

# MANUAL DE PRODUÇÃO E SANIDADE AVÍCOLA

COORDENAÇÃO  
Hélder Quintas | Ramiro Valentim



# 9.

# INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

**ARMINDO ALVARO<sup>1</sup>, HÉLDER QUINTAS<sup>2</sup>, RAMIRO VALENTIM<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Superior Politécnico do Cuanza Sul, Angola

<sup>2</sup> Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.



A inseminação artificial (IA) foi realizada com sucesso pela primeira vez nas aves há aproximadamente 100 anos por Ivanov. Nos galos, a recolha de sémen tornou-se mais fácil com a utilização de dispositivos desenvolvidos por Ishikawa (1930). Em 1935, Burrows e Quinn descrevem uma técnica de massagem abdominal que permitia “ordenhar” os galos. A técnica de recolha de sémen, seguida de IA, foi desenvolvida por Burrows e Quinn (1936). Todos estes investigadores são considerados os pais da IA avícola.

A IA é um processo através do qual o sémen de um galo é recolhido e depois é colocado artificialmente no tracto genital de várias galinhas, com o objectivo de fecundar os oócitos II. Ela implica a recolha, avaliação, armazenamento, manuseamento e deposição dos espermatozóides (SPZ) no tracto genital da fêmea.

A IA é normalmente realizada com o objectivo de produzir ovos férteis e a produção de descendência viável. Contudo, ela é frequentemente utilizada com outros objectivos. Ela possibilita uma melhor utilização dos machos reprodutores, a rápida disseminação do material genético de um pequeno número de machos melhoradores por um elevado número de fêmeas, a criação de bancos de germoplasma, a gestão da variabilidade genética nas raças autóctones, evitando-se a consanguinidade, e a aplicação de programas de conservação das populações silvestres. Nas raças pesadas, a diferença de tamanho entre galos e galinhas resulta em montas malsucedidas e conseqüentemente em baixas taxas de fertilidade. Este problema é facilmente ultrapassado via IA. Porque deixa de ser necessário manter machos nas explorações, os custos de produção reduzem-se e o manejo torna-se mais simples. Por outro lado, a aplicação desta técnica facilita o controlo da transmissão de doenças sexualmente transmitidas.

Dentro do tracto genital da galinha, os SPZ são seleccionados, armazenados e migram até ao local da fecundação. A dose seminal deve ser colocada na vagina, próximo das glândulas tubulares SST, para que os SPZ nelas penetrem e se consigam obter boas taxas de fertilidade. Estima-se que apenas 1-2% dos SPZ colocados na vagina das galinhas seja transportado e entre nas SST. Quanto maior for a quantidade de sémen colocado na vagina menor é a quantidade de SPZ armazenados nas SST. Posteriormente, os SPZ migram até ao segundo reservatório de SPZ (junção do magno com o infundíbulo). A passagem de um oócito II pelo infundíbulo estimula a actividade espermática e a fecundação do gâmeta feminino.

## 1. FACTORES QUE AFECTAM A PRODUÇÃO DE SÉMEN

A produção de sémen varia significativamente entre raças, estirpe, linha e indivíduos. Antes da ejaculação, os SPZ de galo permanecem normalmente imóvel. São vários os factores internos (hormonais e funcionais) e externos capazes de influenciar a produção de sémen. De entre os factores externos há que destacar: o manejo geral, a alimentação, as condições ambientais, as relações sociais, o método de recolha de sémen, entre outros.

## 2. RECOLHA DE SÊMEN

Os galiformes não possuem um órgão copulador intermitente. Este é composto por pregas e protuberâncias que contactam com a cloaca da fêmea quando da cópula. Os galos possuem um corpo fático médio proeminente, corpos fáticos laterais relativamente pequenos e pregas linfáticas.

O principal objectivo da recolha de sêmen é obter um ejaculado com um volume máximo, limpo e de alta qualidade, através da menor manipulação possível. São vários os factores que influenciam a recolha e a qualidade do sêmen: genética, espermatogênese, regime luminoso, peso corporal, alimentação, manejo, momento da recolha, método e frequência das recolhas, treino dos galos, entre outros.

### 2.1. MÉTODOS DE RECOLHA DE SÊMEN

#### 2.1.1. MASSAGEM

Nos galos, o sêmen pode ser recolhido através de métodos não invasivos – massagem dorsal e/ou pressão exercida sobre a região da cloaca. É necessário apenas um técnico, embora a ajuda de um outro técnico seja sempre bem-vinda.

O galo deve ser retirado gentilmente da jaula e rapidamente imobilizado, com o peito voltado para baixo, sobre uma mesa (Figura 9.1). ou sobre o joelho do técnico que está sentado. De seguida, o seu dorso deve gentilmente massajado, de trás das asas até à cauda, com movimentos rápidos e a base da cauda deve ser esfregada entre os dedos polegar e indicador. O macho responde com a tumescência do falo, realizados 3-6 movimentos completos.



**FIGURA 9.1** – Recolha de sêmen em galos imobilizados sobre uma mesa (esquerda); recolha de sêmen de galo por massagem abdominal (direita).

De acordo com vários autores, não há qualquer indício de que o tipo de massagem (dorsal ou abdominal), isolada ou conjuntamente, permite obter maiores ejaculados. Outros referem que a massagem abdominal resulta na recolha de ejaculados menos volumosos, mas mais concentrados.

Conseguida a erecção do falo pode-se massajar igualmente as regiões moles do abdómen (massagem abdominal). De seguida, o técnico, com os dedos indicador e polegar, deve pressionar cuidadosamente, dorso-ventralmente, a cloaca e extrair o sémen a partir da papila externa do canal deferente (Figura 9.1). A aplicação de uma pressão excessiva pode causar sangramento. Nos galos treinados, todo este processo tarda cerca de 10-15 segundos.

O sémen surge como grandes gotas após cada movimento completo de estimulação. O sémen de galo é de cor branca (aspecto leitoso). Dada a proximidade da cloaca, o sémen recolhido pode estar conspurcado com fezes, urina e bactérias. Na verdade, há que evitar tocar com as mãos nas estruturas cloacais. Se o sémen for contaminado, ele deve ser imediatamente rejeitado. A fim de diminuir a probabilidade de ocorrer a contaminação do sémen, este deve ser aspirado directamente da cloaca com o auxílio de uma seringa estéril.

A manipulação da região cloacal pode conduzir a uma segunda ejaculação. Contudo, a repetição da massagem resulta num reduzido acréscimo de sémen recolhido. Várias massagens consecutivas podem causar lesões nas regiões cloacal e fállica e contribuir para a contaminação do sémen.

Antes de realizar a massagem é necessário adoptar várias medidas de maneio. Os machos devem ser previamente separados das fêmeas, por um período de 5-7 dias, para garantir uma maior produção de sémen. Contudo, alguns dias antes da recolha propriamente dita, os galos devem ser sujeitos a recolhas “preparatórias” para se ter a certeza que são férteis. Nem todos os galos são bons dadores de sémen. Os machos treinados produzem normalmente melhores ejaculados. A recolha de sémen deve ser feita sempre pelo mesmo técnico. No mesmo sentido, a recolha de sémen deve ser feita sempre sob as mesmas condições ambiente. A manipulação dos galos dadores de sémen deve ser feita com cuidado, a fim de se evitar que eles entre em stress e se debatam. Deve ser feita a tricotomia prévia das penas presentes na zona da cloaca. Porque o falo se situa na cloaca, os machos dadores de sémen devem ser postos em jejum 12 horas antes da recolha de sémen, de modo a prevenir a contaminação fecal do sémen.

