

MAYRA HESPANHOL FREDIANI

**Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em  
diversas ordens de aves**

São Paulo

2016

MAYRA HESPANHOL FREDIANI

**Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em diversas ordens de aves**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3432  
FMVZ

Frediani, Mayra Hespanhol  
Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em diversas ordens de aves / Mayra Hespanhol Frediani. -- 2016.  
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira.

1. Reprodução. 2. Biotecnologia. 3. Aves selvagens. 4. Espermatozoides. 5. Sazonalidade. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROESTIMULAÇÃO PARA COLETA DE SÊMEN EM DIFERENTES ORDENS DE AVES", protocolada sob o CEUA nº 1521100315, sob a responsabilidade de **Ricardo José Garcia Pereira e equipe; Mayra Hespanhol Frediani; Prof. Dr. Rodrigo Del Rio do Valle** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/06/2015.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ELECTRO-STIMULATION METHOD FOR SEMEN COLLECTION IN DIFFERENT BIRD ORDERS.", utilizing 47 Birds (47 males), protocol number CEUA 1521100315, under the responsibility of **Ricardo José Garcia Pereira and team; Mayra Hespanhol Frediani; Prof. Dr. Rodrigo Del Rio do Valle** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/17/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2015** a **01/2017**

Área: **Reprodução de Aves**

Origem:

Espécie: **Aves**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **47**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: A criação de aves em cativeiro pode ser uma ferramenta importante de auxílio à conservação de espécies, sobretudo àquelas que se encontram sob o status de vulneráveis ou criticamente ameaçadas de extinção. No entanto, a reprodução natural em cativeiro nem sempre é viável, e os animais que se encontram pareados muitas vezes não oferecem descendentes geneticamente interessantes para a manutenção da espécie a longo prazo. Na tentativa de contornar tais problemas, biotecnologias como a colheita de sêmen, inseminação artificial e criopreservação de gametas podem ser ferramentas interessantes no manejo genético de populações ex situ e in situ. Nesse sentido, a padronização de uma técnica de colheita de sêmen, bem como o conhecimento sobre parâmetros seminais das diferentes espécies são de extremo valor para programas de reprodução assistida. Por se tratar de espécies silvestres, a colheita por eletroestimulação encaixa-se bem às necessidades devido ao fato de não exigir treinamento prévio dos animais e ser de rápida execução. Assim, o intuito deste trabalho é determinar a eficiência de um protocolo de eletroestimulação em diversas ordens de aves, registrando parâmetros seminais em algumas espécies (e suas oscilações sazonais), para que essas informações possam ser utilizadas como referências em estudos futuros. Acreditamos que os resultados dessa pesquisa servirão como base não apenas para o estabelecimento de programas de inseminação artificial como também para a formação de bancos de germoplasma para espécies raras ou ameaçadas no Brasil.

Local do experimento:

São Paulo, 05 de dezembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FREDIANI, Mayra Hespanhol

Título: Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em diversas ordens de aves

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

*Aos animais.*

## AGRADECIMENTOS

Sou grata aos meus pais, Marta e Marcos que de muitas maneiras me trouxeram até aqui. Obrigada por todos os cuidados do meu pai, todos os agrados (principalmente os comestíveis) de minha mãe. Apesar de ficarem me perguntando quando vou parar de estudar e começar a trabalhar de verdade, sempre me apoiam e me amam. Espero que eles entendam a importância da pesquisa, e que algum orgulho eu traga.

Ao meu irmão Kinho, um obrigada e um pode contar comigo.

À minha nonna Clara, que de longe me faz acreditar em mim.

À minha avó Maria, pela torcida.

Agradeço ao meu orientador, pelas responsabilidades e confiança depositadas. Por me ajudar a corrigir os erros, por se preocupar com que sempre façamos o melhor trabalho possível e tentar nos preparar pra todas as situações. Pela sua dedicação, visão científica e aplicada. Pela paciência, as broncas, o companheirismo. O dia que eu cortar meus dreads, um já tem dono!

Ao prof Marcelo Guimarães, agradeço imensamente a oportunidade de tê-lo conhecido, e toda a inspiração. À Cristiane S. Pizzutto, a quem admiro e por quem torço muito.

Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP e ao laboratório do Grupo de Estudos de Multiplicação de Aves pela estrutura e suporte. À CAPES, pelo apoio financeiro. A secretária Harumi, agradeço pelo trabalho exemplar, por toda paciência e esclarecimentos.

Obrigada à Fundação Parque Zoológico de São Paulo pela parceria fundamental para a realização do projeto. Aos diretores João Batista da Cruz e Paulo Bressan, aos chefes de departamento Fernanda Guida e Patrícia Ramos e consultor prof. Dr. Rodrigo do Valle por entenderem a importância deste estudo. À Paula Salgado e Débora Gonçalves pelo apoio constante e amizade. Aos PAPs, estagiários e tratadores pela organização, eficiência e ajuda direta neste projeto. Meu respeito à todos os animais que participaram e meu desejo de auxiliar na conservação das espécies.

Aos membros do GEMA (Jéssica Ribeiro, Bruno Rui, Marcel Blank, Allison Kawaoku, Daniel de Biase, Fábio Shibuya, Mirela Vilela), à estagiária Beatriz Augusti, à Kalena Barros pela ajuda durante as colheitas, conversas na salinha da pós, suporte e risadas.

Ao prof. Marcílio Nichi e à Giulia Kawai que estiveram do meu lado por mais feias e imensas que fossem as minhas planilhas, me ajudaram a organizar as ideias e os dados e não me deixaram enlouquecer (por pouco!!) com a estatística.

À Elza Faquim, pelo favor gigantesco que me fez e normalização dessa dissertação.

Agradeço aos meus amigos. Os de sempre, os recentes. Aos shows do Flicts com Thiago, Raphael, Shinit, Murilo, que foram mais escassos devido à correria, mas sempre revigorantes. Diego e Eric, também espero ter mais tempo pra vê-los. Falcon, sou muito agradecida por de lá longe, estar tão

perto. Todos os dias, nos áudios, fotos, mil mensagens em forma de afeto. Biz, Bentô, Preps, pra quem eu corro pra sentir que nada mudou. Hand e Pileca e seus hambúrgueres maravilhosos. Matungo, por toda sabedoria e dicas. Gratidão e carinho à Mayara Mollo, por toda cor e alegria que me trouxe, energia e coragem. Pelas maiores notícias direto de Boston, risadas e o melhor pão na chapa. T.A.T.O.D. À Rosemeire Menezes, por toda afeição.

Obrigada ao Futsal Feminino que continuou salvando minha vida. À todas as atletas, treinadores e pessoas que conheci por conta disso. À força e felicidade que só vocês trazem.

Todo amor e gratidão aos meus gatos, cachorros e galinhas. Por vocês eu quero ser cada dia melhor.

*“And in the end, the love you take is equal to the love you make”*

*(Beatles)*

## RESUMO

FREDIANI, M. H. **Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em diversas ordens de aves.** [Evaluation of the electro stimulation technique for semen collection in several bird orders]. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A criação de aves em cativeiro pode ser uma ferramenta importante de auxílio à conservação de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, a reprodução natural em cativeiro nem sempre é viável, e os animais que se encontram pareados muitas vezes não oferecem descendentes geneticamente interessantes para a manutenção da espécie em longo prazo. Na tentativa de contornar tais problemas, biotécnicas como a colheita de sêmen, inseminação artificial e criopreservação de gametas podem ser ferramentas interessantes no manejo genético de populações *ex situ* e *in situ*. Nesse sentido, a padronização de uma técnica de colheita de sêmen, bem como o conhecimento sobre parâmetros seminais das diferentes espécies são de extremo valor para programas de reprodução assistida. Por se tratar de espécies silvestres, a colheita por eletroestimulação encaixa-se bem às necessidades devido ao fato de não exigir treinamento prévio dos animais e ser de rápida execução. Neste trabalho verificamos a importância deste método na colheita de sêmen de animais não condicionados, visto que a pré-estimulação resultou em amostras seminais apenas em Anseriformes, e, já a eletroestimulação, possibilitou a obtenção de sêmen em todas as ordens em que foi testada, em pelo menos uma espécie de cada ordem. Observou-se uma tendência a sazonalidade da produção espermática para a maioria das espécies em que foi possível obter amostras de sêmen, sendo que apenas urubu rei, cisne do pescoço preto e pato coscoroba tiveram amostras em três ou quatro estações do ano. Por fim, oferecemos alguns dados a respeito das características seminais encontradas nessas espécies. Acreditamos que os resultados dessa pesquisa servirão como base não apenas para o estabelecimento de programas de inseminação artificial, como também para a formação de bancos de germoplasma para espécies raras ou ameaçadas no Brasil.

