correlação linear ($\alpha=0,05$) entre as variáveis avaliadas. Houve diferença estatisticamente significativa para a análise de perfurações espermáticas na membrana perivitelina interna com o passar dos dias após a inseminação. O tempo de armazenamento dos espermatozoides apresentou correlação positiva e significativa com mortalidade embrionária na segunda e quarta fases do desenvolvimento embrionário e negativa e significativa com a fertilidade aos 14 dias e eclosão dos ovos. Já o número de perfurações apresentou correlação significativa e positiva apenas com a fertilidade aos 14 dias de incubação. O número de perfurações na membrana perivitelina sete dias após a inseminação demonstra a necessidade de inseminações com intervalo semanal, para que não haja perda na eficiência reprodutiva. A correlação positiva entre o número de perfurações e a fertilidade demonstra que esta metodologia é eficiente para avaliação da fertilidade. Já as correlações positivas entre o tempo de armazenamento e a mortalidade embrionária na segunda e quarta fases, e negativa com a eclosão demonstram que além de diminuir a fertilidade, o maior tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas também gera alterações nos espermatozoides que não interferem na sua capacidade fecundante, mas interferem na formação do embrião.

Palavras-chave: Taxa de Eclosão, Membrana Perivitelina, *Meleagris gallopavo*, Eficiência Reprodutiva.

ABSTRACT

This study aimed to determine the relation between the sperm storage time in the oviduct of turkey hens with fertility and embryo development. The experiment was conducted on a Nicholas 700 strain breeding turkeys' farm, in Uberlândia. A group of 140 turkey hens, with 54 weeks old, was maintained without insemination during 30 days. After this period, the females were all inseminated on the same day with diluted fresh semen, from a group of males with the same age. During the following 30 days, no other insemination was performed. At this period, the eggs were collected between 7am and 6pm, every 40 minutes and stored in a room under 19°C of temperature. Half of the eggs was sent every 02 days to the laboratory for analysis of sperm holes in the inner perivitelline layer on the germinal disc region and the other half, referred to the hatchery. The eggs were divided into three groups of two to six days (G1), seven to 20 days (G2) and 21 to 30 days (G3) after insemination, totalling around 1500 eggs collected. During incubation, the following assessments were performed: fertility at 14 days after incubation (%), hatchability (%) and embryonic mortality stages (%). The average sperm holes number in the inner perivitelline layer was analyzed by Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$). To verify the relation between the sperm storage time in the oviduct of turkey hens with fertility and embryo development, the linear correlation test ($\alpha = 0.05$) was performed between the variables evaluated. There was a statistically significant difference for the analysis of sperm holes in the inner perivitelline layer over the days after insemination. The sperm storage time showed a positive and significant correlation with embryo mortality at second and fourth stages of embryonic development and negative and significant with fertility at 14 days and hatchability. The number of sperm holes showed a significant positive correlation only with fertility after 14 days of incubation. The number of sperm holes in the inner perivitelline layer seven days after insemination demonstrates the necessity of weekly inseminations, so there is no loss in reproductive efficiency. The positive correlation between the number of sperm holes and fertility demonstrates that this methodology is effective for the fertility assessment. The positive correlations between the storage time and embryonic mortality in the second and fourth stages, and negative with the hatchability, show that besides reducing fertility, the long sperm storage time in the oviduct of turkey hens also provides changes in sperm cells that do not interfere with their fertilizing capacity but interfere with the embryo formation.

Keywords: Hatchability. Perivitelline Layer. *Meleagris gallopavo*. Reproductive Efficiency.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASEG	Análises em série da expressão gênica
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
JUV	Junção útero-vaginal
MPE	Membrana perivitelina externa
MPI	Membrana perivitelina interna
SSEH	Solução Salina Equilibrada de Hanks
TAE	Túbulos de armazenamento de espermatozoides

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS GERAIS	13
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4	REFERENCIAL TEÓRICO	13
4.1	Anatomia e fisiologia da vagina e do útero.....	13
4.2	Túbulos de armazenamento de espermatozoides (TAE)	14
4.3	Vagina: seleção espermática, transporte e armazenamento. 18	
4.4	Avaliação da fertilidade através da membrana perivitelina... 22	
4.5	Armazenamento do sêmen de aves	24
4.5.1	<i>Coleta de sêmen</i>	<i>24</i>
4.5.2	<i>Inseminação artificial</i>	<i>25</i>
4.5.3	<i>Armazenamento de sêmen líquido</i>	<i>28</i>
4.6	Desenvolvimento embrionário em aves de corte	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	Local	33
5.2	Coleta de ovos	34
5.3	Avaliação das perfurações espermáticas	35
5.4	Avaliação no incubatório	35
5.5	Análise estatística	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A produção de perus vem crescendo de maneira acentuada no Brasil e tem se tornado muito competitiva e altamente especializada. Em muitos casos a criação de perus tem sido uma alternativa para as famílias que anteriormente dedicavam-se à produção de frangos de corte, tornando-se sua principal atividade. Nos estados do Sul, especialmente na região da serra gaúcha, a criação de perus tem experimentado acentuada expansão. O agronegócio avícola brasileiro movimenta em torno de 10 bilhões de dólares ao ano, representando 2% do PIB do país. Emprega 2 milhões de pessoas, em suas atividades diretas e indiretas, e tem crescido a uma taxa de cerca de 10% ao ano (MENDES; SALDANHA, 2004).

Em 2015, o Brasil abateu 326.627 milhões de perus, 327.179 mil toneladas de carne (UBA, 2003), o que representou 17,01% de acréscimo sobre a produção de dez anos atrás, quando a produção total alcançou 271,4 mil toneladas (ABPA, 2016). É cada vez mais importante que tecnologias que melhorem a eficiência produtiva e reprodutiva sejam estudadas e implementadas nos sistemas de produção para viabilizar o atendimento da demanda mundial de alimentos.

A presença de espermatozoides em ovos de aves foi demonstrada pela primeira vez por Bobr et al. (1964), que descobriu pequenas quantidades na gema e maior quantidade na membrana perivitelina externa. Posteriormente, verificou-se que a fertilidade dos ovos era determinada pela quantidade de espermatozoides por unidade de área (WISHART, 1987). Estes achados mostram que os aspectos quantitativos da relação espermatozoide/ovo são fundamentais para o entendimento do processo que sustenta a fertilidade nas aves.

Para ter acesso ao ovócito, o espermatozoide deve penetrar a membrana perivitelina interna, que consiste em uma camada proteica abaixo das células da granulosa dos folículos ovarianos (BAKST; HOWARTH, 1997; OKAMURA; NISHIYAMA, 1978). As perfurações, ou pontos de hidrólise, foram primeiramente identificadas por microscopia eletrônica e foram notadas, embora sem evidência quantitativa, em maior frequência na região da membrana perivitelina interna subjacente ao disco germinativo (BAKST; HOWARTH, 1997). Logo após, identificou-se que estas perfurações poderiam ser identificadas e quantificadas após coloração

da membrana perivitelina com PAS-Schiff (BRAMWELL; HOWARTH, 1992; BRAMWELL et al., 1995).

Uma melhor forma de quantificar a eficiência da reprodução é estimar o número de espermatozoides que interagem com o ovócito no infundíbulo. Isso pode ser identificado em ovos, tanto através da observação de espermatozoides na membrana perivitelina externa, quanto por furos produzidos pelo espermatozoide na membrana perivitelina interna. Este último, é influenciado pela dose de inseminação, quantidade de espermatozoide no oviduto e a probabilidade de fertilização, não apenas para um ovo, mas para os ovos subsequentes da mesma ave. Além disso, estudos sobre transferência de espermatozoides nos ovos levantam importantes questionamentos sobre a eficiência da resposta das peruas à inseminação artificial (BAKST, 1987).

Os sistemas utilizados para avaliar a fertilidade na avicultura têm, por si mesmo, apresentado uma grande dificuldade em continuar mantendo ou mesmo melhorar a fertilidade. Geralmente, esses sistemas levam muito tempo, são quantitativamente inadequados, ou ambos (BAKST, 1987).

Geralmente, nos processos industriais, o procedimento de inseminação em peruas é realizado semanalmente e as informações sobre fertilidade ocorre aproximadamente aos 14 dias de incubação, através da ovoscopia, técnica que permite quantificar e retirar ovos inférteis. Nesse caso, a informação é obtida até 03 semanas após a postura do ovo (incluindo o período de estoque dos ovos). A avaliação da perfuração espermática na membrana perivitelina interna é um procedimento relativamente fácil de se conduzir nas granjas de produção de ovos e poderia fornecer informações relevantes sobre a fertilidade dos lotes em tempo real, ao invés de se aguardar a ovoscopia aos 14 dias de incubação, podendo o produtor tomar ações imediatas para resolução de possíveis problemas detectados. Além disso, informações adicionais são necessárias para avaliar se a frequência de inseminação poderia ser reduzida, mantendo os resultados de fertilidade e eclosão nos padrões exigidos pela linhagem.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O objetivo geral desse trabalho foi determinar a relação do tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com a fertilidade e desenvolvimento embrionário.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelina interna nos diferentes grupos (G1, G2 e G3);
- Avaliar o efeito dos dias após inseminação artificial nos números de perfurações espermáticas na região do disco germinativo de ovos de peruas nos diferentes grupos (G1, G2 e G3);
- Determinar o percentual de ovos férteis, eclosão e mortalidade embrionária (1º, 2º, 3º e 4º fases) em relação aos dias após inseminação artificial, representados por G1 (dois a seis dias), G2 (sete a 20 dias) e G3 (21 a 30 dias);
- Determinar os coeficientes de correlação entre o tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com percentuais de fertilidade, eclosão e mortalidade embrionária (1º, 2º, 3º e 4º fases).

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Anatomia e fisiologia da vagina e do útero

A biologia da reprodução de mamíferos é bastante diferente de aves. Como as aves não possuem um ciclo estral como dos mamíferos para a sincronização da cópula e ovulação, elas contam com o armazenamento de espermatozoides no oviduto. Em aves domésticas e não domésticas, o epitélio que reveste a superfície anterior a 2 centímetros da vagina, atribuída a junção uterovaginal (JUV), é modificado para formar numerosas invaginações tubulares, referidas coletivamente como os túbulos de armazenamento de espermatozoide (TAE). Pouco tempo depois e durante

a produção de ovos, os espermatozoides, após a liberação nos TAE, irão ascender ao oviduto para o local de fertilização no infundíbulo. Nesse lugar, os espermatozoides interagem com uma sucessão quase diária de ovócitos durante dias, até várias semanas, dependendo da espécie (BAKST, 1987).

Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela morfogênese dos TAE não são conhecidos. A diferenciação anatômica dos TAE foi brevemente descrito por Bakst (1992) em peruas de 30 semanas de idade antes do início da fotoestimulação para trazer as aves para o processo de produção. Ambos os TAE alongados e invaginações com superfície em forma de papilas, possíveis TAE, foram observados. Uma descrição mais detalhada da morfogênese dos TAE em codornas japonesas antes e durante o período correspondente à maturação ovariana foi apresentada por Holm and Ridderstråle (2002).

O número total de TAE na JUV varia entre espécies (BIRKHEAD; MOLLER, 1992). Mais recentemente, Bakst et al. (2010), calcularam o número total de TAE em 4 linhagens de frangos de corte com diferentes fertilidades e uma mesma linhagem de perus Large White. Diferentemente dos números de TAE para frangos (13.533) e perus (20.000) observados por Birkhead e Moller (1992), Bakst et al. (2010) observaram que as linhagens de frango apresentaram em média 4.900 TAE por galinha e em média 30.600 TAE por perua. Além disso, Bakst et al. (2010) não observaram diferença estatística no número de TAE entre as 4 linhagens de frangos de corte. A partir destes dados, Bakst et al. (2010) propuseram o seguinte: 1) A duração maior da fertilidade em perus em comparação com frangos de corte é devido, em parte, a um maior número de TAE e uma mais lenta liberação do espermatozoide diariamente; 2) em um lote comercial de galinha, a variação na fertilidade não está associado com os números de TAE. Por outro lado, quando selecionados exclusivamente para alta e baixa fertilidade, o número de TAE em aves da linhagem de alta fertilidade é significativamente maior do que em aves de linhagem de baixa fertilidade (Brillard et al., 1998); e 3) outros fatores além do número de TAE desempenham um papel na manutenção da fertilidade em linhagens comerciais de frangos e perus.

4.2 Túbulos de armazenamento de espermatozoide (TAE)

Os TAE são estruturas encontradas na porção distal do oviduto de todas as espécies de aves já estudadas. Essas estruturas possuem e armazenam os espermatozoides, que são liberados de forma lenta ao longo do tempo enquanto a ave está em fase de produção de ovos para garantir uma população adequada de espermatozoides no local da fertilização (BAKST, 1993). Embora estudos detalhados com histoquímica (BAKST, 1987) e microscopia eletrônica (SCHUPPIN et al., 1984) tenha avaliado o número, a função e as características histológicas do epitélio dos TAE e da mucosa envolvente, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos do armazenamento de espermatozoide em aves (BAKST, 1994).