### 2.1.2. ELECTROEJACULAÇÃO

A electroejaculação é um método de recolha de sémen baseado na inserção de uma sonda (8 mm de diâmetro x 35 mm de comprimento), com vários eléctrodos incorporados, no recto do galo e na promoção de uma estimulação eléctrica. A contenção do galo passa por amarrar-lhe ambas as patas (usando uma corda com um laço) e puxá-las para baixo em direcção aos pés do técnico (aproveitando o laço da corda), que permanece sentado numa cadeira. O galo é pousado sobre o joelho do técnico, apoiado sobre o peito e a coxa, com a cauda voltada para o técnico. As fezes e a urina devem ser previamente removidas com uma solução fisiológica aquecida. O excesso desta solução deve ser removido com algodão absorvente.

Os ejaculados recolhidos por electroejaculação devem ter um volume de 0,1-1,0 ml, uma concentração de 0,8-2,3 biliões de SPZ/ml e uma motilidade de 4 (escala de 0-5).

Durante a electroejaculação, respeitados os procedimentos de manuseamento do animal, os sinais de desconforto/dor são praticamente imperceptíveis.

## 2.2. FREQUÊNCIA DA RECOLHA DE SÊMEN

A frequência de recolha de amostras de sêmen afecta o sucesso da IA. Elevados períodos de intervalo entre recolhas de sêmen resultam na presença de uma elevada percentagem de SPZ senis nos ductos deferentes. Pelo contrário, recolhas muito frequentes conduzem à produção de ejaculados pouco concentrados e à ejaculação de SPZ imaturos. A frequência ideal de recolha depende de factores: genéticos, individuais, ambientais, sociais e método usado. Nos galos, a frequência recomendada é três vezes/semana (dias alternados).

## 3. CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN DE GALO

Nos anos 60 e 70 do século passado, o número de doses seminais a preparar a partir de um ejaculado era calculado tendo por base o seu volume. Nos anos 70 e 80, a preparação das doses de IA passou a basear-se no número total de SPZ ejaculados. A partir dos finais dos anos 80, esta preparação passou a assentar no número de SPZ viáveis.

O sêmen é composto por SPZ e por plasma seminal segregado nos testículos, nos epidídimos e nos ductos deferentes (Quadro 9.1), sob controlo da testosterona. O plasma seminal tem um pH neutro (ou ligeiramente alcalino) e a sua osmolaridade é suportada por um elevado conteúdo em aminoácidos (como o glutamato) e várias proteínas. Ele possui ainda um elevado teor de colesterol e de fosfolípidos, com origem em numerosas vesículas lipídicas e lipoproteicas.

**QUADRO 9.1** – Características e componentes químicos do sêmen de galo (Hafez e Hafez, 2000)

Características e componentes do sêmen	Galo
Volume do ejaculado (ml)	0,2-0,5
Concentração espermática (x 10 <sup>6</sup> /ml)	3.000-7.000
Concentração do ejaculado (x 10 <sup>9</sup> )	0,06-3,5
Espermatozóides móveis (%)	60-80
Espermatozóides normais (%)	85-90
Proteína (g/100 ml)	2,8
pH	7,2-7,6
Frutose (mg/100 ml)	4
Sorbitol (mg/100 ml)	0-10
Inositol (mg/ 100 ml)	16-20
Glicerilfosforilcolina (GPC) (mg/100 ml)	0-40
Ergotioneína (mg/100 ml)	0-2
Sódio (mg/100 ml)	352
Potássio (mg/100 ml)	61
Cálcio (mg/100 ml)	10
Magnésio (mg/100 ml)	14
Cloro (mg/100 ml)	147

O plasma seminal estimula a motilidade espermática e é essencial quando da ejaculação. Não é um meio ideal de conservação dos SPZ, embora possua fracções de elevado peso molecular (que suportam a fertilidade), que são removidas do ejaculado antes dos SPZ alcançarem as SST.

#### 4. ANÁLISES SEMINAIS

O potencial reprodutivo dos galos depende muito da qualidade do sémen produzido. As análises seminais permitem identificar e seleccionar os melhores reprodutores e eliminar os machos pouco férteis ou inférteis, avaliar quantitativa e qualitativamente o sémen e calcular a diluição do sémen e o número de doses que podem ser preparadas. A utilização de sémen de baixa qualidade resulta numa reduzida taxa de fertilidade, num aumento da taxa de mortalidade embrionária e obriga a galinha a depender de SPZ anteriormente inseminados.

A qualidade do sémen de galo depende de vários factores: genética, indivíduo (idade, estado de saúde), estação do ano, fotoperíodo, alimentação, frequência de ejaculações, entre outros.

As análises seminais tradicionais incluem o volume do ejaculado, o seu aspecto, a concentração espermática, a motilidade e as percentagens de SPZ vivos e normais. Muitos destes parâmetros correlacionam-se com a capacidade fertilizadora dos SPZ.

##### 4.1. VOLUME DO EJACULADO

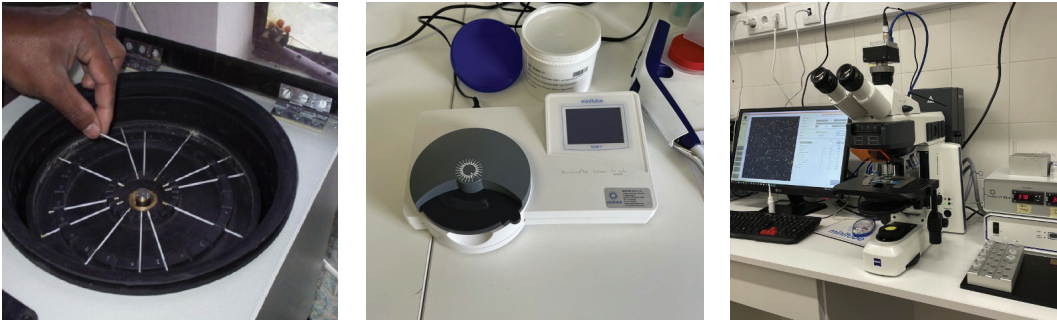
O volume do ejaculado é medido com recurso a uma seringa ou a um tubo graduado. Este parâmetro varia em função da genética, da idade, do peso, da estação do ano, da secreção relativa das várias glândulas secretoras do fluido seminal, do momento e do método e da frequência das recolhas dos ejaculados, entre outros.

##### 4.2. COR

O sémen de galo deve ter uma cor branco pérola e aspecto cremoso, ser viscoso e estar limpo. Ejaculados com outra cor, aguados (baixa concentração de SPZ), contaminados com sangue (vermelho ou acastanhado) ou com resíduos fecais/urinários (verde/amarelo) devem ser liminarmente rejeitados.

##### 4.3. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

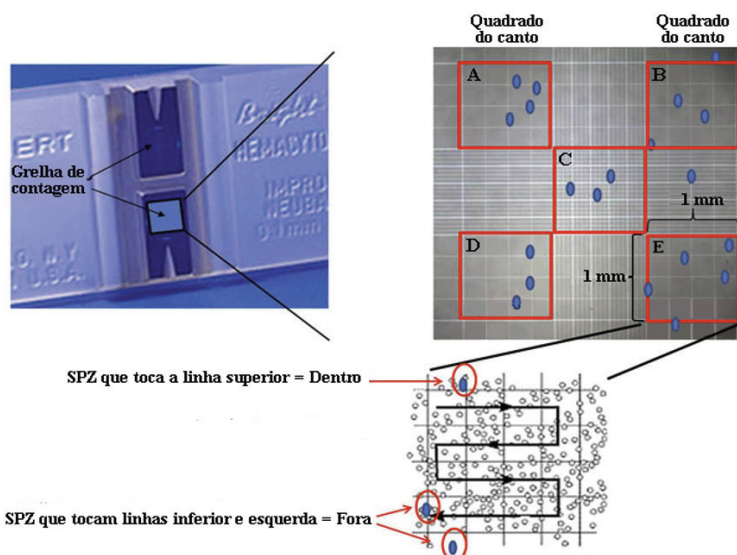
Um dos parâmetros mais utilizados de avaliação da qualidade seminal é a concentração espermática. A concentração espermática pode ser estimada com recurso a um hemocítmetro, um espermatócrito, um espectrofotómetro ou a um sistema computadorizado de análise seminal (CASA) (Figura 9.2).