Palavras-chave: Reprodução. Biotecnologia. Aves selvagens. Espermatozoides. Sazonalidade.

## ABSTRACT

FREDIANI, M. H. **Evaluation of the electro stimulation technique for semen collection in several bird orders.** [Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em diversas ordens de aves]. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Breeding birds in captivity can be an important tool to aid conservation of endangered species. However, the natural reproduction in captive is not always viable, and animals that are matched often do not offer genetically interesting offspring to maintain the species in the long term. In the attempt to overcome these problems, biotechniques such as semen collection, artificial insemination and gamete cryopreservation can be interesting tools for the genetic maintenance of *ex situ* and *in situ* populations. In this regard, the standardization of a semen collection technique and the knowledge of seminal parameters for different species are extremely valuable for assisted reproduction programs. Since those are wild species, semen collection by electro stimulation fits well into the needs due to the fact that it does not require prior training of animals and the execution is fast. In this work we verified the importance of this method in the collection of semen from unconditioned animals, since pre-stimulation resulted in seminal samples only in Anseriformes, and the electrical stimulation enables obtaining semen of all orders that were tested in at least one species of each order. Seasonality of sperm production was observed for most of the species from which it was possible to obtain semen samples. Only vulture king, black neck swan and coscoroba duck had samples at three or four seasons of the year. Finally, we offer some data about the seminal characteristics found in these species. We believe that the results of this research will serve as a basis not only for the establishment of artificial insemination programs, but also for the formation of germplasm banks for rare or endangered species in Brazil..

Keywords: Reproduction. Biotechnology. Wild birds. Spermatozoa. Seasonality.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colheitas de sêmen por eletroestimulação nos grupos G1 e G2 ao longo do período de um ano .....	23
Figura 2 - Metodologia para colheita de sêmen por eletroestimulação .....	27
Figura 3 - Protocolo de eletroestimulação utilizado, em todas as aves do experimento, a cada tentativa de colheita de sêmen ao longo do período de um ano .....	29
Figura 4 - Número de indivíduos que apresentaram prováveis reações de dor ou desconforto a partir da tensão (V) aplicada em diante .....	48
Figura 5 - Número de amostras de sêmen obtidas de cada espécie em cada estação do ano.....	49
Figura 6 - Características relacionadas ao desenvolvimento da cloaca e do falo (para animais que possuem falo) foram registradas durante todas as tentativas de colheita de sêmen.....	54

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Histórico da eletroestimulação como método de colheita de sêmen em aves.....	21
Quadro 2 - Grupo experimental em que foi testada a técnica de colheita de sêmen por eletroestimulação ao longo de um ano.....	25
Quadro 3 - Escalas de cor, opacidade e viscosidade utilizada para caracterizar as amostras colhidas.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Eficiência da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen dentro das espécies testadas durante o período de um ano .....	33
Tabela 2 -	Eficiência da Manipulação Pré-Estimulação, Eletroestimulação Série 1 e Série 2 na % de amostras obtidas e % de amostras obtidas com sêmen em todas as espécies testadas durante o período de um ano .....	35
Tabela 3 -	Eficiência da colheita Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 na obtenção de amostras e na obtenção de amostras com espermatozoides para as espécies em que foi possível colher ao menos uma amostra de sêmen ao longo de um ano.....	36
Tabela 4 -	Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Anseriformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados: Média±Erro Padrão .....	37
Tabela 5 -	Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Psitaciformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados: Média±Erro Padrão .....	38
Tabela 6 -	Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Piciformes e Galiformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados: Média±Erro Padrão.....	39
Tabela 7 -	Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Accipitriformes, Strigiformes e Cathartiformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados são Média±Erro Padrão.....	40
Tabela 8 -	Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Anseriformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides .....	41