Schuppin et al. (1984) especularam que a função primária do epitélio dos TAE era de absorção, uma vez que suas observações de microscopia eletrônica revelaram síntese ribossomal limitada de proteínas secretoras. Os TAE não possuem uma função endócrina e epitélio secretor ativo (BAKST, 1987). Os espermatozoides no interior dos TAE não são incorporados nem vinculados à região apical do epitélio dos TAE, mas ao invés disso, estão intimamente associados ao plasmalema do espermatozoide adjacente (BAKST, 1994). Material lipídico foi encontrado no epitélio dos TAE de galinhas, peruas e codornas japonesas (BAKST, 1987), o que inclui colesterol e fosfatidil etanolamina (WALL, 1975). Este material lipídico pode auxiliar na manutenção do plasmalema espermático e proteger contra degradação oxidativa.

A quantificação do número de espermatozoides no interior do TAE intacto é difícil uma vez que os espermatozoides geralmente estão armazenados de forma muito compactada. TAE inteiros raramente estão em um mesmo corte histológico e os procedimentos de preparação do tecido podem alterar o número de espermatozoides. Um hematócrito pode ser utilizado para contar o número total de espermatozoides liberados por trituração moderada dos TAE de peruas (BRILLARD; BAKST, 1990), por digestão da colagenase (BRILLARD, 1993) ou por homogeneização (MCLEAN; FROMAN, 1996) de TAE de galinhas. O preenchimento dos TAE também pode ser avaliado *in vitro* utilizando tecido do oviduto (MCLEAN; FROMAN, 1996).

King et al. (1999), realizaram um estudo afim de determinar se os TAE poderiam ser removidos intactos da mucosa da JUV da perua e mostraram um método no qual o isolamento dos TAE pode ser conduzido para estudos de culturas *in vitro*, assim como para a extração de DNA e RNA do epitélio dos TAE. O método descrito resultou no isolamento bem sucedido do TAE da mucosa do oviduto de peruas. Os túbulos de

armazenamento encontrados eram longos e espiralados (Figura 1). Alguns TAE continham epitélio ciliado na porção final do oviduto, os quais podiam ser vistos se movimentando à temperatura ambiente. A altura das células epiteliais dos TAE variou entre 18 a 22 μm e os diâmetros externos dos túbulos foram aproximadamente 45 a 50 μm , compatível com alguns estudos publicados (SCHUPPIN et al., 1984; BAKST et al., 1994). Material lipídico foi encontrado e não havia separação evidente de células ou lacunas. Os espermatozoides permaneceram no lúmen dos TAE durante todo o procedimento de isolamento, e estava mais prevalente nas porções distais dos túbulos. Os espermatozoides se apresentaram organizados com as cabeças alinhadas na porção distal do túbulo, e as caudas batiam-se em um movimento lentamente sincronizado à temperatura ambiente.

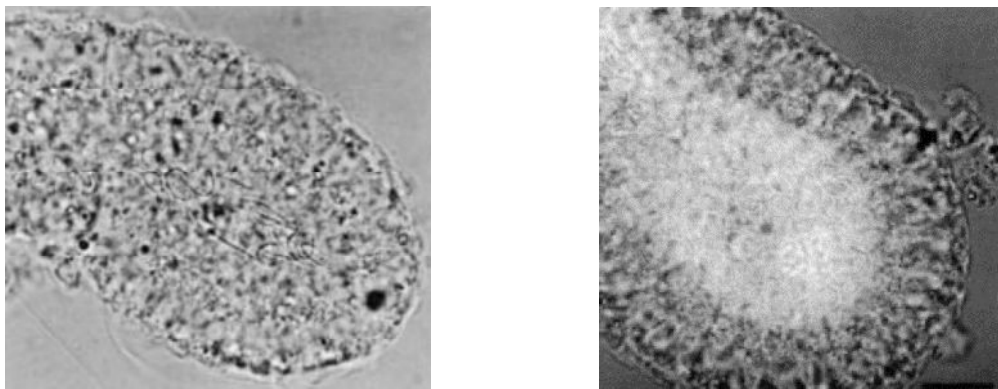
FIGURA 1 – TAE isolados, obtidos de dissociação enzimática da mucosa da junção útero-vaginal, visto por microscopia óptica (20x) com uma preparação fresca em Solução Salina Equilibrada de Hanks (SSEH). Os TAE individuais podem ser vistos, juntamente com fragmentos de células epiteliais. Os cílios, assim como as bordas das células epiteliais estão em movimento. O lúmen dos túbulos, especialmente a região distal, está preenchidos por espermatozoides móveis organizados com as cabeças estreitamente alinhadas. Bar = 100 μm .



Fonte: KING, L. M. et al. (1999, p.1044).

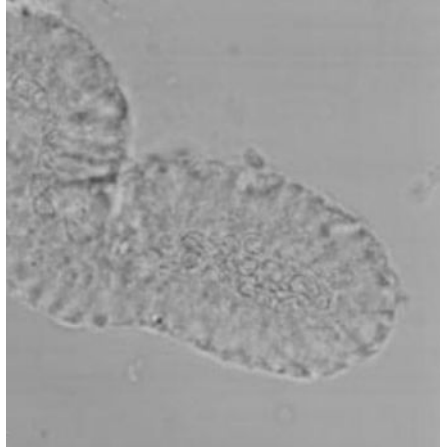
Após a fixação, os espermatozoides ficaram espiralados e não possuíam mais motilidade (Figuras 2, 3 e 4), indicando possivelmente alteração osmótica da composição do fluido no interior dos TAE. Como os espermatozoides não se espiralaram quando fixados separadamente, provavelmente a dissociação enzimática do epitélio do oviduto interrompeu a habilidade do epitélio do TAE de regular propriedades osmóticas dos fluidos interiores.

FIGURAS 2 E 3 – TAE isolados, visualizados através de microscopia de interferência de contraste diferencial (100x). Preparação fixada em paraformaldeído a 4%, 20mM EGTA 1:1 com SSEH por 24 horas antes da fotografia. Espermatozoides corados com corante azul de Hoechst podem ser vistos preenchendo a porção distal do lúmen dos túbulos. Bar = 10 μ m.



Fonte: KING, L. M. et al. (1999, p.1044).

FIGURA 4 – TAE isolados, visualizados por microscopia confocal com luz incidente (92x). Preparação fixada em paraformaldeído a 4%, 20mM EGTA 1:1 com SSEH, e montadas em PBS 1:1, Dabco e glicerol a 40%. Os espermatozoides são visíveis na porção distal do lúmen dos túbulos. Bar = 20 μ m.



Fonte: KING, L. M. et al. (1999, p.1044).

Por muito tempo, várias técnicas e métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a eficiência do armazenamento de espermatozoides no oviduto de várias espécies de aves tais como peruas (BAKST, 1993) e galinhas (BRILLARD, 1998). No entanto, nenhuma dessas técnicas são adequadas para o estudo de penetração de espermatozoide ou armazenamento sob condições *in vitro*. O estudo demonstrou que a recuperação de populações significantes de TAE funcionais de uma única ave é viável; além disso abre novas possibilidades para o estudo de mecanismos envolvidos no armazenamento e na liberação de espermatozoides sob condições ambientais controladas em aves.

Tal estudo foi realizado em peruas, uma vez que uma função significativa da fisiologia da reprodução da perua é sua habilidade de armazenar espermatozoides por até mais de 70 dias (CHRISTIANSEN; BAGLEY, 1989).

4.3 Vagina: seleção espermática, transporte e armazenamento

Nos primeiros 30 minutos após a inseminação, 84% do espermatozoide é eliminado da vagina, mais frequentemente envolto por um muco (HOWARTH, 1971). Os que permanecem na vagina são transportados em direção ao ovário através da combinação de sua motilidade intrínseca, por exemplo, capacidade de se movimentar através de um meio viscoso (FROMAN et al., 2006) e os mecanismos de transporte

espermático na vagina, que inclui atividade da musculatura lisa e a atividade de células ciliadas que envolvem as superfícies da mucosa do lúmen da vagina.

O transporte da massa que compõe o ovo do ovário pelo infundíbulo, magno e istmo é devido a atividade peristáltica iniciada pela distensão da camada da musculatura lisa (ARJAMAA; TALO, 1983). Bakst et al. (1994) especularam que a motilidade espermática intrínseca, associada a um mecanismo de transporte de fluido nos caminhos entre as dobras da mucosa, foram responsáveis pelo rápido transporte do espermatozoide para a JUV na porção distal da vagina. Isto foi baseado em observações em que os espermatozoides transferidos para a porção distal da vagina de um oviduto retirado de uma perua foram encontrados no infundíbulo (uma distância de aproximadamente 80cm) em menos de 10 minutos.

A base molecular e celular da motilidade espermática e seu papel no armazenamento e do espermatozoide no oviduto foi recentemente estudado por Froman et al. (2011), que desenvolveram um bom argumento para a motilidade espermática, como sendo o fator dominante na seleção dos espermatozoides no interior da vagina.

Birkhead et al. (1996) relataram que se a inseminação ocorre 2 horas antes ou após a oviposição, o transporte do espermatozoide no oviduto é alterado e o preenchimento dos TAE é reduzido. Sabe-se também que a eficiência do transporte na vagina da perua, medido pelo percentual de TAE preenchidos, parcialmente preenchidos ou vazios após a inseminação artificial, é mais eficiente antes do início da produção de ovos. Existem mecanismos (neuromusculares, celulares, endócrinos, presença de massa de formação de ovo no oviduto ou todos esses juntos) que afetam a seleção espermática e o transporte após o início da postura.

Diferenças de pH no interior do lúmen podem também influenciar a motilidade espermática. Bakst (1980) observou diferenças significativas no pH da mucosa na porção média da vagina do frango que variou de pH 7,15 dentro de 20 minutos após oviposição a pH 7,51 até 8 a 12h após oviposição. Na mucosa vaginal da perua evertida manualmente (1 a 2 cm na porção distal da vagina), há diferenças significativas que variam de pH 6,95 a pH 7,30 (8 a 12h e 18 a 22h após oviposição) em 10 minutos após a oviposição. Essas variações de pH podem modular a motilidade espermática após a inseminação. A localização da anidrase carbônica na JUV, TAE e no epitélio vaginal também desempenha um papel para o pH na modulação da motilidade espermática, possivelmente com um pH mais alto aumentando a motilidade

espermática na vagina e uma queda de pH reduzindo a motilidade espermática no lúmen (HOLM et al., 1996).

Existem evidências no reino animal de que a fêmea é capaz de exercer influência sobre qual macho irá fertilizar seu ovócito (EBERHARD, 1996). Isso é possível não somente pela escolha da fêmea, mas também pela seleção espermática no trato reprodutivo da fêmea pós cópula. Este último é considerado como escolha inerente da fêmea (EBERHARD, 1996). Baseado no que se sabe sobre aves, pode-se afirmar que a fase crítica de seleção na fêmea geralmente é mais observada na vagina, embora possa haver uma seleção espermática posterior após a saída do TAE (BIRKHEAD; BRILLARD, 2007). Um sinal local, possivelmente iniciado por um componente do líquido seminal ou do espermatozoide, associado a uma resposta pelas células do epitélio vaginal, pode desencadear uma cascata de eventos que favorecem o transporte do sêmen em direção ao ovário. A sinalização do espermatozoide pode estar associada às glicoproteínas presentes no plasmalema do espermatozoide ou a própria falta delas (BAKST et al., 1994; WISHART; HORROCKS, 2000; PELÁEZ; LONG, 2008).

Rzas et al. (1991), demonstraram pela primeira vez a presença de serotonina no oviduto da galinha. Mais recentemente, as células tipo neuroendócrinas serotonininas positivas se apresentaram no epitélio vaginal e da JUV, mas não no epitélio dos TAE (BAKST; AKUFFO, 2008). Células similares, conhecidas como células enterocromafínicas são observadas no epitélio do intestino de outras espécies e parecem regular o reflexo peristáltico local (OLSSON; HOLMGREN, 2001). Além disso, para aumentar a atividade peristáltica local no trato gastrointestinal de galinhas (KITAZAWA et al., 2006), a serotonina parece estimular ambos, cílios e frequência dos movimentos espermáticos em uma variedade de espécies (STEPHENS; PRIOR, 1992). Nesse contexto, a serotonina presente nas células da vagina e JUV, mas não no epitélio dos TAE, podem aumentar a motilidade do espermatozoide, frequência de batimento dos cílios e a atividade do músculo liso, facilitando o transporte do espermatozoide ao TAE (BAKST; AKUFFO, 2008).