**FIGURA 9.2** – Equipamentos que podem ser usados na estimação da concentração espermática. Centrifuga de espermátocritos (esquerda), fotômetro (centro) e sistema CASA (direita).

No hemocitômetro, depois de diluído o sêmen, os SPZ são contados numa câmara, por exemplo, de Neubauer melhorada (Figura 9.3). Trata-se de um método tedioso. A determinação da concentração espermática por espermátocrito é semelhante à determinação dos valores de hematócrito sanguíneo. O sêmen é aspirado para microtubos de hematócrito, que depois são centrifugados, numa centrífuga de hematócritos, durante 10 minutos. A concentração espermática é estimada usando um factor de conversão ou uma curva padrão previamente calculada com um hemocitômetro. O espectrofotômetro mede a densidade óptica do sêmen diluído. Quanta mais luz for reflectida, maior será a concentração espermática. Também neste caso, a concentração espermática é estimada usando um factor de conversão ou uma curva padrão previamente calculada. Estes métodos são fiáveis, ainda que a velocidade de rotação e a intensidade do feixe luminoso possam variar com a marca, a idade e o uso repetido do equipamento. No mesmo sentido, os resultados dependem do técnico que o realiza.

O sistema CASA, a partir de uma amostra de sêmen diluído, calcula a motilidade e a concentração espermática, contando o número de SPZ presentes nas fotografias de vários campos do microscópio. Pode ser ainda usado na avaliação da morfologia, da integridade das membranas plasmática e acrossômica, da actividade mitocondrial e da integridade do ácido desoxirribonucleico (DNA).



**FIGURA 9.3** – Câmara de Neubauer melhorada e método de contagem de espermatozoides (SPZ).

Alguns autores afirmam que o sêmen de galo possui entre 2.000-4.000 x 10<sup>6</sup> SPZ/ml. Outros asseguram que este parâmetro varia entre 3.000-7.000 x 10<sup>6</sup> SPZ/ml. Outros ainda referem uma concentração espermática média de 5.000 x 10<sup>6</sup> SPZ/ml. Valores inferiores aos esperados podem significar uma inadequada produção testicular de SPZ ou a presença de um número insuficiente de células espermáticas nos canais deferentes. Nos galos, a taxa de fertilidade depende mais da qualidade do que da quantidade do sêmen.

A concentração espermática varia em função da genética, da idade, do peso, da estação do ano, do número de SPZ produzidos, do momento e do método de recolha do ejaculado. No mesmo sentido, ela varia em função da frequência de recolha. Os galos podem realizar mais de 25 cobrições por dia. Numa sessão de recolha de sêmen, o primeiro ejaculado recolhido é, normalmente, o mais concentrado, ainda que a recolha de um segundo ejaculado possibilite a obtenção de um maior número total de SPZ.

#### 4.4. MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade é a função mais óbvia dos SPZ e o principal factor condicionador da fertilidade. Ela pode ser progressiva (para diante) ou não-progressiva (movimentos ao acaso ou oscilatórios). A motilidade progressiva está normalmente associada a taxas de fertilidade mais elevadas.

A motilidade dos SPZ pode ser avaliada microscopicamente (ampliação de 50 X) e, sob certas condições, macroscopicamente. São vários os métodos subjectivos e objectivos, qualitativos e quantitativos de avaliação da motilidade espermática. Pode ser avaliada colocando uma gota de sêmen não diluído ou diluído entre uma lâmina de microscópio e uma lamela ou utilizando um sistema CASA.

#### 4.5. PERCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES VIVOS (VIABILIDADE)

A percentagem de SPZ vivos é determinada depois de diluir uma amostra de sêmen com uma solução com eosina-nigrosina e de realizar um esfregaço. A lâmina é então observada num microscópio sob uma ampliação de 80-100 X.

Os SPZ vivos quando da diluição do sêmen permanecem de cor branco-pérola e os mortos ficam tingidos de rosa-magenta. A nigrosina serve para escurecer o fundo e distinguir melhor os SPZ vivos dos SPZ mortos.

#### 4.6. MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES

Os SPZ possuem uma cabeça, uma peça intermédia e uma cauda ou flagelo. A cabeça contém o núcleo (com o material genético do pai). Os invólucros pós-nuclear (que cobre a porção posterior do núcleo) e acrossômico (que cobre a porção anterior do núcleo) têm por função proteger o núcleo. O acrossoma transporta várias enzimas hidrolíticas como a acrosina (envolvidas na digestão da membrana vitelina do oócito II). A peça intermédia tem dois centríolos – proximal e distal – e um elevado número de mitocôndrias (aproximadamente 30). É o motor do metabolismo energético, ainda que não possua reservas intracelulares significativas de energia. O flagelo é a porção mais comprida do SPZ – 70-100  $\mu$ m. Ele começa a nível do centríolo distal e contém um axonema com um par central e nove periféricos de microtúbulos.

Os SPZ das aves diferem morfológicamente dos dos mamíferos. Mais, entre as várias espécies de aves domesticadas existem diferenças quanto à forma e ao tamanho dos SPZ. As células espermáticas dos galos possuem uma peça intermédia consideravelmente longa (cerca de  $\frac{1}{4}$  do seu comprimento total). Os principais defeitos morfológicos dos SPZ de galo são: peça intermédia dobrada, peça intermédia danificada, acrossoma danificado (dobrado, edemaciado, atado ou arredondado), cabeça edemaciada e cauda defeituosa.

A malformação ou a lesão do acrossoma impede o SPZ de ultrapassar a membrana vitelina interna e de fertilizar o oócito II. A morfologia dos SPZ pode ser avaliada através de uma técnica de coloração com eosina-nigrosina. Uma amostra de sémen colorido é espalhada sobre uma lâmina de microscópio – esfregaço. Depois de secar, ela é observada ao microscópio (1.000 X). Os SPZ podem então ser classificados como normais ou anormais. Os SPZ anormais são classificados de acordo com o tipo de anomalia apresentada – peça intermédia dobrada, macrocefálico, entre outros – e é calculada a percentagem de cada tipo. Trata-se de um procedimento demorado e que pode comportar alguns erros.

A morfologia dos SPZ pode ser avaliada usando vários tipos de corantes. Assim, por exemplo, a eosina penetra apenas nos organelos dos SPZ com membranas danificadas. Os corantes fluorescentes, como o iodeto de propídio, atravessam as membranas plasmática e nuclear dos SPZ danificados e coram o núcleo de vermelho. O iodeto de propídio pode ser usado, conjuntamente com o diacetato de carboxifluoresceína ou o SYBR-14, ultrapassando a membrana plasmática intacta dos SPZ metabolicamente competentes.