Tabela 9 -	Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Psitaciformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides .....	42
Tabela 10 -	Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Piciformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides .....	43
Tabela 11 -	Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Galiformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides .....	44
Tabela 12 -	Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Accipitriformes, Strigiformes e Cathartiformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides.....	45
Tabela 13 -	Porcentagem de amostras (com ou sem espermatozoides) contaminadas colhidas nas Série 1 e na Série 2 de todas as espécies testadas durante o período de um ano.....	46
Tabela 14 -	Registro das prováveis reações de dor ou desconforto dentro de cada espécie, a cada tentativa das colheitas que foram realizadas ao longo do período de um ano.....	47
Tabela 15 -	Valores de Média $\pm$ erro padrão e intervalo (em parênteses) das características espermática das espécies em que amostras de sêmen com espermatozoides foram obtidas em uma única estação do ano.....	51
Tabela 16 -	Valores de Média $\pm$ Erro Padrão das características espermática das espécies em que foi possível obter amostras de sêmen em duas estações do ano (Wilcoxon Test) .....	52
Tabela 17 -	Valores de Média $\pm$ Erro Padrão das características espermática das espécies em que foi possível obter amostras de sêmen em três ou quatro	

	estações do ano (LSD Test). Resultados apresentados através da Média $\pm$ Erro Padrão).....	53
Tabela 18 -	Médias $\pm$ Erro padrão das medidas de área das cloacas de todas as espécies testadas nas quatro estações do ano.....	56
Tabela 19 -	Média e erro padrão da coloração de cloaca de todas as espécies testadas, com exceção das espécies que apresentavam cloaca pigmentada, ao longo das quatro estações do ano, dentro de uma escala de cor progressiva (em que 1: pálido, 2: alaranjado, 3: rosa claro, 4: rosa, 5: rosa escuro e 6: hiperêmica) .....	58
Tabela 20 -	Investigação do efeito do falo pouco desenvolvido e bem desenvolvido sob características de qualidade seminal. Apenas para as espécies que possuem falo e das quais foi possível obter amostras de sêmen (cisne de pescoço preto, pato coscoroba e jacutinga).....	59
Tabela 21 -	Características macroscópicas (cor, opacidade e viscosidade) das amostras de sêmen nas espécies G1 em que foi possível obtê-las.....	60
Tabela 22 -	Características macroscópicas (cor, opacidade e viscosidade) das amostras de sêmen nas espécies G2 em que foi possível obtê-las.....	61
Tabela 23 -	Intervalos de valores de pH e volume e médias de volumes das amostras de sêmen obtidas através de eletroestimulação* em cada espécie.....	62
Tabela 24 -	Médias e intervalo entre os valores mínimos e máximos de concentração de espermatozoides (sptz/ml) das amostras seminais obtidas por eletroestimulação* ao longo de um ano.....	63

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1	Delineamento experimental .....	23
4.2	Animais .....	24
4.3	Colheita de sêmen .....	26
4.4	Avaliação do sêmen .....	29
4.5	Análise Estatística .....	31
5	<b>RESULTADOS</b> .....	32
5.1	Eficiência da eletroestimulação na colheita de sêmen nas ordens testadas .....	32
5.2	A pré-estimulação na obtenção de sêmen .....	34
5.3	Sazonalidade da produção espermática.....	48
5.4	Características de falo e cloaca em relação a qualidade de sêmen .....	54
5.5	Características macro e microscópicas do sêmen .....	59
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
	<b>ANEXO</b> .....	72

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Há algumas décadas é possível observar que as populações de aves estão em franco declínio na natureza, sendo que as espécies sob status de vulneráveis ou criticamente ameaçadas de extinção no Brasil representam mais de 12% das aves globalmente em risco (BIRD LIFE INTERNATIONAL, 2014). Visando à conservação destas espécies, programas de reprodução *ex situ* podem ser elaborados para aves cativas mantidas em zoológicos, criadouros, fundações de conservação, entre outras instituições (SAINT JALME, 2002). Contudo, o sucesso destes programas esbarra em grandes desafios, como a falta de informação sobre os comportamentos reprodutivos das espécies, a incompatibilidade de casais, escassez de manejo reprodutivo, inexistência de dados sobre ciclicidade reprodutiva, baixa variabilidade genética dentro da população e problemas de infertilidade dos indivíduos (CAPARROZ et al., 2001; SILVEIRA et al., 2008; LIERZ et al., 2013; FISCHER et al., 2014). Essas situações podem fazer com que a reprodução natural de animais em cativeiro tenha resultados muito ruins ou insuficientes para a sustentabilidade de um programa de conservação, exigindo assim o uso de biotécnicas (BLANCO et al., 2009; FISCHER et al., 2014).