Embora a questão de como o espermatozoide sobrevive dentro dos TAE por um prolongado período de tempo ainda não tenha sido totalmente elucidado, pode-se afirmar que o espermatozoide residente é capaz de metabolizar ácidos graxos endógenos (FROMAN et al., 2011) ou outros lipídeos derivados dos microvilos apicais do epitélio dos TAE (BAKST et al., 1994). Vesículas como lipossomas parecem

interagir com o esperma luminal. Esta região do TAE é fosfatase alcalina (FA) positiva (BAKST; AKUFFO, 2007) e corresponde à mesma localização da FA no lúmen do epitélio intestinal de ratos (NARISAWA et al., 2003). Esses autores sugeriram que a FA pode ter função na transferência de lipídeos através da borda dos enterócitos e especula-se que a FA pode ter um papel parecido no epitélio dos TAE (BAKST; AKUFFO, 2007).

O mecanismo da liberação do espermatozoide dos TAE tem sido alvo de estudos por anos. Mais recentemente, foi sugerido que essa liberação possa ser um mecanismo neuro-mediado que dá início à contração da banda de actina no citoplasma apical do epitélio dos TAE (FREEDMAN et al., 2001), assim liberando espermatozoide do lúmen do TAE. Por outro lado, Fromann et al (2011) sugeriram que os espermatozoides no lúmen dos TAE são submetidos a uma corrente de fluido que se movimenta em direção ao orifício do TAE. Os espermatozoides permanecerão no lúmen do TAE contanto que sua velocidade natatória seja maior que a velocidade do fluxo do fluido luminal. A liberação dos TAE acontecerá, possivelmente devido uma atividade de ATP, a motilidade do espermatozoide termina e eles são então carreados para fora dos TAE com os fluidos luminiais. A localização da aquaporina-3 na região apical do epitélio dos TAE (BAKST et al., 2004) suportaria a sugestão que há uma transferência de fluidos do epitélio para o lúmen do TAE.

O espermatozoide de perus perde a viabilidade dentro de 8 a 18 horas quando armazenado como sêmen líquido utilizando diluentes. Por outro lado, as peruas mantêm o sêmen viável e fértil em seus TAE por 45 dias ou mais, após uma única inseminação. Assim, Long et al. (2003), em um trabalho - Análises em série da expressão gênica (ASEG) em túbulos de armazenamento de espermatozoides de peruas na presença e na ausência de espermatozoide residente - com o objetivo de identificar e caracterizar genes expressos de forma diferente que podem fundamentar este longo período de armazenamento e depois utilizar essa informação para desenvolver melhores métodos para o armazenamento de sêmen líquido, empregaram análises em série de expressão gênica para comparar padrões de expressão de gene em túbulos de armazenamento de espermatozoides em peruas após a inseminação artificial com sêmen diluído ou somente diluente (controle). Eles construíram dois acervos separados de ASEG com RNA dos TAE obtidos de peruas inseminadas com espermatozoide e do grupo controle (apenas diluente) e usaram esses acervos para gerar 95325 marcadores ASEG de dez pares de base, que

representaram 27430 genes únicos. Os acervos do grupo inseminado com sêmen e do grupo controle continham 47663 e 47662 marcadores, representando 18030 e 19101 transcrições únicas, respectivamente. Aproximadamente 1% desses genes únicos foram expressos de forma diferenciada ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Anotações indicativas foram atribuídas às sequências de nucleotídeos dos marcadores ASEG comparando-os com marcadores ASEG disponíveis publicamente e bases de dado da sequência do cDNA. A estratégia baseada nas ASEG, atingiu o objetivo do trabalho, ao ceder avaliações quantitativas de expressão de genes independente do conhecimento da sequência original de mRNA e ao fornecer a capacidade de alto rendimento e análise de custo eficiente a nível de todo o transcriptoma. Além disso, esses acervos de ASEG forneceram números absolutos de transcrição em um formato digital, que pode ser adotado para proporcionar comparações estatísticas de dados a partir de vários laboratórios (VELCULESCU et al., 1995). Deve-se notar que mecanismos além da expressão diferencial de genes (por exemplo, modificações pós-tradução, transferência de proteínas nas células epiteliais dos TAE, etc) são fatores também importantes no armazenamento de espermatozoides nos TAE. A análise proteômica de armazenamento de espermatozoides nos TAE é fundamental para elucidar mecanismos adicionais. As análises de ASEG realizadas em seus estudos foram apenas o início de um processo iterativo de desenvolvimento de hipóteses, testes e refinamentos que acabarão por produzir novos conhecimentos sobre mecanismos fisiológicos que fundamentam o armazenamento prolongado de espermatozoide no oviduto da ave.

4.4 Avaliação da fertilidade através da membrana perivitelina

A base biológica para problemas de fertilidade ou eclosão de lotes geralmente não é uma tarefa fácil de se diagnosticar. Bakst et al. (2014) descreveram uma análise que revela o número de espermatozoides interagindo com a membrana perivitelina interna sobre o disco germinativo no momento da fertilização, dessa forma fornecendo informação sobre a qualidade geral do sêmen na cópula ou inseminação artificial e a duração aproximada da fertilidade de uma certa ave (capacidade de armazenamento de espermatozoide) desde o momento em que o ovo foi posto.

A membrana perivitelina interna é um revestimento fibroso, acelular que envolve o ovócito (gema) no momento da fertilização e representa uma barreira na qual o espermatozoide deve hidrolisar para alcançar o pró-núcleo haploide da fêmea dentro do disco germinativo. O espermatozoide preferencialmente se liga à membrana perivitelina interna sobre o disco germinativo (também conhecido como disco perivitelínico) e então libera uma enzima semelhante à tripsina (acrosina) que hidrolisa as fibras da membrana perivitelina interna, formando assim, uma perfuração espermática (BAKST et al., 2014). Bramwell et al. (1995) introduziram um procedimento de coloração que possibilitou a visualização de perfurações espermáticas e permitiu conseqüentemente sua quantificação. Sua publicação original sobre a avaliação das perfurações espermáticas tem sido subsequentemente modificada e utilizada por vários pesquisadores que avaliam as dinâmicas dos espermatozoides: interações do ovócito sob uma variedade de condições de tratamento tanto em aves domésticas, quanto em não domésticas.

O procedimento mais comum que tem sido utilizado para essa técnica provavelmente seja o descrito por Bramwell e Donoghue (2010). Resumidamente, o disco da membrana perivitelina é isolado, lavado para que não haja resíduo de gema ou mesmo o blastoderma, caso esteja presente, e colocado sobre uma lâmina para fixação e coloração. A parte da colocação da membrana perivitelina retirada sobre a lâmina, que no ovo consiste em camada externa e interna, sem rugas e dobras pode ser difícil e levar muito tempo.

Outra alternativa para preparação de uma membrana perivitelina sem dobras sobre a lâmina de forma mais eficiente foi descrita por Spasojevic (2010). Uma supercola era aplicada em uma lâmina para delimitar um quadrado (de aproximadamente 20mm²). O excesso de albúmen era removido do ovócito ao redor do disco germinativo e a lâmina com a supercola era posicionada de forma firme sobre o disco germinativo. Após um tempo para a cola se fixar, a membrana perivitelina era cortada ao redor da delimitação da supercola, a gema era gentilmente retirada e a lâmina era então lavada para retirar o resto da gema e o blastoderma, caso estivesse presente. A lâmina era então corada conforme descrito por Bramwell e Donoghue (2010). Em ovos de perus comerciais, esta modificação melhorou a velocidade de preparação da membrana perivitelina e reduziu as rugas formadas na preparação, se

tornando subsequentemente uma medida de controle de qualidade para reprodutoras de peru comercial (SPASOJEVIC, 2010).

Um terceiro método, apresentado por Malecki e Martin (2005) em seus trabalhos com ema e patos, respectivamente, envolve o uso de um anel de papel filtro para isolar, lavar e corar o disco da membrana perivitelina utilizado para a avaliação da perfuração espermática. Essa técnica foi similar à descrita por Gupta e Bakst (1993) para o isolamento do blastoderma intacto, enquanto a gema e outras células em excesso eram retiradas da membrana perivitelina aderida ao anel de papel filtro.

Dessa forma, Bakst et al. (2014), dada a diversidade de procedimentos existentes e considerando que a avaliação da perfuração espermática tem se tornado uma técnica importante utilizada por indústrias e especialistas tanto em aves comerciais, quanto domésticas, descreveram a metodologia de análise da perfuração espermática através do uso de anéis de papel filtro para o isolamento da membrana perivitelina sobreposta ao disco germinativo e fizeram observações sobre a morfologia, de forma a auxiliar pesquisadores que pretendam realizar a análise, quando se depararem com um material muito ou pouco corado ou lâminas sujas com resíduo de gema. Suas observações foram baseadas em resultados utilizando ovos de galinha, peru, codorna japonesa, pato e ganso.

Para Bramwell (1998), o objetivo dessa técnica é prevenir ou identificar o potencial de produção de ovos com fertilidade reduzida. Essa técnica pode ser utilizada em lotes de reprodutores de perus, para auxiliar na determinação de qual a melhor frequência de inseminação e com qual concentração espermática, assim como monitorar periodicamente os programas de reprodução. Além disso, é capaz de auxiliar geneticistas na tentativa de manter suas linhagens selecionadas fora do nível basal de menos de 30 perfurações, em um esforço para manter linhagens de alta penetração espermática e estabelecer linhagens reconhecidas por boa capacidade reprodutiva com menos necessidades de manejo, assim como boas características de desempenho.

Ainda para Bramwell (1998), essa técnica é simples, barata e muito efetiva na avaliação de lotes com dúvidas referentes à fertilidade. O equipamento necessário é mínimo e é relativamente fácil de se treinar pessoas em como utilizar a técnica com resultados disponíveis dentro de minutos após o início do procedimento. Em resumo,

a avaliação da perfuração espermática é uma ferramenta que pode ser utilizada de várias formas na indústria avícola para auxiliar a maximizar e melhorar capacidades reprodutivas das aves.

4.5 Armazenamento do sêmen de aves

4.5.1 Coleta de sêmen

Burrows e Quinn (1973) descreveram um método não invasivo – o método da massagem abdominal – para coleta de sêmen em machos. A técnica envolve a conter o macho e gentilmente massagear o dorso da ave da parte atrás das asas até a cauda com massagens firmes e rápidas. O macho responde com tumescência (ereção) do falus, momento em que o coletador gentilmente comprime a cloaca expondo o sêmen pela papila externa do ducto deferente, coletando o sêmen com o auxílio de um recipiente. Para perus, essa técnica é adaptada, massageando a área ao redor da cloaca antes da retirada do sêmen (LAKE; STEWART, 1978). Adaptações também são realizadas para espécies tais como aves aquáticas selvagens, que possuem órgãos reprodutores tipo apêndice (COOPER, 1977) e aves não domésticas que requerem contenção adicional (GEE, 1995). A proximidade da cloaca aumenta a probabilidade de obtenção de sêmen contaminado com fezes, uratos e bactérias que são prejudiciais para a qualidade do sêmen (DONOGHUE; WISHART, 2000).

4.5.2 Inseminação artificial

A técnica atualmente utilizada para inseminação artificial em aves foi desenvolvida na década de 30 e envolve aplicar uma certa pressão ao abdômen da fêmea e expor o orifício vagina na cloaca (QUINN; BURROWS, 1936). O sêmen é depositado aproximadamente 2 a 4 cm no interior do orifício vaginal da fêmea concomitantemente com o pressionamento do abdômen da ave. A inseminação é realizada com canudinhos, seringas ou tubos plásticos. Em processos de larga escala de produção, são utilizados distribuidores de sêmen automáticos com canudinhos

individuais carregados com a dose correta de sêmen por ave (DONOGHUE; WISHART, 2000).

Vários fatores influenciam a fertilidade após a inseminação artificial. A qualidade do sêmen pode ser afetada pela idade do macho, programa de luz, época do ano, peso corporal e alimentação (SEXTON, 1987). O período quando ocorre a inseminação também é um fator importante e geralmente ocorre no final da tarde para minimizar o número de fêmeas com ovos com casca formada no útero (glândula da casca). Em peruas, Brillard e Bakst (1990) demonstraram que o número de espermatozoides nos TAE das fêmeas inseminadas antes do início de postura foi duas vezes maior do que das inseminadas no começo da produção de ovos. Além disso, peruas geralmente são inseminadas antes do período de produção, normalmente 14 a 17 dias após o aumento de luz para estimulação da produção de ovos. Em galinhas, a inseminação artificial se inicia quando 15% a 20% das aves estão em produção de ovos (BAKST; BRILLARD, 1995).