## 5. DILUIDORES SEMINAIS

A difusão da IA pode ser aumentada melhorando a eficácia dos diluidores seminais e dos métodos de conservação do sémen. A capacidade fertilizadora do sémen de galo preservado diminui rapidamente. Muitos avicultores inseminam as suas galinhas com sémen não diluído. Na verdade, não é fácil recriar um ambiente *in vitro* adequado à extensão da sobrevivência dos SPZ. Contudo, se for necessário preservar o sémen por um período de tempo superior a 1 hora pós-recolha, há que o diluir com um diluidor adequado. A diluição do sémen comporta várias outras vantagens. Ela maximiza a utilização de doses seminais de qualidade, reduz a relação entre machos e fêmeas e possibilita a disseminação de pequenas quantidades de sémen produzidas por machos melhoradores por um elevado número de fêmeas. Por outro lado, o aumento do volume reduz os efeitos negativos do metabolismo dos SPZ e prolonga a sua viabilidade. Mais, é difícil manusear volumes muito reduzidos de sémen puro e expeli-lo através de um tubo (devido à sua viscosidade natural). Já o sémen diluído é fácil de manusear. Contudo, a diluição do sémen comporta sempre uma redução de 2-3% da taxa de fertilidade.

São vários os diluidores que podem ser usados na preservação (a curto e a longo prazo) de sémen de galo. Eles baseiam-se na composição iónica das secreções do tracto genital do galo. Os primeiros diluidores de sémen usavam apenas soluções salinas (com, por exemplo, cloreto de sódio; NaCl), com o objectivo de reduzir a acidificação do meio causada pelo metabolismo dos SPZ. Os actuais diluidores são mais complexos e contêm vários reguladores osmóticos, fontes de energia, soluções tampão e elementos de protecção microbiológica. O glutamato, o acetato e o citrato são alguns dos constituintes mais utilizados nos meios de diluição do sémen de galo. Na preservação do sémen de

galo, o glutamato parece não ser um substrato oxidativo importante, podendo mesmo ter efeitos deletérios quando os SPZ são armazenados a temperaturas mais elevadas. Estes efeitos não se verificam quando os SPZ são armazenados a temperaturas mais baixas.

Os diluidores seminais devem ser isotônicos. Tanto os diluidores hipertônicos como os hipotônicos reduzem a actividade metabólica dos SPZ e podem perturbar a integridade das suas membranas. A contaminação do sémen com urina e bactérias promove um aumento da pressão osmótica. Uma pressão osmótica de 375 mOsm/kg permite a sobrevivência dos SPZ armazenados por um curto período de tempo. Porém, a osmolaridade recomendada por vários autores é de 220 mOsm/kg, semelhante à osmolaridade natural do sémen de galo. Outros propõem osmolaridades entre 320-450 mOsm/kg. Estas condições de hiposmolaridade resultam na tumescência da cabeça dos SPZ. Neste sentido, alguns autores sugerem que os diluidores seminais sejam isotônicos.

Quando da ejaculação, os SPZ são muito pobres em reservas intracelulares de energia. Eles utilizam naturalmente metabolismos (fundamentalmente, frutose, glicose e ácidos gordos) presentes no plasma seminal. Os nutrientes presentes nos diluidores seminais mantêm a viabilidade *in vitro* dos SPZ, uma vez que preservam a integridade das suas membranas e mantêm a sua motilidade e capacidade fertilizadora. Os diluidores seminais, com o intuito de proteger as membranas espermáticas da acção deletéria dos radicais livres e dos peróxidos, resultantes do metabolismo dos SPZ, devem incorporar antioxidantes como a vitamina E e o selênio.

Os diluidores seminais devem ter um pH próximo do neutro – 6,8-7,4. O pH altera a taxa metabólica e a motilidade dos SPZ. Assim, por exemplo, enquanto um pH reduzido diminui a motilidade espermática, um pH elevado aumenta a taxa metabólica. Os agentes tampão são compostos por uma diluição, na qual é misturado um ácido e a sua base conjugada, de modo a limitar as alterações do pH. Os SPZ do galo toleram variações do pH de 6,0-8,0. *In vitro*, enquanto que um pH baixo reduz a motilidade, a produção de ácido láctico e o consumo de oxigénio por parte dos SPZ, um pH alto eleva a taxa metabólica e a mortalidade espermática.

Quanto mais longo for o período de conservação, mais baixa deve ser a temperatura. Os processos de refrigeração e de congelação do sémen comportam dificuldades acrescidas. Os SPZ são extremamente sensíveis ao stress oxidativo, ou seja, às lesões oxidativas. A peroxidação lipídica desempenha um papel central no processo de envelhecimento dos SPZ, reduzindo o seu período de vida *in vitro* e a sua preservação tendo em vista a IA. Este processo induz alterações estruturais, particularmente na região acrossómica do SPZ, uma rápida e irreversível perda de motilidade, uma modificação profunda do metabolismo e uma elevada taxa de perda (por libertação) de componentes intracelulares.

## 6. FORMAS DE PRESERVAÇÃO DO SÉMEN

A preservação *in vitro* do sémen deve ser feita muito cuidadosamente, uma vez que qualquer erro de procedimento pode ter consequências exacerbadas quando do seu armazenamento no oviduto da fêmea. Os SPZ previamente armazenados *in vitro* fazem parte da população de células espermáticas que são rapidamente eliminadas do oviduto.

### 6.1. FRESCO

O sémen fresco é muito utilizado na Produção Avícola devido à facilidade de o recolher e preparar e à presença dos galos dadores próximo das grandes explorações de reprodutoras. A utilização de sémen fresco tem duas etapas: 1) recolha de sémen (e sua eventual diluição) e 2) sua colocação no interior do tracto genital feminino.

O sémen fresco de galo pode ser diluído ou não. Ele não tem de ser diluído se for depositado no tracto genital das galinhas no prazo de 30-45 minutos pós-colheita. Depois disso tem de ser diluído. No prazo uma hora, o sémen de galo não diluído perde gradualmente motilidade e capacidade fertilizadora. O sémen fresco diluído em *Beltsville poultry semen extender* (BPSE) ou em meio essencial mínimo (MEM), mantido a 41°C, atrasa a morte dos SPZ. Desta forma, o sémen diluído facilita o maneio reprodutivo e possibilita a inseminação de galinhas localizadas a alguma distância. Os diluidores seminais facilitam ainda o manuseamento do sémen, ao mesmo tempo que mantêm a sua viabilidade e previnem a sua activação. Por outro lado, a diluição do sémen pode aumentar o número de doses que podem ser preparadas a partir de um único ejaculado.

### 6.2. REFRIGERADO

O uso de sémen refrigerado, para além do procedimento indicado para o sémen fresco, implica o desenvolvimento de protocolos de refrigeração e de preservação do sémen.

O sémen refrigerado tem de ser diluído. A qualidade do sémen refrigerado depende de vários factores: diluidor e grau de diluição utilizado, curva de refrigeração, temperatura de refrigeração, oxigenação, entre outros. O nível de diluição do sémen condiciona as características dos SPZ, nomeadamente a sua motilidade e capacidade fertilizadora. Empiricamente, a taxa de diluição óptima do sémen de galo varia entre 1/2 e 1/3. Diluições superiores (> 1/5) reduzem a capacidade de sobrevivência dos SPZ, uma vez que estimula o seu metabolismo e a sua motilidade. Pelo contrário, o sémen pouco diluído (< 1/1) não permite que os SPZ sobrevivam às baixas temperaturas. Segundo alguns autores, *in vitro*, os SPZ dos galos são metabolicamente competentes em ambientes aeróbicos e anaeróbicos.