Atualmente, a biotécnica com maior aplicabilidade no manejo reprodutivo de aves cativas é a inseminação artificial (IA), dada sua praticidade, rapidez e baixo custo de implementação (SAMOUR et al., 2004). Contudo, o sucesso da IA depende sobremaneira da qualidade do sêmen a ser empregado e, por conseguinte, diversas técnicas têm sido adaptadas para aves silvestres na tentativa de obter amostras inseminantes de boa qualidade, entre elas: massagem dorso-abdominal, manequins (objetos ou pessoas), cloaca artificial, lavagem cloacal, dissecação de túbulos seminíferos e eletroejaculação (BURROWS; QUINN, 1937; HUMPHREYS, 1972; GEE; TEMPLE, 1978; QUAY, 1984; SAINT JALME et al., 1994; MALECKI et al., 1994; PIZZARI; BIRKHEAD, 2000; SAMOUR, 2004; RYBNIK et al., 2007; CHELMONSKA et al., 2008).

Cada método de colheita de sêmen tem em sua execução e resultados vantagens e desvantagens, sendo que sua aplicabilidade pode ser excelente ou quase nula, dependendo da espécie e do contexto no qual é empregado (CHELMONSKA et al., 2008). A massagem dorso-abdominal (BURROWS; QUINN, 1937) é sem dúvida o mais utilizado em aves domésticas, uma vez que as mesmas podem ser facilmente condicionadas ao treinamento para esse fim. Porém, para muitos indivíduos de espécies selvagens este procedimento é

inviabilizado por necessitar animais intensamente manejados ou criados desde filhotes para esse propósito, demandar grande tempo de treinamento e mão de obra qualificada para manutenção do condicionamento dos reprodutores (SAMOUR et al., 1985; SAINT JALME et al., 1994). Quando se faz possível obter amostras de sêmen por massagem dorso abdominal nessas espécies, estas geralmente vêm muito contaminadas por fezes e urina, devido ao estresse da contenção física e manipulação excessiva (CHELMONSKA et al., 2008). A colheita por eletroestimulação também resulta em amostras contaminadas, no entanto, uma das principais vantagens que faz dessa técnica uma importante ferramenta para obtenção de sêmen em aves silvestres é que, além de ser um procedimento rápido, não exige condicionamento prévio dos machos (SAMOUR et al., 1985).

O uso da eletroestimulação para colheita de sêmen em aves foi primeiramente relatado por Serebrovskii e Sokolovskaja em 1934<sup>1</sup>(apud SAMOUR et al., 1985), e desde então, até 1985 há menos de 10 trabalhos científicos registrados em literatura a respeito desta técnica (SAMOUR et al., 1985). Em virtude do alto grau de contaminação do sêmen por fezes e urina, baixa concentração espermática e dificuldades na padronização, essa metodologia foi ignorada por quase 30 anos, quando Lierz et al. (2013) avaliaram o emprego da eletroestimulação em 151 espécies de psitacídeos(SAMOUR et al., 1985; LIERZ et al., 2013; FISCHER et al., 2014). Este estudo e o publicado por Fischer et al. (2014) demonstraram a aplicabilidade desta técnica para espécies em risco de extinção, que necessitam de medidas urgentes para a instauração de programas de IA.

Tais achados inspiraram nossa equipe a investigar o uso da eletroestimulação em várias ordens, a fim de verificar sua eficiência em uma diversidade de famílias e espécies de aves, além de (se bem sucedida) propiciar dados inéditos relativos aos parâmetros seminais de grupos jamais estudados para tal (p.e. ranfastídeos, cracídeos, cathartídeos, entre outros). Em conjunto, as informações geradas aqui serão cruciais para o conhecimento da sazonalidade reprodutiva de várias espécies, a aplicação da IA e desenvolvimento de bancos de germoplasma.