A inseminação artificial tem sido um elemento crítico de reprodução de perus desde a década de 1960 e é utilizada quase que exclusivamente em lotes de produção comercial. O contraste entre o tamanho dos perus machos (linhagens Large White podem passar de 33 kg) e fêmeas (aproximadamente 9kg no início da postura) e a consequente baixa fertilidade das linhagens pesadas após a cópula natural resultou em uma completa incorporação da inseminação artificial na produção comercial. Atualmente, a inseminação artificial em outras espécies de aves não é amplamente utilizada. Porém isso pode mudar. Por exemplo, como a fertilidade em reprodutores de frango continua a decair uma vez que os machos são selecionados para crescimento, a inseminação artificial pode ter um custo benefício no manejo de reprodutores de frango de corte (REDDY, 1995). O procedimento de inseminação artificial não é tão simples em patos ou gansos uma vez que, diferentemente de galinhas e peruas, o oviduto não pode ser evertido e a demanda comercial para inseminação artificial nessas espécies é limitada (COOPER, 1977). Técnicas de inseminação artificial também têm sido aplicadas com sucesso em garças e outras espécies não domésticas com atenção especial a diferenças de tamanho e níveis de estresse nessas aves (GEE, 1995).

Espécies de aves, principalmente as galiformes, possuem algumas características fisiológicas particulares que podem influenciar a preservação do

sêmen. Diferentemente de alguns mamíferos, a cabeça do espermatozoide de aves é cilíndrica e não muito maior em diâmetro que a cauda. O menor volume citoplasmático e conseqüentemente a menor habilidade de permitir que crioprotetores adentrem a cabeça do espermatozoide podem ser umas das razões pelas quais os espermatozoides de aves não sobrevivem bem ao processo de congelamento. Além disso, a cauda do espermatozoide é bem longa (THURSON; HESS, 1987), de 90 a 100 μm , o que é aproximadamente oito vezes o comprimento da cabeça e faz com que o espermatozoide das aves seja potencialmente mais susceptível aos danos do congelamento. Uma função importante da fisiologia reprodutiva da fêmea é sua habilidade de armazenar espermatozoides viáveis por longos períodos de tempo. Os TAE captam e armazenam espermatozoides que são lentamente liberados ao longo do tempo para garantir uma população adequada de espermatozoides no local da inseminação (BAKST, 1993). Peruas inseminadas antes do início da produção de ovos, podem produzir ovos férteis por até 16 semanas após a inseminação (CHRISTENSEN; BAGLEY, 1989).

Considerando que a indústria de perus comerciais depende exclusivamente da inseminação artificial para a produção de ovos férteis, Bakst (1990) realizou um trabalho de coração do espermatozoide de forma fluorescente para avaliação após a inseminação.

Geralmente, o sêmen é coletado, diluído e inseminado ainda fresco (menos de uma hora após a coleta) ou após armazenamento (não mais que 8 horas). As fêmeas são inicialmente inseminadas com aproximadamente 200 milhões de espermatozoides em média 14 a 16 dias após o início da fotoestimulação (a luz é aumentada de 06 para 14 horas) para garantir o máximo de preenchimento dos túbulos de armazenamento de espermatozoides antes do início da produção de ovos. Uma vez que se inicia a produção de ovos, as fêmeas são inseminadas semanalmente no intuito de manter a população de espermatozoide no interior dos túbulos. Enquanto a ave está em produção de ovos, os espermatozoides residentes são liberados dos TAE de forma lenta, mas contínua, afim de garantir uma população adequada no local de fertilização na região do infundíbulo. É essa capacidade da fêmea de manter os espermatozoides no interior dos TAE e liberá-los, que permite a fertilização de uma ovulação diária por vários dias ou semanas sem um mecanismo que sincroniza a ovulação com a cópula (BAKST, 1994).

Alguns estudos anteriores estimaram a capacidade de armazenamento dos TAE examinando secções histológicas da junção útero-vaginal e categorizaram a distribuição espermática dentro de diferentes cortes transversais dos TAE, identificando-as em cheias, parcialmente cheias ou vazias, ou como com ou sem espermatozoide (BAKST, 1988). Enquanto esse método forneceu uma percepção sobre a distribuição do espermatozoide dentro do TAE, dado seu comprimento (aproximadamente 250 μm) e sua configuração serpentina, não era somente possível, mas altamente provável que diferentes cortes transversais do mesmo TAE foram classificados de forma diferente dentro dos mesmos cortes. Além disso, uma vez que os cortes em série da junção útero-vaginal e porção distal do infundíbulo não foram avaliados, a avaliação apenas de cortes histológicos dos TAE não foi suficiente para revelar a distribuição espacial dos espermatozoides no interior do TAE. Da mesma forma, devido à quantidade relativamente baixa de espermatozoides residentes nas glândulas tubulares do infundíbulo de peruas, os espermatozoides foram raramente observados em cortes histológicos.

O uso de microscopia de contraste de interferência diferencial (CID) no exame de preparados da mucosa da região útero-vaginal, sem fixar e macerados contendo os TAE, permite o acesso visual ao TAE inteiro incluindo o lúmen (BAKST, 1992). Em um exame de um TAE individual através de um conjunto de planos focais (segmentação óptica), espermatozoides únicos, assim como aglomerações deles podem ser observadas dentro do lúmen do TAE. No entanto, a visualização do lúmen do TAE é prejudicada se a preparação do macerado for muito espessa ou se as células epiteliais do TAE estiverem sobrecarregadas com lipídeos. Quando espermatozoides corados com o corante fluorescente nuclear bisbenzimidaz (Hoechst 33342) foram inseminados, aqueles residentes dentro dos locais de armazenamento de espermatozoides no oviduto foram relativamente fáceis de se localizar nos preparados macerados examinados através de ambos, CID e microscopia de fluorescência (BAKST, 1992).

Bakst (1994) em um estudo com peruas, considerando novos pontos sobre a função do espermatozoide corado com fluorescência, seguido da inseminação, no transporte pelo oviduto e armazenamento, concluiu que as novas técnicas utilizadas para avaliar a distribuição do espermatozoide nos locais de armazenamento no oviduto puderam mostrar que outros pesquisadores subestimaram o conteúdo de

espermatozoides nessas áreas. Além disso, embora o espermatozoide corado com bisbenzimidazina possua um fator de efeito depressivo na fertilidade da fêmea, essa queda não é de tal magnitude para excluir o uso do espermatozoide corado na investigação de eventos associados ao armazenamento dos espermatozoides no oviduto e ao processo de fertilização.

4.5.3 Armazenamento de sêmen líquido

Diluentes são soluções-tampão salinas utilizadas para prolongar a vida do espermatozoide, manter a viabilidade *in vitro* e maximizar o número de fêmeas a serem inseminadas. A diluição do sêmen é importante, uma vez que o sêmen de aves é bem viscoso e altamente concentrado, contendo de 6 (galos) a 12 (perus) bilhões de espermatozoides/ml. Os diluentes de sêmen são baseados na composição bioquímica do sêmen da ave (LAKE, 1995). O ácido glutâmico, constituinte aniônico mais presente no plasma seminal das aves, se tornou um componente padrão dos diluentes (LAKE; MC INDOE, 1959).

Existem vários diluentes disponíveis para sêmen de aves, ambos receitas e produtos comercialmente disponíveis no mercado. Vários pesquisadores compararam a composição de vários diluentes e resumiram nos dados de fertilidade em diferentes estudos (BAKST, 1990; BOOTSWALA; MILES, 1992). O que ficou evidente desses estudos, foi que não há diluente padrão para sêmen de aves e que os estudos são tão variáveis em delineamentos experimentais incluindo período de inseminação, profundidade da aplicação e frequência da inseminação, números de espermatozoides inseminados e duração das fertilidades analisadas, que o discernimento sobre os benefícios de diferentes diluentes se torna difícil. Existem algumas características comuns para aproximar todos os diluentes: fatores para manutenção de pH, osmolaridade e fornecimento de fonte de energia para o espermatozoide (CHRISTENSEN, 1995).

O pH de um diluente pode afetar a taxa metabólica e a motilidade do espermatozoide. Agentes tamponantes, consistindo de uma mistura de ácidos e suas bases conjugadas, são formulados em uma diluição que limita a alteração do pH. Isso

geralmente inclui a mistura de fosfatos, citratos e/ou moléculas orgânicas zwitteriônicas, tais como ácido sulfônico *N,N*-bis(2hidroxietyl)-2-aminoetano (BES) e ácido sulfônico *N*-Tris(hidroxietyl)metil-2-aminoetano (TES) em diluentes de aves. Moléculas zwitteriônicas são importantes para sêmen de aves em função do ácido láctico acumulado com o aumento do tempo de armazenamento que pode reduzir o pH do diluente (CHRISTENSEN, 1995). O espermatozoide de galos e perus podem tolerar uma variação de pH de 6,0 a 8,0 (VAN WAMBEKE, 1967). A motilidade e a taxa metabólica do espermatozoide podem ser alteradas de acordo com o pH do diluente. Por exemplo, um pH baixo reduz a motilidade, a produção de ácido láctico e a captação de oxigênio pelo espermatozoide, enquanto um pH alto aumenta taxas metabólicas *in vitro* (Bogdonoff e Schaffner, 1954). Para um armazenamento de sêmen de galos por 24 horas, Lake e Ravie (1979) demonstraram que o pH entre 6,8 e 7,1 mostrou melhor sobrevivência de espermatozoides do que os diluentes com pH entre 5,8 e 7,4. Para sêmen de peru armazenado por 6 horas *in vitro*, quando o pH diluente era 6,5 houve maior fertilidade comparados com pH 7,5 (GIESEN; SEXTON, 1982).

Espermatozoides de aves podem manter a capacidade de fertilização em diluentes com osmolaridade entre 250 a 460 mosM/kg H₂O. Quando os espermatozoides são colocados em solução de baixa osmolaridade, o movimento líquido da água dentro das células espermáticas faz com que eles inchem. Em uma solução hiperosmótica, os espermatozoides perdem água e atrofiam (BAKST, 1980). Esta propriedade física é a base dos testes de estresse de espermatozoides normalmente utilizados. Sob condições hipoosmóticas, o espermatozoide mostra maior incidência de “pescoços curvados” (CLARK et al., 1984), um defeito frequentemente encontrado em sêmen diluído de galo e peru, o que é negativamente correlacionado com fertilidade. Giesen e Sexton (1982) observaram o desaparecimento de espermatozoides de peru após um período de armazenamento de 18 horas, sugerindo que os espermatozoides estão inchando e colapsando *in vitro*. Estes pesquisadores levantaram a hipótese que diluentes hipertônicos podem reverter o inchaço e melhorar a sobrevivência *in vitro*.

Um fator importante para o desenvolvimento de diluentes e sistemas de armazenamento para o sêmen de aves é a diferença fisiológica e a necessidade metabólica de espermatozoides de diferentes espécies. Os espermatozoides de galos

são metabolicamente competentes em ambientes aeróbicos e anaeróbicos *in vitro*. Por outro lado, espermatozoides de perus necessitam de níveis mais elevados de oxigênio para sobreviver (WISHART, 1981). O metabolismo aeróbico necessita da aeração do sêmen, o que é normalmente alcançado colocando o sêmen diluído em um frasco para maximizar a superfície em relação ao volume e colocando o frasco em um agitador do tipo rotativo. Outros métodos para maximizar e controlar o fornecimento de oxigênio para o sêmen foram avaliados. Tais métodos incluem a adição de componentes que quelam o oxigênio e o desenvolvimento de cápsulas ambientalmente controladas que regulam a temperatura e a concentração de oxigênio (HAMMERSTEDT; SHULTZ, 1995).

Assim como na descrição de diluentes de sêmen, também é difícil comparar resultados disponíveis na literatura envolvendo líquidos de armazenamento de sêmen de aves por longo período devido a variação dos delineamentos experimentais. Tais variações incluem diferenças nos programas de inseminação, dose de sêmen, período de armazenamento (que pode variar de 6 a 48 horas) e avaliação dos resultados de fertilidade apresentados. Um fenômeno que parece ser consistente em resultados com líquidos de armazenamento de sêmen é o declínio da fertilidade com sêmen armazenado por mais de 6 horas após as primeiras 5 a 8 semanas de produção de ovos. Ao longo da produção de ovos, a eficiência dos TAE reduz e quando o sêmen é armazenado *in vitro* por 24 horas ou mais, problemas de fertilidade são potencializados (DONOGHUE; WISHART, 2000).

Um progresso significativo ocorreu no desenvolvimento de diluentes de sêmen e processos de preservação para sêmen de aves nos anos entre 1970 e 1980. No entanto, procedimentos básicos para coleta de sêmen e inseminação artificial foram estabelecidos na década de 30 (LAKE, 1995). O armazenamento de sêmen líquido em temperaturas refrigeradas, por até 6 horas em perus e 24 horas em frangos, pode resultar em níveis de fertilidade comparáveis ao sêmen fresco inseminado. Embora tenha sido a descoberta das qualidades de refrigeração de glicerol no congelamento de sêmen de galo que avançou a tecnologia de congelamento de sêmen para todas as espécies (POLGE, 1951), procedimentos de congelamento para sêmen de aves não são rentáveis para lotes de produção comercial.