O sémen de galo deve ser refrigerado a temperaturas superiores a 0°C e iguais ou inferiores a 5°C. A essas temperaturas, o metabolismo dos SPZ reduz-se, o que prolonga a sua capacidade fertilizadora, e a proliferação dos microrganismos é limitada. Quando preservado a 4-5°C, o sémen mantém a sua capacidade fertilizadora durante cerca de 6 horas. Sauveur (1988) verificaram que o sémen preservado a 12-15°C, sem oxigenação, conserva o seu poder fecundante durante 6 horas. Brillard (2009) afirmam que a preservação de sémen por períodos de tempo mais longos implica a sua refrigeração a 4-10°C. Mohan et al. (2018) garantem que o sémen de galo refrigerado a 7-8°C mantém o seu poder fecundante durante 24 horas. Donoghue e Wishart (2000) defendem que o sémen deve ser preservado a 2-8°C. Segundo Van Wambeke (1967) e Lake e Ravie (1979), o sémen de galo, diluído a 1/2 ou 1/3 e conservado, durante 24 horas, a 5°C, mantém níveis de fertilidade superiores a 90%. De acordo com Getachew (2016), o protocolo de preservação de sémen de galo mais usado implica a sua conservação a -4°C, durante várias horas ou dias. A idade dos galos afecta a sensibilidade dos SPZ ao processo de refrigeração. Esta tende a aumentar com a idade. A curva de refrigeração do sémen de galo deve ser de 0,5-1,0°C/minuto, o que ajuda a prevenir os efeitos adversos do choque térmico.

A preservação *in vitro* dos SPZ produz alterações tipo-capacitação, necessárias à ocorrência da reacção acrossómica.

O sémen de galo preservado, durante 24 horas, a 5°C, pode ser transportado a nível mundial, uma vez que cumpre os regulamentos internacionais de biossegurança.

### 6.3. CRIOPRESERVADO

Várias técnicas de criopreservação do sémen têm sido estudadas em diferentes espécies de aves domesticadas e não domesticadas. As galinhas foram os primeiros animais inseminados artificialmente com SPZ criopreservados. A difusão desta técnica entre as aves tem sido atrasada por vários problemas técnicos e pela redução marcada da taxa de fertilidade que ela comporta. Ainda assim ela constitui uma excelente ferramenta na limitação da erosão da biodiversidade genética e na preservação de raças em vias de extinção. Presentemente, a rápida degradação dos recursos genéticos das galinhas é uma consequência do desaparecimento progressivo de múltiplas populações de galinhas e da elevada especialização das linhas comerciais.

As causas da diminuição da capacidade fertilizadora dos SPZ criopreservados não são totalmente conhecidas. Sabe-se que a congelação dos SPZ pode resultar na degradação das suas membranas (causada pela formação de cristais de gelo) e em toxicidade (promovida pela concentração intracelular do crioprotector). Nas aves, as membranas dos SPZ são ricas em ácidos gordos polinsaturados, que são altamente susceptíveis à peroxidação lipídica. Na verdade, a criopreservação causa stress oxidativo e consequentemente eleva a oxidação dos componentes celulares e a produção excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Por outro lado, a conservação dos SPZ a temperaturas “infra-fisiológicas” sujeita-os a rápidas transições de fase que podem resultar na alteração da fluidez e da plasticidade das membranas. A fluidez das membranas depende ainda da composição fosfolipídica e da relação entre colesterol e lípidos. A perda de fosfolípidos membranares parece estar associada, pelo menos em parte, à acção de fosfolipases endógenas.

Os SPZ dos galos têm uma cabeça cilíndrica, ligeiramente mais larga do que a cauda ( $\approx 0,5 \mu\text{m}$ ). Um menor volume de citoplasma resulta numa maior dificuldade do trânsito dos crioprotectores através das membranas celulares. Adicionalmente, a cauda é muito comprida – 70-100  $\mu\text{m}$ , cerca de 8 vezes o tamanho da cabeça, o que a torna mais susceptíveis a lesões causadas pela congelação/descongelação. A redução da taxa de fertilidade pode ainda resultar do sistema de transporte e de armazenamento dos SPZ no tracto genital da galinha.

Durante o processo de criopreservação, as membranas plasmáticas são submetidas a stress osmótico específico. No decurso das várias etapas da congelação, as células espermáticas são sujeitas a reduções sucessivas do seu volume (desidratação e acção interna do crioprotector). Por seu turno, durante o processo de descongelação, os SPZ intumescem devido à reidratação e à expulsão do crioprotector do seu interior. Por outro lado, há uma formação transitória de partículas de gelo que induzem tensões muito elevadas dentro das células espermáticas. A membrana nuclear parece resistir bem a este efeito, mas as membranas plasmáticas e as mitocôndrias são muito sensíveis a estas formas de stress físico. Consequentemente, as lesões membranares causadas pelos processos de congelação/descongelação determinam a morte de mais de 50% dos SPZ, porque causam rigidez das membranas, defeitos metabólicos com efeitos sobre a motilidade, redução dos níveis de adenosina trifosfato (ATP) e alterações do glicocálice da membrana plasmática.

Os processos de congelação alteram frequentemente a reacção acrossómica. Todavia, ao contrário do que sucede na refrigeração, a criopreservação parece ter um efeito secundário sobre a capacidade dos SPZ sofrerem reacção acrossómica. De facto, a capacidade dos melhores SPZ sofrerem reacção acrossómica é menos alterada do que é a sua motilidade e viabilidade. Porém, quando ocorre, a alteração da capacidade de sofrer reacção acrossómica é irreversivelmente induzida pelo primeiro contacto com o crioprotector que entra nas células espermáticas.

O crioprotector mais utilizado é o glicerol. Todavia podem ser usados outros crioprotectores – dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), etilenoglicol (EG), dimetilformamida, propilenoglicol e N-metilacetamida (NMA). Alguns autores consideram que a utilização destes outros crioprotectores parece ser muito promissora. Outros autores consideram que a criopreservação de sémen diluído com DMSO em pellets é mais eficiente do que a criopreservação de sémen diluído com glicerol em palhinhas de sémen. Pelo contrário, alguns autores afirmam que o DMSO é o crioprotector mais tóxico e o menos eficaz. Estes autores asseguram que o EG é menos eficaz do que o DMA. Curiosamente, eles garantem que o glicerol é o crioprotector menos tóxico e o mais eficaz, apesar de ter efeitos contraceptivos quando colocado na vagina das galinhas.

Na criopreservação com glicerol, os procedimentos laboratoriais tendem a ser trabalhosos, dado que este crioprotector é potencialmente tóxico para as células espermáticas. A descongelação de sémen diluído com glicerol implica a sua remoção pré-IA. Esta remoção pode ser feita por diálise ou diluindo a dose seminal sucessivamente num meio sem glicerol, centrifugando e ressuspendendo os SPZ. Ambos os métodos têm desvantagens: a diálise tende a ser demorada e a centrifugação provoca lesões nos SPZ. A remoção do glicerol, porque causa lesões osmóticas e físicas, determina uma redução da capacidade fertilizadora dos SPZ. Outros crioprotectores, como a DMA e a NMA, não implicam a sua separação pré-IA, uma vez que não têm efeitos contraceptivos. Consequentemente, evitam-se as lesões provocadas pela remoção do crioprotector.

O uso combinado de glicerol e de crioprotectores que não entram nas células espermáticas – trehalose e metilcelulose– reduz os danos osmóticos que ocorrem durante o processo de congelação. O primeiro parece melhorar a fertilidade pós-congelação/descongelação e o último, apesar de não afectar a fertilidade pós-descongelação, reduz o efeito contraceptivo do glicerol sobre os SPZ não congelados.