---

<sup>1</sup> SEREBROVSKII, A. S.; SOKLOVSKAJA, I. I. Electroejakuljacija u Ptíc. **Problemy Zivotnovodsiva** , v. 5, p. 57-59,1934.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro relato registrado em literatura a respeito do uso da eletroestimulação com a finalidade de obtenção de sêmen data de 1922 (BATELLI, 1922<sup>2</sup> apud BETZEN p. 6), no qual, levando em consideração a ereção e ejaculação em condenados à cadeira elétrica no momento da execução, pesquisadores franceses obtiveram amostras seminais de porquinhos da índia através de estimulação elétrica aplicada à cabeça destes animais. No entanto, inúmeros problemas eram associados à técnica da maneira como era conduzida, desde alta contaminação por fezes e urina até convulsões e morte do animal por eletrocussão (MOORE;; GALLAGER, 1930; SNYDER, 1966<sup>3</sup> apud BEZTEN, 1985, p. 6). Desde então, buscou-se aprimorar a metodologia visando à estimulação de nervos mais diretamente relacionados às funções sexuais, sendo Gunn (1936<sup>4</sup> apud QUAMAR et al.,2015) o primeiro a desenvolver um eletrodo retal e utilizá-lo em diversas espécies. A partir daí a técnica foi refinada e padronizada de acordo com as classes de animais e utilizada ampla e eficientemente em mamíferos (BETZEN, 1985).

Em espécies domésticas de aves a eletroestimulação muitas vezes cedeu lugar à colheita de sêmen por massagem dorso abdominal, visto que este é um método eficaz e prático de obter boas amostras em animais passíveis de condicionamento prévio e tolerantes a tal manejo (BURROWS; QUINN, 1937). Os mesmos pesquisadores que desenvolveram o método de colheita por massagem, antes tentaram utilizar a eletroestimulação em galos. Entretanto abandonaram esta abordagem por não considerarem os resultados satisfatórios, principalmente porque o estímulo elétrico utilizado levou muitos animais a óbito (BURROWS; QUINN, 1935). Paralelamente, pesquisadores russos utilizaram a eletroestimulação em gansos domésticos e, apesar da alta voltagem utilizada (80 V), reportaram sucesso (SEREBROVSKII; SOKLOVSKAJA, 1934<sup>5</sup> apud SAMOUR et al., 1985, p. 265). Watanabe (1957) relatou a obtenção de sêmen de excelente qualidade em marrecos, reduzindo a voltagem para 30 V (60 a 80 mA) e modificando o local de aplicação da corrente

<sup>2</sup> BATELLI, F. Une methode pour obtenir l'emission complete du liquide des vesicules semifinales chez le cobaye. **Compte Rendues Seances de la Societe de Physique et d'Histoire Naturelle de Geneve**, v. 39, p. 73,1922.

<sup>3</sup> SNYDER, R. L. Collection of mouse semen by electroejaculation. **Anatomical Record**, v. 155, p. 11-14,1966.

<sup>4</sup> GUNN, R. M.C. 1936. Fertility in Sheep. Artificial Production of Seminal Ejaculation and the Characters of the Spermatozoa Contained Therein. **Commonwealth of Australia Council for Scientific and Industrial Research, Bulletin**. n. 94, 1936.

<sup>5</sup> SEREBROVSKII, A. S.; SOKLOVSKAJA, I. I. ElectroJaKulJaciJa u Ptic. **Problemy Zhivotnovodsiva** , v. 5, p. 57-59,1934.

elétrica. Até então um polo era posicionado sobre a região sacral da ave e o outro polo era imerso em água, próximo ao bico do animal também submerso. Watanabe manteve o polo sobre a região sacral, porém inseriu o outro polo na cloaca da ave. Os primeiros a utilizarem apenas uma sonda intracloacal foram Csuka et al. (1978<sup>6</sup> apud SAMOUR et al., 1985, p. ) em marrecos de Pequim e patos de Muscovy. Dois anos depois, Chelmonska e Geborska-Dymkowska (1980<sup>7</sup>, apud BETZEN, 1985, p. 10) também colheram sêmen dito de boa qualidade em pato almiscarado, utilizando um eletrodo intracloacal bipolar. Esses dois últimos grupos de pesquisadores relataram ereção variável dos falos das aves (BETZEN, 1985).