Vários testes têm sido realizados para fornecer informações sobre a função do espermatozoide e oviduto e duração da fertilidade. Estes métodos dependem do ovo

posto, que tradicionalmente é avaliado como fértil ou infértil. Ainda, o ovo fresco posto é uma ótima fonte de informação sobre a função do espermatozoide in vivo. O número de espermatozoides e a penetração na região do disco germinativo podem ser estimados isolando o revestimento que envolve o ovócito (gema). Este revestimento se refere à membrana perivitelina interna (MPI). Durante a fertilização, o espermatozoide penetra a MPI utilizando de enzimas acrossômicas para hidrolisar perfurações nas fibras proteicas desta membrana (BAKST; HOWARTH, 1977). Tais perfurações são claramente observadas utilizando um procedimento de preparação e coloração rápido e fácil. Uma segunda população de espermatozoides que não conseguiram penetrar a MPI, mas estão no local da fertilização, são aprisionados na malha fibrosa da membrana perivitelina externa (MPE). Esta MPE é secretada pelo oviduto superior e pela MPI. Tanto as perfurações na MPI, quanto os espermatozoides aprisionados na MPE podem ser visualizados e quantificados em ovos frescos. Wishart (1987) forneceu uma previsão da duração de fertilidade de aves individuais determinando a densidade unitária de espermatozoide incorporado na MPE de ovos utilizando uma relação matemática previamente estabelecida. Igualmente, há uma correlação positiva significativa entre os números de espermatozoides na MPE e de perfurações na MPI com o número de espermatozoides residindo nos TAE no momento em que o ovo é posto pelas galinhas (WISHART, 1995) e peruas (BRILLARD; BAKST, 1990). Além disso, a avaliação da fertilidade de um ovo individual, de uma galinha ou de um lote pode ser realizada avaliando o número de perfurações na MPI de ovos frescos (BRAMWELL et al., 1995). Embora ambas as avaliações possam ser utilizadas para fornecer informações similares sobre a função do espermatozoide “in vivo”, a avaliação das perfurações é um método mais simples (WISHART, 1995). O período de preparação é menor e as perfurações na MPI são fáceis de visualizar, portanto, mais ovos podem ser avaliados. Quando essas avaliações foram realizadas para estimar o impacto do armazenamento do sêmen por 24 horas a 5°C contra sêmen fresco, Donoghue et al. (1996) observaram uma quantidade significativamente menor de espermatozoides na MPE e menos perfurações espermáticas na MPI de ovos de peruas após inseminação artificial com sêmen armazenado in vitro. Durante um estudo de 11 semanas, quase cinco vezes menos espermatozoides se encontravam incorporados na MPE de ovos de peruas inseminadas com sêmen armazenado quando comparadas com as inseminadas com sêmen fresco (DONOGHUE et al., 1996). Sugeriu-se que uma quantidade menor de

espermatozoides alcançou e penetrou os TAE, conseqüentemente, menos espermatozoides estavam presentes no local da fertilização durante o período de ovulação. Quando se estimou perfurações na MPI, os ovos avaliados do grupo com sêmen armazenado tiveram em média 40% menos perfurações do que ovos avaliados após inseminação com sêmen fresco (DONOGHUE et al., 1996). Estes estudos sugerem que a utilização de métodos para armazenamento de sêmen de perus por 24 horas compromete a habilidade intrínseca do espermatozoide de alcançar e/ou ser armazenado no TAE.

4.6 Desenvolvimento embrionário em aves de corte

Algumas reações influenciam o processo de desenvolvimento embrionário, quando o embrião utiliza de carboidratos e gordura para transformar em energia. Tais reações dependem de uma variável física (temperatura) e outra bioquímica (enzimas). A eficiência das reações têm relação com a participação enzimática, enquanto a temperatura pode influenciar na velocidade dessas reações, retardando-as através de baixas temperaturas ou aumentando-as através de altas temperaturas (CALIL, 2007).

O desenvolvimento embrionário é um processo complexo que, pode ser dividido em três fases: diferenciação, crescimento e maturação celular (BOERJAN, 2006). A primeira fase caracteriza-se pela diferenciação das células e formação dos tecidos. Na próxima fase, de crescimento embrionário, ocorre o aumento de massa e contínuo desenvolvimento de órgãos, resultado de alta atividade metabólica e de proliferação celular (BOERJAN, 2006). O desenvolvimento embrionário é retomado quando a temperatura do ovo está entre 37 a 38°C. Durante a fase final, conhecida como maturação, o embrião passa por uma série de eventos que lhe permitem viver no ambiente externo à casca. Durante a maturação, as principais glândulas iniciam a secreção hormonal, promovendo interação entre os órgãos, dentro da cadeia metabólica (CALIL, 2007). A passagem da respiração cório-alantoidea para a respiração pulmonar se efetua de forma gradativa, iniciando-se entre dezoito e dezenove dias de idade, data na qual o embrião bica a câmara de ar para produzir total mudança do tipo de respiração entre o vigésimo e vigésimo primeiro dia, instante em que começa a bicar a casca.

A fisiologia completa do desenvolvimento embrionário é tema muito extenso e de grande complexidade. Entretanto basta entendermos alguns dos principais fenômenos que ocorrem no embrião para podermos ter uma visão geral que nos permita intervir positivamente no dia-a-dia dentro de um incubatório.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi conduzido em uma fazenda de reprodutores de perus, da linhagem Nicholas 700, localizada no município de Uberlândia, MG. Em um aviário de 1500m² com 4000 fêmeas crioulas de 50 semanas de idade alojadas, 140 aves foram separadas em uma baia específica para o estudo, com densidade de 4 aves/m², e mantidas sem inseminação durante o período de 30 dias. A baia possuía ninhos, comedouros e bebedouros disponíveis para não influenciar no comportamento das aves. A temperatura e umidade média dos aviários era mantida entre 24° - 28°C e 60 - 70%, respectivamente. As aves receberam vacina na fase de recria para o vírus da doença de Newcastle, rinotraqueíte dos perus e bouba aviária e estavam em bom estado sanitário durante o experimento. Após o período de 30 dias, as fêmeas foram inseminadas, todas no mesmo dia, com sêmen fresco diluído na proporção 1:1 sêmen/diluyente proveniente de um mesmo grupo de machos da mesma idade, sendo 12 fêmeas por ml de sêmen diluído, o que corresponde a aproximadamente 09 bilhões de células espermáticas por dose inseminada. A quantidade de células espermáticas foi confirmada laboratorialmente utilizando uma mesma amostra de sêmen para avaliação com auxílio de uma Câmara de Neubauer para contagem de espermatozoides. Os machos utilizados no estudo foram alojados em um outro aviário, também de 1500m² com fornecimento de ração e água de acordo com o descrito no manual para a linhagem. O sêmen foi coletado através de massagem cloacal, de acordo com a técnica descrita por Wilson (1998). Os machos utilizados tinham seu sêmen coletado aproximadamente a cada 04 dias para garantir a quantidade aproximada de 09 bilhões de células por dose. Durante os 30 dias seguintes, não foi realizada nenhuma outra inseminação no grupo estudado. A ração e água foram fornecidas *ad libitum*, seguindo as recomendações preconizadas no

manual de manejo para a linhagem. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética sob número de protocolo CEUA UFU 073/16.

5.2 Coleta dos ovos

A coleta de ovos ocorreu todos os dias entre as 7h e 18h, a cada 40 minutos, sendo os ovos enviados para uma sala com temperatura de 19°C e umidade relativa média (UR) 60% e identificados com a data de postura. Metade dos ovos era encaminhada a cada 02 dias para o Laboratório de Microscopia da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram conduzidas as análises da perfuração espermática na MPI na região do disco germinativo, imediatamente após a chegada. A outra metade era encaminhada em veículo com temperatura interna controlada de 17-19°C até o incubatório de perus comerciais, na cidade de Uberlândia, MG, onde ficavam em estoque na sala de ovos, também com temperatura (17°C) e UR (60%) controladas até a composição de uma incubação de acordo com o guia de incubação da linhagem, para serem realizadas as seguintes avaliações: fertilidade aos 14 dias, eficiência de eclosão e fases de mortalidade embrionária. Os ovos foram reunidos em três grupos: de dois a seis dias (G1), de sete a 20 dias (G2) e de 21 a 30 dias (G3) após a inseminação, totalizando aproximadamente 1500 ovos coletados.

5.3 Avaliação das perfurações espermáticas

Para a avaliação do número de perfurações espermáticas, foi utilizado o protocolo citado por Bakst (2014), no qual o disco germinativo foi localizado e a membrana perivitelina na região do disco germinativo foi retirada com auxílio de uma pinça e uma tesoura de íris de ponta fina. A membrana perivitelina foi lavada em uma placa de petri, com auxílio de uma pipeta descartável, aproximadamente 05 vezes em solução de PBS (1x) até que todo o resíduo de gema fosse retirado. Após, a membrana foi esticada, com auxílio de uma pipeta, em uma lâmina, de forma que não apresentava dobras e na sequência, umedecida com formol a 10%, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Após, aproximadamente três gotas de corante ácido periódico-

Schiff (PAS) foram colocadas sobre a membrana e mantidas por alguns segundos, produzindo uma cor púrpura na membrana, destacando assim, as perfurações espermáticas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (10x) logo após o procedimento. No microscópio óptico, as perfurações espermáticas na região do disco germinativo foram contadas e registradas em planilha para posterior análise dos dados.

5.4 Avaliação no incubatório

No incubatório de perus comerciais, os ovos foram estocados em carrinhos com bandejas de capacidade para 96 ovos em sala com temperatura e umidade relativa do ar controladas (17°C e 60%, respectivamente), até formarem uma composição de incubação. Anterior à incubação, os ovos foram pré-aquecidos em temperatura de 25°C durante 04 horas em uma incubadora, afim de levar os ovos a uma temperatura uniforme, estreitando a janela de nascimento e conseqüentemente, uniformizando a eclosão. Imediatamente após o pré-aquecimento, foram incubados em incubadora da marca Petersime, de estágio múltiplo, a 38°C e UR 82% durante 25 dias. As trocas de ar dentro das incubadoras foram feitas de acordo com as orientações do fabricante das máquinas, para manter as condições mínimas de oxigenação do embrião. Durante todo o período de incubação, a cada hora, ocorria a viragem a 45° de todas as bandejas, afim de evitar a aderência do embrião à membrana interna da casca, estimular o desenvolvimento da área vascular, reduzir a incidência de mal posicionamento dos embriões, entre outros. Aos 14 dias de incubação, os carrinhos foram retirados com as bandejas para avaliação da fertilidade através da ovoscopia, por meio da qual uma fonte de luz foi incidida sob os ovos em um ambiente escuro e os ovos claros foram definidos como inférteis e descartados. As informações da quantidade de ovos inférteis foram registradas em planilha para posterior avaliação. Aos 25 dias, os ovos foram transferidos das incubadoras e encaminhados em bandejas específicas de eclosão para o nascedouro, para então eclodirem aos 28 dias. Durante a transferência foi realizada vacinação in ovo para Rinotraqueíte Infeciosa dos Perus e Bouda Aviária. Após o nascimento, foi realizado o embriodiagnóstico em todos os ovos não eclodidos, procedimento no qual os ovos

foram quebrados e avaliados quanto à fase da mortalidade embrionária – 1º fase, 2º fase, 3º fase ou 4º fase. As posturas referentes ao período de 30 dias do experimento (após a inseminação) compuseram 03 incubações, com estoque médio dos ovos de 08 dias.

5.5 Análise estatística

Para avaliação de fertilidade, foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos (G1: de dois a seis dias, G2: de sete a 20 dias e G3: de 21 a 30 dias após a inseminação). Para a análise da média dos números de perfuração espermática na membrana perivitelina interna foi utilizado o programa estatístico R e como os resíduos não seguiram distribuição normal, foi realizada a análise não paramétrica com o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Para verificar a relação entre o tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com a fertilidade e desenvolvimento embrionário foi realizado o teste de correlação linear ($\alpha=0,05$) entre as variáveis avaliadas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às análises de perfuração espermática estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Médias e desvios padrões do número de perfuração espermática na membrana perivitelina nos grupos analisados

Grupo	Média	Desvio Padrão
G1	78,99 ^a	81,50
G2	31,87 ^b	40,87
G3	13,29 ^c	18,49

Letras diferentes significam diferença entre os grupos. G1 – de dois a seis dias; G2 – de sete a vinte dias; G3 – de 21 a 30 dias.