A gema de ovo de galinha tem sido tradicionalmente usada como um aditivo na criopreservação dos SPZ de galo, uma vez que os protege do choque do frio (durante a refrigeração), da congelação e da descongelação. Durante a congelação, ela actua em sinergia com os crioprotectores que entram nas células espermáticas. Contudo, a gema de ovo da galinha reduz a taxa de respiração e a capacidade fertilizadora dos SPZ.

Nas galinhas, os SPZ são armazenados no tracto genital durante alguns dias. Neste sentido, a função do sémen congelado/descongelado deve ser avaliada com base na taxa de fertilidade e no intervalo de tempo em que mantém a sua capacidade fertilizadora. O sémen de galo diluído com NMA e congelado produz taxas de fertilidade muito baixas (< 9,4%) e resulta na redução da duração da sua capacidade fertilizadora, de 14 dias para menos de 6 dias.

O sémen de galo deve ser arrefecido até sensivelmente aos 5°C antes de ser diluído ou de ser equilibrado com a solução crioprotectora. Depois de estabilizar durante 10

minutos, o sêmen diluído pode continuar a ser arrefecido. As curvas de congelação que produzem melhores taxas de fertilidade são de 5, 7 e 10°C/minuto. A descongelação do sêmen diluído de galo deve ser feita mergulhando as doses seminais, depois de as retirar do azoto líquido (-196°C), num banho-maria com álcool a 5°C (temperatura ideal para remover o glicerol). Ele também pode ser descongelado mergulhando-o rapidamente num banho-maria com água a 75°C.

## 7. DOSES SEMINAIS

Cada dose seminal deve ter um volume inferior a 0,1 ml (0,03-0,05 ml) e uma concentração de 80-100 x 10<sup>6</sup> SPZ. Contudo, o número de SPZ por dose seminal deve variar em função da temperatura e do tempo de conservação. Quando o sêmen é conservado a baixas temperaturas, durante 6 horas, cada dose seminal deve conter 125-150 x 10<sup>6</sup> SPZ. A conservação a 2-5°C, durante 24 horas, determina que cada dose seminal deve conter 200-250 x 10<sup>6</sup> SPZ.

A idade do galo afecta a quantidade e a qualidade dos SPZ produzidos e consequentemente a taxa de fertilidade dos ovos. Nos galos com 47 semanas de idade, a qualidade do sêmen e a viabilidade dos SPZ diminuem. No mesmo sentido, a idade da galinha a inseminar deve ser tida em conta no estabelecimento da concentração espermática das doses seminais. Nas galinhas de idade média (32-35 semanas de idade), doses de 25 x 10<sup>6</sup> SPZ resultam em elevadas taxas de fertilidade (≈ 95%). Nas galinhas mais velhas (45-65 semanas de idade), para obter a mesma taxa de fertilidade pode ser necessário utilizar doses seminais com 250-300 x 10<sup>6</sup> SPZ. Alguns autores afirmam que as galinhas mais velhas (49-52 semanas de idade) têm de ser inseminadas com mais SPZ do que as galinhas mais novas (28-31 dias de idade).

O número de SPZ viáveis em cada dose seminal deve ser maior quando se insemina sêmen congelado/descongelado. Vários autores usam doses seminais com 600 x 10<sup>6</sup> SPZ. Outros utilizam doses seminais de 400 x 10<sup>6</sup> SPZ. Outros ainda recomendam o uso de doses seminais com 250-500 x 10<sup>6</sup> SPZ.

A IA deve ser repetida, pelo menos, cada 5-7 dias.

## 8. TÉCNICA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Durante a cópula, o galo deposita normalmente o sêmen pouco profundamente na vagina da galinha. Na IA existem dois métodos para depositar o sêmen no tracto genital das galinhas: inseminação vaginal e inseminação intramagmal. O método mais eficaz passa pela deposição da dose seminal directamente na área vaginal média (2-4 cm), próximo da junção útero-vaginal.

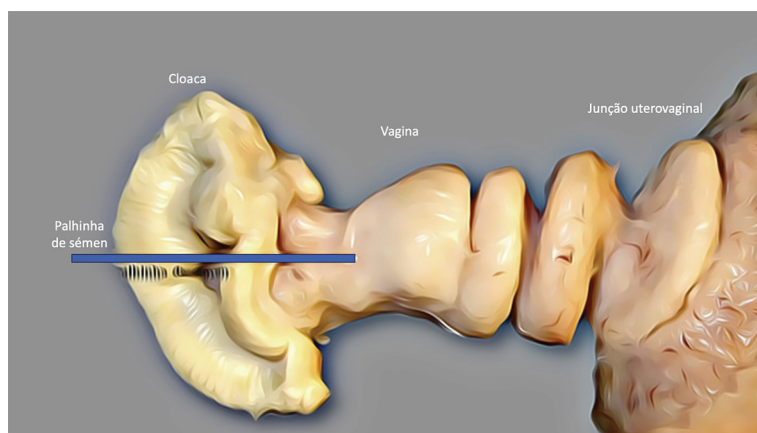
A deposição de sêmen na vagina resulta normalmente em excelentes taxas de fertilidade, dependendo da profundidade a que o sêmen é colocado. Quando colocado próximo da junção útero-vaginal minimizam-se os riscos de expulsão dos SPZ e a erosão da junção útero-vaginal, causadora de futuras situações de subfertilidade ou de esterilidade. De acordo com vários autores, a deposição do sêmen a 3,5 cm de profundidade produz taxas

de fertilidade superiores à da deposição a 0,5 cm. A deposição de sémen a 5-6 cm de profundidade implica a penetração do útero, o que afecta negativamente a saúde da galinha e reduz a taxa de fertilidade.

### 8.1. INSEMINAÇÃO VAGINAL

Para realizar a inseminação vaginal são necessárias duas pessoas. Esta envolve a aplicação suave de pressão sobre a cavidade abdominal e a exteriorização do orifício vaginal através da cloaca. Se a galinha tiver posto um ovo na meia hora anterior à IA, o tecido conjuntivo em volta da vagina e o músculo liso da parede vaginal apresentam-se flácidos. Nesse momento, a exteriorização da vagina pode induzir um prolapso parcial e a realização de uma inseminação profunda, com a consequente falha, a nível vaginal, do processo de selecção espermática. Estas inseminações profundas resultam em elevadas taxas de mortalidade embrionária, possivelmente associadas à polispermia patológica.

A anatomia da vagina (em S) aumenta a resistência à introdução da cânula de inseminação, independentemente de presença ou ausência da massa do ovo no útero (Figura 9.4). O sémen deve ser depositado 2-4 cm depois de ultrapassar o orifício vaginal, associado à libertação da pressão exercida sobre o abdómen da galinha. As doses seminais devem estar em palhinhas esterilizadas, seringas ou tubos de plástico ou de vidro. Nas grandes explorações comerciais são usados pistoletes (Figura 9.5).



**FIGURA 9.4** – Local de deposição do sémen na vagina das aves (Segundo Bakst e Dymond, 2013).

Nas aves, porque os SPZ perdem a sua viabilidade na 1ª hora pós-colheita, as fêmeas devem ser inseminadas rapidamente após a colheita. A galinha é contida dorsalmente contra o corpo do técnico, da mesma forma que é contido o galo. Pressionando firmemente o lado esquerdo causa-se a exteriorização da cloaca e, usando o polegar e o indicativo, expõem-se a vagina. A vagina corresponde à abertura situada no lado esquerdo da cloaca, próxima do ânus. O tubo de inseminação deve ser inserido o mais profundamente possível na vagina e o sémen deve ser libertado ao mesmo tempo que se reduz a pressão exercida sobre o abdómen e sobre a cloaca. A redução desta pressão permite ao sémen penetrar profundamente no tracto genital da galinha.



**FIGURA 9.5** – Dispositivos para inseminação artificial de galinhas.

A IA pode ser feita com recurso a uma pipeta automática de 0,025-0,1 ml. Depois de colocados no interior da galinha, os SPZ têm de ultrapassar várias barreiras antes de alcançarem o infundíbulo e fertilizarem o óócito II. O processo de selecção começa logo na vagina. Apenas os SPZ com elevada motilidade (movimento progressivo, em meio viscoso, a 40°C) atravessam a vagina. Aqui, a selecção dos SPZ depende da composição glicoproteica da sua membrana plasmática. Outras barreiras ao transporte dos SPZ até ao infundíbulo incluem o seu armazenamento e libertação a partir das SST, o seu trânsito ao longo do tracto genital feminino e a sua interacção com o óócito II.

A inseminação das galinhas deve começar por ser feita em dois dias consecutivos e posteriormente uma vez por semana. As melhores taxas de fertilidade surgem 2-3 dias após a primeira deposição do sêmen e mantêm-se elevadas nos 7 dias que medeiam entre as inseminações. Vários autores acreditam que a evolução da IA resultará, brevemente, num aumento do intervalo entre inseminações (10-14 dias) e na utilização de doses seminais menos concentradas.

## **8.2. INSEMINAÇÃO INTRAPERITONEAL**

A inseminação intraperitoneal pode ser feita depositando o sêmen no útero, no magno ou até no ovário. A inseminação no ovário tem-se revelado pouco fiável. É usada uma agulha afiada para perfurar a parede abdominal e introduzir a cânula de inseminação. A inseminação intraperitoneal feita por laparotomia resulta frequentemente na suspensão da postura.

## **8.3. MOMENTO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

O momento do dia ideal para realizar a IA depende do momento da postura. No período da manhã, a maioria das galinhas possui um ovo no oviduto, o que obstrói o transporte dos SPZ no tracto genital da galinha. Este fenómeno não foi observado por vários autores. Contudo, é frequentemente sugerido que a inseminação não seja feita imediatamente após a postura. Esta ocorre normalmente de manhã ou até meio da tarde. Consequentemente, as inseminações realizadas de manhã ou até meio da tarde resultam em baixas taxas de fertilidade sempre que são realizadas nas primeiras 3 horas pós-postura. Alguns autores recomendam que a IA não seja feita nas 5 horas que precedem ou que se seguem

à postura. Quando realiza neste intervalo de tempo, a IA resulta numa redução da taxa de fertilidade tanto no dia da deposição do sêmen como nos dias seguintes. Vários autores afirmam que as inseminações devem ser feitas no período da tarde ou de noite. Efectivamente, a IA das galinhas (independentemente da sua aptidão) realizada no período da tarde resulta em taxas de fertilidade superiores às realizadas no período da manhã. Os efeitos negativos do momento da IA podem ser mascarados pela colocação de um elevado número de SPZ no tracto genital da galinha.

## 9. TAXA DE FERTILIDADE

A taxa de fertilidade reflecte a capacidade reprodutiva de machos e de fêmeas, expressa pela sua aptidão em produzir descendência. Um ovo é dito infértil quando não existe qualquer sinal de desenvolvimento embrionário.

Nas galinhas, a fertilidade pós-IA com sêmen fresco ou refrigerado depende da genética, da estação do ano, da alimentação, da idade do galo, do peso do galo, da idade da galinha, da metodologia de recolha da amostra de sêmen, das características quantitativas e qualitativas do sêmen e do momento da cobrição/inseminações, relativamente à postura e ao ciclo ovário.

Nas galinhas inseminadas repetidamente a taxa de fertilidade diminui significativamente. A diminuição da taxa de fertilidade com a idade da galinha parece estar associada à redução da taxa de libertação dos SPZ a partir das SST e não propriamente da capacidade das SST armazenarem SPZ. Por seu turno, a IA realizada poucas horas antes ou depois da postura resulta em subfertilidade. Assim, por exemplo, as galinhas poedeiras inseminadas de manhã apresentam taxas de fertilidade inferiores às das galinhas poedeiras inseminadas no período da tarde. De acordo com diferentes autores, este fenómeno resulta, pelo menos em parte, das contracções ovidutais associadas à postura, que determinam o refluxo de sêmen a partir da vagina.

A taxa de fertilidade pós-IA com sêmen criopreservado é muito variável. Ela depende muito da fertilidade da genética, do indivíduo, da idade, das características quantitativas e qualitativas do sêmen, do crioprotector utilizado, do protocolo de congelação/descongelação, da dose inseminada, da profundidade a que esta é colocada e da frequência das IA.