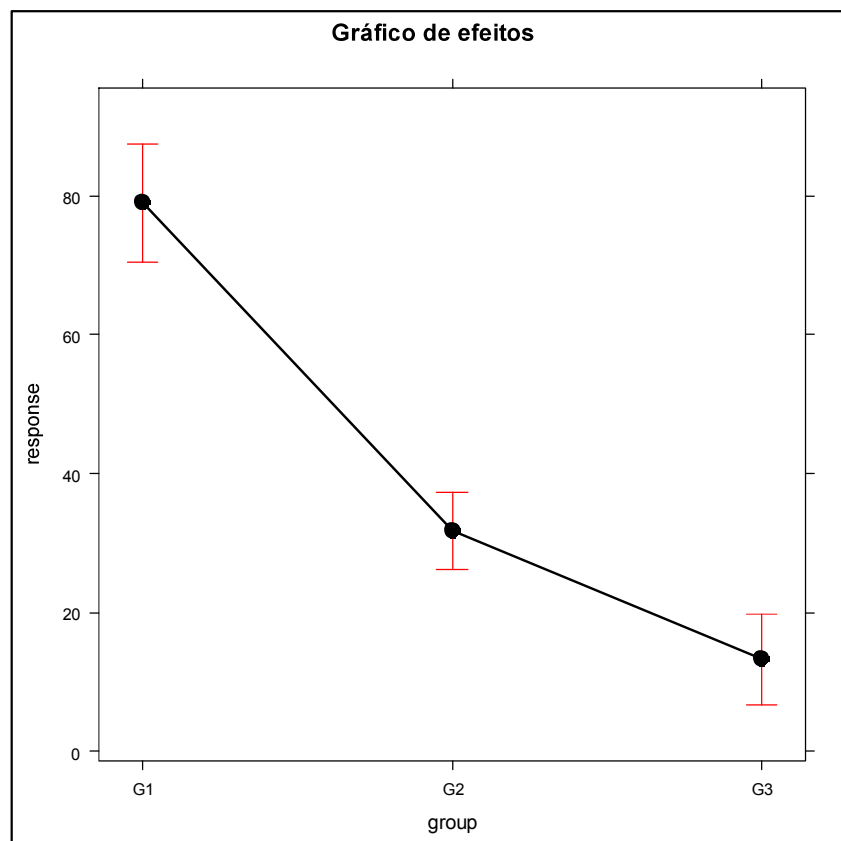
A média dos números de perfurações decresceram à medida que se passaram os dias após a inseminação. Bramwell (1998), em seu trabalho sobre perfurações espermáticas em linhagens reprodutoras, concluiu que uma boa uniformidade dos números de perfurações espermáticas dentro de um mesmo lote e ovos com números altos de perfurações, resultaram em uma ótima fertilidade e eclosão e determinou que uma média de 30 ou mais perfurações espermáticas são necessárias para manter uma boa fertilidade e viabilidade embrionária. Embora valores acima de 30 não necessariamente demonstraram maior fertilidade, valores abaixo desse número resultaram em redução de fertilidade. No presente trabalho com perus, a média de perfuração espermática variou de 78,99 a 13,29 em uma idade após o pico de produção. No entanto, é relevante esclarecer que as peruas avaliadas deixaram de ser inseminadas durante o período avaliado. Portanto, esta queda deveu-se provavelmente pela diminuição do número de espermatozoides nos TAE. Já nos lotes avaliados por Bramwell (1998) com galinhas, a média de perfuração espermática variou de menos de 60 a mais de 150, durante o pico de produção. Todos tiveram valores aceitáveis de fertilidade nesse período, porém com o aumento da idade das aves, os valores de perfurações espermáticas também reduziram drasticamente. Embora apenas um espermatozoide seja suficiente para fertilizar um único ovo, um baixo número de perfurações espermáticas em um determinado lote de aves está altamente correlacionado tanto com baixa fertilidade, quanto com mortalidade embrionária inicial e qualidade de prole, com conseqüente queda de eclodibilidade (BRAMWELL, 1998).

Wishart (1997), em seu trabalho sobre aspectos quantitativos da interação ovo: espermatozoide em peruas e galinhas, verificou que para ambas as espécies houve 50% de probabilidade do ovo ser fértil quando aproximadamente 03 espermatozoides perfuraram a membrana perivitelina interna e houve uma eficiência máxima de fertilidade, quando mais de 06 espermatozoides penetraram a membrana. Sugeriu então, que o número de espermatozoides interagindo com o ovo reflete o número de espermatozoides armazenados nos TAE na região útero-vaginal.

Houve diferença estatisticamente significativa para a análise de perfurações espermáticas na membrana perivitelina interna com o passar dos dias após a inseminação entre os três grupos avaliados (Gráfico 1). Nalbandov e Card (1943),

também relataram que espermatozoides velhos no oviduto têm sido associados à baixa qualidade de pintinhos e mortalidade embrionária inicial.

Gráfico 1 - Efeito dos dias após a inseminação artificial nos números de perfurações espermáticas na região do disco germinativo de ovos de peruas. G1 – dois a seis dias; G2 – sete a 20 dias; G3 – 21 a 30 dias após a inseminação.



Onde não ocorre sobreposição dos intervalos, significa que os grupos diferem estatisticamente. G1 – de dois a seis dias; G2 – de sete a vinte dias; G3 – de 21 a 30 dias.

Fairchild (2001), avaliou a relação da idade de peruas reprodutoras com números de perfuração espermática na membrana perivitelina em ovos coletados durante três semanas após uma única inseminação em um grupo de peruas de duas idades diferentes. O número de perfurações espermáticas foi significativamente maior em aves mais jovens em relação às mais velhas e o autor concluiu que esses fatores podem ser uma combinação de influências do oviduto e das características da membrana perivitelina interna que diferem com o passar do tempo.

Gumulka e Kapkowska (2005), em um trabalho sobre o efeito da idade de galinhas reprodutoras e a penetração do espermatozoide na membrana perivitelina interna, observaram redução do número de perfurações e conseqüente fertilidade com aves de 56 e 62 semanas de idade e sugeriram que essa queda de fertilidade relacionada à idade pode estar relacionada à diminuição de eficiência dos túbulos de armazenamento de espermatozoide com o passar do tempo, o que pode explicar a redução de perfurações também no trabalho atual.

Abouelezz et al. (2015) analisaram os efeitos do glicerol em diluentes de espermatozoides de galos sobre o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelina interna dos ovos e concluíram que esses números, assim como os percentuais de fertilidade diminuíram progressivamente à medida que as concentrações de glicerol eram de 1,5% ou maiores, mostrando a importância também da concentração dos diluentes para a capacidade de hidrólise da membrana pelos espermatozoides.

Bakst (2002), realizou um trabalho sobre a avaliação da perfuração espermática em ovos incubáveis e não incubáveis (exceto ovos de casca fina) de peruas e concluiu que não houve diferença significativa em relação ao número de perfurações espermáticas entre os dois tipos de ovos, mostrando que tal avaliação pode ser utilizada em ovos não incubáveis para estimar a fertilidade real de um lote. Essa prática eliminaria o uso de ovos incubáveis e daria uma função para os ovos não incubáveis, ao invés de descartá-los.

Chirstensen et al. (2005) concluíram em um trabalho que a seleção genética para características de importância econômica em linhagens de peruas pode ter efeito na competição espermática, medida por habilidade do espermatozoide de hidrolisar a membrana perivitelina interna, fertilizar o ovo e produzir embriões viáveis.

Os resultados referentes à fertilidade, eclosão e mortalidade embrionária dos diferentes grupos foram registrados e podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Percentual de ovos férteis, eclosão e mortalidade embrionária (1º, 2º, 3º e 4º fases) em relação aos dias após a inseminação artificial, representados por G1 (dois a seis dias), G2 (sete a 20 dias) e G3 (21 a 30 dias).

Grupo	Ovos férteis aos 14d (%)	Eclosão(%)	Mortalidade Embrionária (%)			
			1º fase	2º fase	3º fase	4º fase
G1	93,32 ^a	71,00 ^a	2,58 ^a	5,44 ^a	4,01	11,17 ^a
G2	86,77 ^b	62,00 ^b	3,55 ^b	7,09 ^b	4,96	14,89 ^b
G3	81,64 ^c	47,00 ^c	0,48 ^c	8,61 ^c	8,61	21,53 ^c

Letras diferentes significam diferença entre os grupos. G1 – de dois a seis dias; G2 – de sete a vinte dias;

G3 – de 21 a 30 dias.

Pode ser observado na Tabela 2, que os grupos apresentaram redução nos percentuais de fertilidade com o passar do tempo, assim como eclosão. As mortalidades embrionárias foram consideravelmente expressivas na fase final. É relevante informar que as demais peruas do mesmo lote que receberam inseminação semanal e que não participaram do experimento, mantiveram seus percentuais de fertilidade em média de 87% e eclosão 71%, de forma similar ao grupo 1. Para verificar a relação entre o tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com a fertilidade e desenvolvimento embrionário entre as variáveis acima, foi realizado o teste de correlação linear ($\alpha=0,05$).

Tabela 3 – Coeficientes de correlação entre o tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de peruas com percentuais de fertilidade, eclosão e mortalidade embrionária (1º, 2º, 3º e 4º fase).

	Tempo de armazenamento	Nº perfurações
Tempo de armazenamento	1,000	-0,949
Nº perfurações	-0,949	1,000
Fertilidade aos 14 dias	-0,991	0,983
Eclosão	-0,997	0,922
1º fase	-0,722	0,467
2º fase	0,996	-0,974
3º fase	0,966	-0,836
4º fase	0,996	-0,915

Coeficiente de correlação em vermelho são estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$)

O tempo de armazenamento dos espermatozoides apresentou correlação negativa e significativa com a fertilidade aos 14 dias e eclosão dos ovos e positiva e significativa com mortalidade embrionária na segunda e quarta fases do desenvolvimento embrionário.

A fertilidade tende a declinar com o aumento da idade de galinhas (FASENKO et al., 1992) e peruas (Sexton, 1977) reprodutoras. Tem sido sugerido que os espermatozoides armazenados no TAE são expostos a fatores (incluindo zinco, cálcio e ácido glutâmico) que suprimem a motilidade e o metabolismo espermático, a enzima acrosina, a imunogenicidade do espermatozoide e estabilizam o plasmalema e outras membranas espermáticas (HOLM et al., 2000). Bakst (1989) forneceu evidência de seleção espermática a nível de TAE. Aves mais jovens são capazes de reter mais espermatozoide nos TAE do que aves mais velhas (BRILLARD, 1992).

Compton e Van Krey (1979) sugeriram que apenas um número limitado de espermatozoides é capaz de penetrar nos TAE em um dado período de tempo. Aproximadamente 1 a 2% dos espermatozoides inseminados em peruas (BRILLARD; BAKST, 1990) foram encontrados nos TAE após 24h de inseminação. Bakst (1988) hipotetizou que a diminuição do volume de sêmen poderia influenciar o número de espermatozoides que alcançariam a junção útero-vaginal e influenciariam o preenchimento dos TAE. Ao testar essa hipótese, uma maior duração da fertilidade foi demonstrada em aves que foram inseminadas com doses maiores de sêmen em dois dias consecutivos do que naquelas que foram inseminadas com doses menores em cinco dias consecutivos, mesmo embora os dois grupos tenham recebido o mesmo número de espermatozoides no total. Os resultados do presente trabalho reforçam que tanto a dosagem do sêmen, quanto a frequência da inseminação são importantes na eficiência reprodutiva

Contrariando esses dados, Shubash et al. (2005), fizeram um trabalho, onde mostraram que repetidas inseminações artificiais podem causar anomalias de função e uma imunorresposta anti-espermatozoide nos TAE, prejudicando o armazenamento do espermatozoide e conseqüentemente resultando em queda de fertilidade.

Pelo menos três modelos de seleção espermática nos TAE foram hipotetizados. Esses modelos incluem: 1) perda passiva de espermatozoides, que consiste da liberação contínua de espermatozoides dos TAE; 2) deslocamento, que seria a

substituição de um espermatozoide já existente por um recentemente inseminado, e 3) estratificação, que consiste na teoria do primeiro a entrar/ último a sair (BIRKHEAD et al., 1993). A teoria da estratificação pode explicar os resultados obtidos no trabalho, onde quanto mais velhos os espermatozoides penetrando a membrana perivitelina, menor a fertilidade encontrada. Soares e Beletti (2006), realizaram estudos preliminares em sêmen de galos e verificaram alta correlação entre cromatina frouxa e baixa fertilidade. Desenvolveram uma hipótese de que existiria uma continuidade na compactação da cromatina dos espermatozoides durante seu armazenamento nos TAE de galinhas. Os achados do presente trabalho contradizem essa hipótese, já que espermatozoides com cromatina mais compactada melhorariam o desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013). Assim, sendo a descompactação espermática uma das possíveis explicações para problemas no desenvolvimento embrionário, o maior tempo de armazenamento pode ter induzido a problemas deste tipo nos espermatozoides armazenados.

Uma vez que as fases de desenvolvimento embrionário são similares, porém cronologicamente diferente para peruas e galinhas, Abott (1967) correlacionou as fases de desenvolvimento embrionário de perus aos de galinhas, como descrito por Hamburger e Hamilton (1951). Brake et al. (1997) relatou que dentre os diversos fatores que podem levar a um efeito adverso na embriogênese de aves, a alta duração do armazenamento do ovo e a idade das reprodutoras podem influenciar de forma negativa. No presente trabalho foi observado uma correlação positiva do tempo de armazenamento dos espermatozoides nos TAE com a morte embrionária. Isto demonstra que além da diminuição da fertilidade propriamente dita, o maior tempo de armazenamento nos TAE podem levar a existência de espermatozoides que permanecem com a capacidade fecundante, porém possuem alterações que inviabilizam o desenvolvimento embrionário normal. Alterações cromatínicas, epigenéticas e no conteúdo de RNA espermáticos podem ser algumas das alterações que os espermatozoides sofram durante o armazenamento no TAE que poderiam influenciar o desenvolvimento embrionário sem alterar a capacidade fecundante (BELETTI, 2013). Dessa forma, estudos posteriores são necessários para verificar as alterações que ocorrem nos espermatozoides enquanto armazenados nos TAE após a inseminação e que podem interferir na formação embrionária.

Rahn et al. (1981), descreveram que a mortalidade embrionária inicial (1º e 2º fases) parece ser maior em aves em início de produção, enquanto a mortalidade embrionária tardia (3º e 4º fases) é mais prevalente em aves mais velhas.

Landauer (1967) sugeriu que a sobrevivência embrionária tende a reduzir com a redução da fertilidade, como encontrado no presente trabalho.

Lodge et al. (1971) realizaram um trabalho, onde observaram a fertilidade diária e mortalidade embrionária em ovos provenientes de um grupo de galinhas durante três semanas após uma única inseminação. Um aumento significativo na fertilidade ocorreu do primeiro para o segundo e terceiro dia após a inseminação, apresentando uma queda discreta no quarto dia, permanecendo estável até o sexto dia e decrescendo de forma linear a partir do 18º dia. Esses resultados diferem dos encontrados neste trabalho, onde já a partir do sétimo dia após a inseminação, houve diferença significativa em relação à fertilidade. Já para mortalidade embrionária, verificaram maiores percentuais nos dias 1 e 2 após a inseminação, e o valor mínimo no dia 3. A partir do quarto dia, houve um aumento na incidência de mortalidade embrionária quanto maior a idade do espermatozoide, o que concordou com os resultados do trabalho atual para mortalidade embrionária de 2º e 4º fase, apesar de Lodge et al. (1971) não terem estratificado as mortalidades embrionárias por estágio de desenvolvimento. As especulações para as causas de perdas de fertilidade e desenvolvimento embrionário em relação à idade do espermatozoide foram apresentadas por Salisbury e Hart (1970). Dentre essas especulações, citam que a senilidade do gameta é um problema universal que reduz a fertilidade das células reprodutivas e aumenta a incidência de mortalidade nos embriões decorrentes da fusão nuclear do pronúcleo de gametas velhos. No ovo, sugeriram que a senescência resulta em uma falha do mecanismo de defesa contra a polispermia ou em uma denegação de genomas haploides da fêmea.

O número de perfurações apresentou correlação significativa e positiva com a fertilidade aos 14 dias de incubação, ou seja, quanto maior o número de perfurações, maior a fertilidade e quanto menor as perfurações, menor a fertilidade aos 14 dias. A correlação positiva entre o número de perfurações e a fertilidade, demonstra que esta metodologia é eficiente para avaliação da fertilidade.

Bramwell (1998) relatou que a avaliação da perfuração espermática é uma ferramenta poderosa. Esses valores são indicadores mais precisos de aptidão fértil, do que apenas valores de fertilidade, uma vez que através dessa avaliação, pode-se determinar quão susceptível um lote pode estar a futuros problemas de fertilidade. Um lote com perfurações espermáticas acima de 100 é muito menos susceptível a problemas futuros de fertilidade (devido stress ambiental, idade, etc.) do que um lote com uma média de 30 perfurações/ovo. Em muitos casos, é possível identificar lotes que poderão ter problemas de fertilidade e eclosão, e com menos alterações de manejo, evitar uma redução no número de pintinhos de qualidade eclodidos. Isso é possível, porque valores de fertilidade são baseados em escala binária (um ovo pode ser apenas fértil ou infértil) e os valores de perfuração espermática são determinados utilizando uma escala móvel ou graduada. Consequentemente, lotes que estejam começando a reduzir os valores de penetração espermática podem ser identificados antes que os valores de fertilidade e eclosão comecem a decair. Em termos simples, os valores de perfuração espermática permitem que uma ave em particular ou um lote de aves sejam avaliados sobre seu futuro potencial de queda de fertilidade, antes mesmo que essa queda ocorra.

O número de perfurações na membrana perivitelina sete dias após a inseminação demonstra a necessidade de inseminações com intervalo semanal, para que não haja perda na eficiência reprodutiva.

Rosa et al. (1995) realizaram um trabalho similar com peruas, para verificar a influência de diferentes intervalos de inseminação artificial (duas vezes por semana, uma vez por semana e a cada duas semanas) na fertilidade e concluíram que as fêmeas que apresentaram maior fertilidade foram as inseminadas duas vezes por semana. As aves submetidas ao intervalo semanal apresentaram fertilidade superior àquelas inseminadas a cada duas semanas.

VAN KREY e SDEGEL (1976), relataram que inseminações em galinhas com até nove dias de intervalo, utilizando-se dose dupla de sêmen (0,05ml), podem ser bem sucedidas quando comparadas com intervalos de cinco a sete dias utilizando dose de 0,023ml de sêmen.

De acordo com RESENDE (1977), reprodutoras leves inseminadas duas vezes por semana apresentam 5% de melhora na fertilidade, quando comparadas com

intervalo semanal entre inseminações. Segundo o mesmo autor, essa diferença não é suficiente para recomendar duas inseminações semanais, pois quando avaliou-se a necessidade de mão-de-obra, notou que estes índices não justificavam a adoção de uma segunda inseminação semanal.

DIMITROV et al. (1982) concluíram que o aumento do intervalo entre as inseminações de uma para duas semanas resultou em redução significativa na fertilidade dos ovos. WANG (1992) afirma que intervalos maiores que quatro dias representam diminuição progressiva na fertilidade. Este autor ainda cita que o intervalo de quatro dias apresentou 98,5% de fertilidade e, em cinco dias essa taxa reduziu para 95,4%.

7 CONCLUSÃO

Existem alterações espermáticas adquiridas durante o armazenamento do espermatozoide no TAE que não interferem na sua capacidade fecundante, mas interferem no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, estudos posteriores são necessários para verificar as alterações que ocorrem nos espermatozoides enquanto armazenados nos TAE após a inseminação e que podem interferir na formação embrionária.

8 REFERÊNCIAS

ABOTT, U. K. Avian developmental genetics. In: _____ **Methods in Developmental Biology**. F. H. Wilt and N. K. Wessells Ed., 1967, p.13-52.

ABOUELEZZ, F. M.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; ESTESO, M.C.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; CAMPO, J.L.; SANTIAGO-MORENO, J. Sperm-egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. **Theriogenology**, v.83(9), p.1541-1547, 2015.

ABPA. **Relatório Anual da Associação Brasileira de Produção Animal**, Brasília – DF, p.219-221, 2016.

ARJAMAA, O.;TALO, A. Smooth muscle of the quail oviduct functions as a stretch receptor during ovum transport. **Biology of Reproduction**, Turku, v. 29, p. 472–478, 1983.

BAKST, M. R. Anatomical basis of sperm storage in the avian oviduct. **Scanning Microscopy**, v.1, p.1257–1266, 1987.

BAKST, M. R. Chicken and turkey oviductal pH at known times postoviposition. **Poultry Science**, v. 59, p. 2793–2796, 1980.

BAKST, M. R. Duration of fertility of turkeys inseminated at different times after the onset of photostimulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, p. 531–537, 1988.

BAKST, M. R. et al. Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. **Poultry Science**, v. 89, p. 986–992, 2010.

BAKST, M. R. Fate of fluorescent stained sperm following insemination: new light on oviductal sperm transport and storage in the turkey. **Biology of Reproduction**, v.50, p.987–992, 1994.

BAKST, M. R. Observations on the turkey oviductal sperm-storage tubule using differential interference contrast microscopy. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.95, p.877-883, 1992.

BAKST, M. R. Oviductal sperm storage in poultry: A review. **Reproduction and Fertility Development**, v.5, p.595–599, 1993.

BAKST, M. R. Oviductal storage of spermatozoa in the turkey: its relevance to artificial insemination technology, **British Poultry Science**, v.30, p.441-447, 1989.

BAKST, M. R. Preservation of avian cells. In: ___ Crawford RD (ed.), **Poultry Breeding and Genetics**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishing B.V.; 1990.

BAKST, M. R. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1323-1329, 2010.

BAKST, M. R. Turkey hen fertility and egg production after artificial insemination and multiple oviduct eversion during the pre-laying period. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.83, p.873-877, 1988.

BAKST, M. R.; LONG, J. A. **Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination**. 2nd ed. Published as a CD by The Midwest Poultry Federation, Buffalo, MN, 2010.

BAKST, M. R.; AKUFFO, V. Alkaline phosphatase reactivity in the vagina and uterovaginal junction sperm-storage tubules of turkeys in egg production: Implications for sperm storage. **British Poultry Science**, v. 48, p. 515–518, 2007.

BAKST, M. R.; AKUFFO, V. Serotonin localization in the turkey vaginal but not sperm storage tubule epithelia. **Poultry Science**, v. 87, p. 356–361, 2008.

BAKST, M. R.; EASTRIDGE, J.; MALECKI, I. A. The inner perivitelline layer sperm hole assay: Use of filter paper rings for the isolation of the perivitelline layer overlying the germinal disc and new observations on its morphology. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.23, p.121–128, 2014.

BAKST, M. R.; MCGARY, S.; ESTEVEZ, I.; KNAPP, T. Use of Nonsettable Eggs to Evaluate Turkey Hen Fertility. **Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p.402–405, 2002.

BAKST, M. R.; WISHART, G.; BRILLARD, J. P. Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. **Poultry Science**, v. 5, p. 117–143, 1994.

BAKST, M.R.; BRILLARD, J.P. Mating and fertility. In: World Animal Science. Hunton, P. **Poultry Production**, v.9, ed. Elsevier, Amsterdam, p.271–282, 1995.

BAKST, M.R.; HOWARTH, B. Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock sperm. **Biology of Reproduction**, v.17, p.370–379, 1977.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p.92-96, 2013.

BIRKHEAD, T. R.; PELLATT, E. J.; FLETCHER, F. Selection and utilisation of spermatozoa in the reproductive tract of the female zebra finch *Taeniopygia guttata*. **Journal of Reproduction Fertility**, v.99, p.593-600, 1993.

BIRKHEAD, T. R.; BRILLARD, J. P. Reproductive isolation in birds: Postcopulatory prezygotic barriers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 266–272, 2007.

BIRKHEAD, T. R.; CUNNINGHAM, E. J. A.; CHENG, K. M. The insemination window provides a distorted view of sperm competition in birds. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 26, p.1187–1192, 1996.

BIRKHEAD, T. R.; MOLLER, A. P. Sperm Competition in Birds: Evolutionary Causes and Consequences. **Academic Press**, New York, NY, 1992.

BOBR, L.W. et al. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds.1. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. **Journal of Reproduction and Fertility**, C, v.8, p.39-47, 1964.

BOERJAN, M.L. Incubação em estágio único para melhorar a uniformidade. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA. v.1, p.325-333, 2006.

BOGDONOFF, P.D.; SCHAFFNER, C.S. The effect of pH on in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. **Poultry Science**, v.33, p.665–669, 1954.

BOOTSWALA, S.M.; MILES, R.D. Development of diluents for domestic fowl semen. **World's Poultry Science Journal**, v.48, p.121–128, 1992.

BRAKE, J.; WALSH, T. J.; BENTON, C. E.; PETITTE JR., J. N.; MEIJERHOF R.; PENALVA, G. Egg handling and storage. **Poultry Science**, v.76, p.144-151, 1997.

BRAMWELL, R. K. Sperm Penetration in Broiler Breeder Strain. **Poultry Science**, v. 80, p. 41-58, 1998.

BRAMWELL, R. K.; MARKS, H. L.; HOWARTH, B. J. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs. **Poultry Science**, v.74, p.1875–1883, 1995.

BRAMWELL, R. K.; DONOGHUE, A. M. Predicting fertility: Section 4. Determination of holes made by sperm in the perivitelline layer of laid eggs: The sperm penetration

assay. In: _____ **Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination**. 2nd ed. M. R. Bakst and J. A. Long, ed. Published as a CD by The Midwest Poultry Federation, Buffalo, MN, p. 90 – 94, 2010.

BRILLARD, J. P. Factors affecting oviductal sperm storage in domestic fowl following artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.27, p.247-256, 1992.

BRILLARD, J. P. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. **Poultry Science**, v.72, p.923–928, 1993.