## 10. TAXA DE ECLOSÃO

A eclosão corresponde à capacidade do embrião se libertar com sucesso da casca do ovo. Muitos dos factores que influenciam a taxa de fertilidade, influenciam igualmente a taxa de eclosão, incluindo os hormonais, os comportamentais e os de manejo. A taxa de eclosão depende de factores genéticos, da hora do dia em que o ovo foi posto, do tamanho e do peso do ovo, da humidade relativa do ar, do tempo e das condições de armazenamento, do virar dos ovos, da qualidade da casca, entre outros. Adicionalmente, a taxa de eclosão reduz-se com o aumento do intervalo de tempo entre a IA e a fecundação, particularmente na fase final do ciclo produtivo. Ao que tudo indica, esta redução resulta do envelhecimento dos SPZ e conseqüentemente da diminuição da sua capacidade fertilizadora e do aumento da mortalidade embrionária precoce.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbass, W., Jabbar, A., Riaz, A., Akram, M. e Ditta, Y.A., 2017. Effect of plumage color and body weight on the semen quality of naked neck chicken. *Journal of World Poultry Research*, **7** (3), 129-133.
- Adedeji, T.A., Amao, S.R., Popoola, A.D. e Ogundipe, R.I., 2015. Fertility, hatchability and eggs quality traits of Nigerian locally adapted chickens in the derived savanna environment of Nigeria. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, **5** (17), 36-42.
- Adeoye, G.O., Oleforuh-Okoleh, V.U. e Chukwuemeka, U.M., 2017. Influence of breed type and age on spermatological traits of Nigerian local chickens. *Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension*, **16** (1), 11-16.
- Ajayi, F.O., Agaviezor, B.O. e Ajuogu, P.K., 2011. Semen characteristics of three strains of local cocks in the humid tropical environment of Nigeria. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, **3** (3), 125-127.
- Appleby, M.C., Mench, J.A. e Hughes, B.O., 2004. Poultry behaviour and welfare. CABI Publishing, Wallingford, RU, 276 pp..
- Birkhead, T.R. e Pizzari, T., 2009. Sperm competition and fertilization success. In: *Biology of breeding poultry*, P. Hocking (Ed), Poultry Science Symposium Series, volume 29, Carfax Publishing Company, Oxfordshire, RU, 464 pp..
- Bakst, M.R. e Dymond, J.S., 2013. Artificial insemination in poultry. In: *Success in artificial insemination – Quality of semen and diagnostics employed*, A. Lemma (Editor), IntechOpen, <https://www.intechopen.com/books/success-in-artificial-insemination-quality-of-semen-and-diagnostics-employed/artificial-insemination-in-poultry>
- Bakst, M.R., 1993. Future developments in artificial insemination technology. *Journal of Applied Poultry Research*, **2**, 373-377.
- Blanco, J.M., Wildt, D.E., Höfle, U., Voelker, W., e Donoghue, A.M., 2009. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, **71** (1), 200-213.
- Blesbois, E., 2012. Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. *Japan Poultry Science*, **49**, 141-149.
- Bootwalla, S.M. e Froman, D.P., 1988. Effect of extender viscosity on the insemination dose for chickens. *Poultry Science*, **67**, 1218-1221.
- Brillard, J.P., 1992. Factors affecting oviductal sperm storage in domestic fowl following artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, **27** (2-3), 247-256.
- Brillard, J.P., 1993. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poultry Science*, **72**, 923-928.
- Brillard, J.P., 2009. Practical aspects of fertility in poultry. *Avian Biology Research*, **2**, 41-45.
- Brillard, J.P., e McDaniel, G.R., 1986. Influence of spermatozoa numbers and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens. *Poultry Science*, **65**, 2330-2334.
- Chen, C.-F., Shiue, Y.L., Yen, C.-J., Tang, P.-C., Chang, H.-C. e Lee, Y.-P., 2007. Laying traits and underlying transcripts, expressed in the hypothalamus and pituitary gland, that were associated with egg production variability in chickens. *Theriogenology*, **68** (9), 1305-1315.
- Cole, H.H. e Cupps, P.T., 1977. Reproduction in domestic animals. 3ª Edição, Academic Press, Inc., Nova Iorque, EUA, 665 pp..
- Dhama, I.K., Singh, R.P., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Wani, M.Y. e Mohan, J., 2014. Artificial insemination in poultry and possible transmission of infectious pathogens: A review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, **9** (4), 211-228.
- Donoghue, A.M. e Wishart, G.J., 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, **62**, 213-232.
- Getachew, T., 2016. A review article of artificial insemination in poultry. *World's Veterinary Journal*, **6** (1), 26-35.
- Giesen, A.F., McDaniel, G.R. e Sexton, T.J., 1980. Effect of time of day of artificial insemination and oviposition-insemination interval on the fertility of broiler breeder hens. *Poultry Science*, **59**, 2544-2549.
- Hafez, B. e Hafez, E.S.E., 2000. Reproduction in farm animals. 7ª Edição, Lippincott Williams and Wilkins, Nova Iorque, EUA, 509 pp..
- Harvey, S., Scanes, C.G. e Phillips, J.G., 1987. Avian reproduction. In: *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology*, I. Chester-Jones, I., P.M. Ingleton e J.G. Phillips (Eds), Springer, Londres, RU, 125-185.
- Hemmings, N., Birkhead, T.R., Brillard, J.P., Froment, P. e Briere, S., 2015. Timing associated with oviductal sperm storage and release after artificial insemination in domestic hens. *Theriogenology*, **83** (7), 1174-1178.
- Johnson, P., 2017. Reprodução das aves domésticas. In: *Dukes fisiologia dos animais domésticos*. W.O. Reece, H.H. Erickson, J.P. Goff e E.E. Uemura (Eds), 13ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 740 pp..
- Kamal, G.A.R., 1958. The collection of cock's semen without milking the copulatory organ. *Poultry Science*, **37** (6), 1382-1385.
- Kono, K. e Hiura, Y., 1983. Semen collection by rectal electroejaculation of the domestic fowl. *Japanese Poultry Science*, **20**, 267-270.
- Lake, P.E. e Ravie, O., 1979. Effect on fertility of storing fowl semen for 24 h at 5°C in fluids of diferente pH. *Journal of Reproduction and Fertility*, **57**, 149-155.
- Lavor, C.T.D. de e Câmara, S.R., 2012. Biotecnologia do sêmen e inseminação artificial em aves. *Ciência Animal*, **22** (1), 66-81.
- Leeson, S. e Summers, J.D., 2009. Broiler breeder production. Nottingham University Press, Nottingham, RU, 334 pp..
- Leite, M.A.S. e Leal, A.T.M.V., 2012. Coleta de sêmen e inseminação artificial em galinhas. *Boletim Técnico*, nº 71, Universidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 19 pp..

- Long, J.A., Bongalhardo, D.C., Pelaez, J., Saxena, S., Settar, P., O'Sullivan, N.P. e Fulton, J.E., 2010. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science*, **89**, 966-973.
- Løvlie, H., 2007. Pre- and post-copulatory sexual selection in the fowl, *Gallus gallus*. Stockholm University, Estocolmo, Suécia, 41 pp.. (Tese de doutoramento)
- Mahanta, J.D., 2020. Artificial insemination in poultry. In: Avian (poultry) production, D. Sapkota, D. Narahari e J.D. Mahanta (Eds), 2ª Edição, New India Publishing Agency, Nova Deli, Índia, 361 pp..
- Mohan, J., Sharma, S.K., Kolluri, G. e Dahma, K., 2018. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. *World's Poultry Science Journal*, **74**, 475-488.
- Moultrie, F., 1956. A new technique for the artificial insemination of caged hens. *Poultry Science*, **35** (6), 1230-1234.
- Parker, J.E., 1945. Relation of time of day of artificial insemination to fertility and hatchability of hens' eggs. *Poultry Science*, **24** (4), 314-317.
- Partyka, A., Lukaszewicz, E. e Nizanski, W., 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, **77** (8), 1497-1504.
- Peláez, J., Bongalhardo, D.C. e Long, J.A., 2011. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: III. Semen cryopreservation methods alter the carbohydrate component of rooster sperm membrane glycoconjugates. *Poultry Science*, **90** (2), 435-443.
- Pérez-Marín, C.C., Arando, A., Mora, C. e Cabello, A., 2019. Fertility after insemination with frozen-thawed sperm using N-methylacetamide extender on the Combatiente Español avian breed. *Animal Reproduction*, **208**, 106-111.
- Pizzari, T. e Birkhead, T.R., 2001. For whom does the hen cackle? The function of postoviposition cackling. *Animal Behaviour*, **61**, 601-607.
- Purdy, P.H., Song, Y., Silversides, F.G. e Blackburn, H.D., 2009. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science*, **88** (19), 2184-2191.
- Reinhart, B.S. e Fiser, P.S., 1983. Evaluation of artificial insemination techniques on fertility in laying hens. *Poultry Science*, **62**, 2285-2287.
- Rufino, J.P.F., Cruz, F.G.G., Filho, P.A.O., Farias, T.M. e Melo, L.D., 2018. Biotecnologias aplicadas à reprodução de aves. Livro digital, Manaus, Amazônia, Brasil, 123 pp..
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M.A., López-Sebastián, A., Prieto M.T. e Campo, J.L., 2012. Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Criobiology*, **65** (3), 230-234.
- Sauveur, B., 1988. Reproduction des volailles et production d'oeufs. Hors Collection, INRA, Paris, França, 476 pp..
- Scanes, C.G., Butler, L.D. e Kidd, M.T., 2020. Reproductive management of poultry. In: Animal agriculture. Sustainability, challenges and innovations, F.W. Bazer, G.C. Lamb e G. Wu (Eds), Elsevier Inc., Amesterdão, Holanda, 516 pp..
- Van Wambeke F., 1967. The storage of fowl spermatozoa. 1. Preliminary results with new diluents. *Journal of Reproduction and Fertility*, **13**, 571-575.
- Wishart, G.J., 2009. Semen quality and semen storage. In: Biology of breeding poultry, P. Hocking (Ed), Poultry Science Symposium Series, volume 29, Carfax Publishing Company, Oxfordshire, RU, 464 pp..





**Ianda  
Guiné!**  
Galinhas



Um Programa da União Europeia  
Ação implementada por Mani  
Tese, Asas de Socorro, IMVF  
e UNITO