BRILLARD, J. P.; BAKST, M. R. Quantification of spermatozoa in the sperm storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. **Biology of Reproduction**, v.43, p.271–275, 1990.

BRILLARD, J. P.; BAKST, M. R. Quantification of spermatozoa in the sperm storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. **Biology of Reproduction**, v.43, p.271-275, 1990.

BRILLARD, J. P.; BEAUMONT, C.; SCHELLER, M. F. Physiological responses of hens divergently selected on the number of chicks obtained from a single insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.114, p.111–117, 1998.

CALIL, T.A.C. Princípios básicos de incubação. In: Conferência APINCO 2007 – Simpósio sobre incubação. Santos, S.P. **Anais...** 2007.

CHRISTENSEN, V. L.; FAIRCHILD, B. D.; ORT, D. T.; NESTOR, K. E. Dam and Sire Effects on Sperm Penetration of the Perivitelline Layer and Resulting Fecundity of Different Lines of Turkeys. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, p.483–491, 2005.

CHRISTENSEN, V.L. Diluents, dilution, and storage of poultry semen for six hours. **Poultry Science Association**, v.68, p.90–106, 1995.

CHRISTENSEN, V.L.; BAGLEY, L.G. Efficacy of fertilization in artificially inseminated turkey hens. **Poultry Science**, v.68, p.724–729, 1989.

CLARK, R.N.; BAKST, M.R.; OTTINGER, M.A. Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. **Poultry Science**, v.63, p.801–805, 1984.

COMPTON, M. M.; VAN KREY, H. P. A histological examination of the uterovaginal sperm storage glands in the domestic hen following insemination. **Poultry Science**, v.58, p.478-480, 1979.

COOPER, D.M. Artificial insemination. In: Gordon, R.F. **Poultry Diseases**. Bailliere Tindall, London, p. 302–307, 1977.

DIMITROV, S.; KABAKCHEV, M.; ZHELIAZKOV, G. Fertility of feggs from dwarf broiller breeders hens depending on spermatozoa numbers and insemination frequency. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 1992, Amsterdam. **Anais...** Amsterdam, 1992, v. 1, p. 677-847.

DONOGHUE, A. M. et al. Flow cytometric assessment of the membrane integrity of fresh and stored turkey sperm using a combination of hypo-osmotic stress and fluorescent staining. **Theriogenology**, v.46, p.153–163, 1996.

DONOGHUE, A. M.; WISHART, G.J. Storage of poultry semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.213–232, 2000.

EBERHARD, W. G. Selection on cryptic female choice. In: ___ Female Control: Sexual Selection by Cryptic Female Choice. **Princeton University Press**, Princeton, NJ, p.44–79, 1996.

FAIRCHILD, B. D. **Turkey hen age, fertility and sperm penetration of the inner perivitelline layer affects embryonic mortality**. 2001. 169 f. Thesis (Doctor of Physiology) - Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh, 2001.

FASENKO, G. M.; HARDIN, R. T.; ROBINSON, F. E. Relationship of hen age and egg sequence position with fertility, hatchability, viability, and preincubation embryonic development in broiler breeders. **Poultry Science**, v.71, p.1374-1383, 1992.

FREEDMAN, S. L.; AKUFFO, V.; BAKST, M. R. Evidence for the innervation of sperm-storage tubules in the oviduct of the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Reproduction**, v.121, p.809–814, 2001.

FROMAN, D. P.; FELTMANN, A.J.; PENDARVIS, K.; COOKSEY, A. M.; BURGESS, S. C.; RHOADS, D.D. A proteome-based model for sperm mobility phenotype. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1330–1337, 2011.

FROMAN, D. P.; WARDELL, J. C.; FELTMANN, A. J. Sperm mobility: Deduction of a model explaining phenotypic variation in roosters (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**, v.74, p.487–491, 2006..

GEE, G.F. Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. **Poultry Science Association**, v.62 p.262–279, 1995.

GIESEN, A.F.; SEXTON, T.J. Beltsville poultry semen extender: Comparison of commercial diluents for holding turkey semen six hours at 15°C. **Poultry Science**, v.62, p.379–381, 1982.

GUMUŁKA, M.; KAPKOWSKA, E. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. **Animal Reproduction Science**, v.90, p.135–148, 2005.

GUPTA, S. K.; BAKST, M. R. Turkey embryo staging from cleavage through hypoblast formation. **Journal of Morphology**, v.217, p.313–325, 1993.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v.88, p.49-92, 1951.

HAMMERSTEDT, R.H.; SHULTZ, F.T. Long-duration semen holding: description, consequences and preparations for optimum use. **Turkeys**, v.43, p.22–25, 1995.

HAZARY, R. C.; STAINES, H. J.; WISHART, G. J. Assessing the efficiency of mating in broiler breeder flocks by enumerating the spermatozoa which penetrate the inner perivitelline layer over the germinal disc. **British Poultry Science**, v.41, p.395–400, 2000.

HOLM, L.; EKWALL, H.; WISHART, G. J.; RIDDERSTRALE, Y. Localization of calcium and zinc in the sperm storage tubules of chicken, quail and turkeys using X-ray microanalysis. **Journal of Reproduction Fertility**, v.118, p.331-336, 2000.

HOLM, L.; RIDDERSTRÅLE, Y. Development of sperm storage tubules in the quail during sexual maturation. **Journal of Experimental Zoology**, v.292, p.200–205, 2002.

HOLM, L.; RIDDERSTRÅLE, Y.; KNUTSSON, P.G. Localisation of carbonic anhydrase in the sperm storing regions of the domestic hen oviduct. **Acta Anatomica (Basel)**, v.156, p.253–260, 1996.

HOWARTH, B. J. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of turkey hens. **Poultry Science**, v.50, p.84–89, 1971.

KING, L. M. et al. Isolation of Sperm Storage Tubules from the Uterovaginal Junction Mucosa of the Turkey. **Poultry Science**, v.78, p.1044–1047, 1999.

KITAZAWA, T.; UKAI, H.; KOMORI, S.; TANEIKE, T. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced contraction in the chicken gastrointestinal tract. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v.26, p.157–168, 2006.

LAKE, P. E.; STEWART, J. M. Artificial insemination in poultry. **Ministry of Agriculture, Fish and Food**, Bulletin ed., v.213, 1978.

LAKE, P.E. Historical perspective of artificial insemination technology. **Poultry Science Association**, v.62, p.1–20, 1995.

LAKE, P.E.; MC INDOE, W.M. The glutamic acid and creatine content of cock seminal plasma. **Biochemistry Journal**, v.71, p.303–306, 1959.

LANDAUER, W. The hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. **Storrs Agricultural Experiment Station Monographs**, rev 1, p. 132-137, 1967.

LODGE, J, R.; FECHHEIMER, N. S.; JAAP, R. G. The Relationship of in Vivo Sperm Storage Interval to Fertility and Embryonic Survival in the Chicken. **Biology of Reproduction**, v. 5, p. 252-257, 1971.

LONG, E. L. et al. Serial Analysis of Gene Expression in Turkey Sperm Storage Tubules in the Presence and Absence of Resident Sperm. **Biology of Reproduction**, v.69, p.469–474, 2003.

MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B. Reproductive Technologies for Ratite Farming. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n.05, p.200, 2005.

MCLEAN, D. J.; FROMAN, D. P. Identification of a sperm cell attribute responsible for subfertility of roosters homozygous for the rose comb allele. **Biology of Reproduction**, v.54, p.168–172, 1996.

NALBANDOV, A.; CARD, L. E. Effect of stale sperm on fertility and hatchability of chicken eggs. **Poultry Science**, v.22, p.218-226, 1943.

NARISAWA, S., L. et al. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. **Molecular and Cellular Biology**, v.23, p. 7525– 7530, 2003.

OLSSON, C.; HOLMGREN, S. The control of gut motility. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.128, p.479–501, 2001.

PELÁEZ, J.; LONG, J. A. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: In vitro storage of turkey semen and mobility phenotype affects the carbohydrate component of sperm membrane glycoconjugates. **Journal of Andrology**, v.29, p.431–439, 2008.

POLGE, C. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -70°C. **Nature**, v.167, p.949–950, 1951.

QUINN, J.P.; BURROWS, W.H. Artificial insemination in fowls. **Journal of Heredity**, v.27, p.31–37, 1936.

RAHN, H.; CHRISTENSEN, V. L.; EDENS, F. W. Changes in shell conductance, pores and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens. **Poultry Science**, v.60, p.2536-2541, 1981.

REDDY, R.P. Artificial insemination of broilers: economic and management implications. **Poultry Science Association**, v.62, p.73–89, 1995.

RESENDE, O. **A. Influência de alguns fatores da inseminação artificial sobre a fertilidade em galinhas**. 1977. 96 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1977.

ROBERTSON, L.; WISHART, G. J.; HORROCKS, D. A. J. Identification of perivitelline N-linked glycans as mediators of sperm-egg interactions in chickens. **Reproduction**, v.120, p.397–403, 2000.

ROSA, A. P.; PAGANINI, F. J.; VIEIRA, N. S.; PALOSCHI, J. L. Influência de diferentes intervalos da inseminação artificial e do estresse do manejo da inseminação na produção e fertilidade de fêmeas avícolas. **Ciência Rural**, v.25, n.3, 1995.

RZAS, J.; PACZOSKA-EKIASIEWICZ, H.; KIERES, K. Serotonin concentration in the chicken oviduct (*Gallus domesticus*). **Acta Agraria Silvestria-Zootechnica**, v.29, p.113–120, 1991.

SALISBURY, G. W.; HART, R. G. Gamete aging and its consequences. **Biology of Reproduction. Supplement**. v. 2, p. 1-13, 1970.

SCHUPPIN, G. T. et al. Ultrastructural analyses of uterovaginal sperm storage glands in fertile and infertile turkey breeder hens. **Poultry Science**, v.63, p.1872–1882, 1984.

SEXTON, T. J. Relationship between number of sperm inseminated and fertility of turkey hens at various stages of production. **Poultry Science**, v.56, p.1054-1056, 1977.

SEXTON, T.J. Effect of semen treatments and age of tom on fertility of unstored semen and semen held 18 hours. **Poultry Science**, v.66, p.1721–1726, 1987.

SHUBASH, C. D.; NAGASAKA, N.; YOSHIMURA, Y. Effects of repeated artificial insemination on the structure and function of oviductal sperm storage tubules in hens. **Journal of Poultry Science**, v. 42, p. 39-47, 2005.

SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.2, p.543-553, 2006.

SPASOJEVIC, R. Two hundred million sperm cells per hen? No way! In: _____ **Proc. Midwest Poult. Fed. Turkey Breeder Workshop**. Published as a CD by The Midwest Poultry Federation, Buffalo, MN, 2010.

STEELE, M. G.; WISHART, G. J. Evidence for a species-specific barrier to sperm transport within the vagina of the chicken hen. **Theriogenology**, v.38. p.1107–1114, 1992.

STEPHENS, R. E.; PRIOR, G. Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: Extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation. **Journal of Cell Science**, v.103, p.999–1012, 1992.

THURSTON, R.J., HESS, B.L. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken, and guinea fowl. **Scanning Microscopy**, v.1, p.1829–1838, 1987.

UBA. **Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura**, Brasília-DF, p.52-53, 2003.

VAN KREY, H. P.; SDEGEL, P.B. A revised artificial insemination schedule for broiler breeder hens. **Poultry Science**, v.55, p. 725-728, 1976.

VAN WAMBEKE, V.F. Storage of fowl sperm: Preliminary results with new diluents. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.13, p.571–575, 1967.

VELCULESCU, V.E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.270, p.484–487, 1995.

WALL, K. A. **Factors affecting fertility in turkeys**. 1975. Ph.D. thesis - Clemson University, Clemson, 1975.

WANG, S. Studies on artificial insemination in broiler breeders. In: WORLD'S POULTRY CONGRESS, 1992, Amsterdam. **Anais...** Amsterdam, 1992, v. 1, p. 674-847.

WILSON, J. L. Métodos para valorar la capacidad reproductiva en gallos reproductores. **Avicultura Profesional**, v.6, n.3, p.76-81, 1988.

WISHART, G. J. Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.81–92, 1997.

WISHART, G. J., AND A. J. HORROCKS. Fertilization in birds. In: _____ TARIN, J. J.; CARO, A. **Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals.**, ed. Springer, New York, NY, p.193–222, 2000.

WISHART, G. J.; STAINES, H. J. Measuring sperm:egg interaction to assess breeding efficiency in chickens and turkeys. **Poultry Science**, v.78, p.428–436, 1999.

WISHART, G.J. New approaches to evaluating male and female fertility. **Poultry Science Association**, v.62, p.207–223, 1995.

WISHART, G.J. The effect of continuous aeration on the fertility of fowl and turkey semen stored above 0°C. **British Poultry Science**, v.22, p.445–450, 1981.