Data de 1983 a primeira descrição de obtenção de sêmen de psitacídeos, associando massagem e eletroestimulação (HARRISON; WASMUND, 1983<sup>8</sup> apud BETZEN, 1985, p. 10). As voltagens utilizadas variaram de 4 a 17 V, conforme o tamanho da espécie de psitacídeo, aplicadas através de um eletrodo cloacal bipolar ou de polo simples associado a uma placa metálica na região sacral. O primeiro estudo consistente utilizando anestesia previamente à eletroestimulação foi realizado em 1985 por Samour et al. Duas abordagens foram testadas, sendo que a segunda levou a um relaxamento muscular mais adequado ao procedimento: cloridrato de cetamina 20 a 30 mg/kg utilizado sozinho ou associado em dose de 25 mg/kg a cloridrato de xilazina 5mg/kg, ambos aplicados por via intramuscular. Samour obteve e avaliou amostras seminais de patos de Muscovy, marrecos Mallard e gansos do Havai, utilizando também um eletrodo retal e pulsos iniciando em 5 V e aumentando gradativamente (de 5 em 5 V) até chegar em 30 V. Os volumes médios de sêmen variaram de 0,15 a 0,3 ml, e as concentrações de 6,5 a 7,5.10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>. Após este trabalho, houve um hiato de cerca de 30 anos nos relatos a respeito do uso da eletroestimulação em aves, quando a técnica foi então retomada por pesquisadores alemães em 2012 (LIERZ et al., 2013), com utilização de eletrodo cloacal bipolar e sem sedação ou anestesia dos indivíduos, apenas contenção física. O emprego da técnica foi avaliado, apenas durante a estação reprodutiva, em 243 animais pertencentes a 151 espécies de psitacídeos, divididos em dois grupos: animais pareados, sexualmente ativos e com histórico de prole; animais não pareados, sem atividade

<sup>6</sup>CSUKA, J.; STASKO, J.; SPRONC, A. Comparing two methods of sêmen collection from ganders. **Vedecké Práce Hydinarstvo**, v. 16, p. 99, 1978.

<sup>7</sup>CHELMONSKA, B. GEBORSKA-DY KOWSKA, B. **The appraisal of the musk drakes semen obtained by the electroejaculation method**. *Medycyna Weterynaryjna*. v.36, p. 414-417, 1980.

<sup>8</sup>HARRISON, G. J.; WASMUND, D. Preliminary Studies of Electrostimulation to Facilitate Manual Semen Collection in Psittacines. In: ANNUAL CONFERENCE ASSOCIATION OF AVIAN VETERINARIANS, 1983, San Diego, CA. **Proceedings**. 1983. p. 207-213 .

sexual observada e com histórico de problemas reprodutivos. No primeiro grupo, o sucesso do método foi de cerca de 93%, enquanto no segundo grupo, não passou de 60%, indicando a importância do status reprodutivo da ave. Após a análise das amostras, foram realizadas 64 inseminações artificiais em 37 fêmeas, porém, apesar da fertilização ter sido confirmada em alguns casos, não se pode afirmar que as proles resultaram de fato da IA e não da cópula natural pois os indivíduos pareados permaneceram juntos (LIERZ et al., 2013). Um ano mais tarde, este mesmo grupo alemão associado a outros pesquisadores realizaram um estudo direcionado especificamente à ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*), utilizando a eletroestimulação, da mesma maneira que a realizada anteriormente, para colheita de sêmen em 17 machos, realizando uma análise mais aprofundada deste material colhido e após, seis IA em três fêmeas, porém, sem sucesso de prole (FISCHER et al., 2014). Por fim, utilizando todos esses dados publicados a respeito desse método de colheita de sêmen em aves, um grupo de El Salvador desenvolveu um protótipo de eletroejaculador para ser utilizado em aves, demonstrando a preocupação em se aprimorar a técnica e ressaltando a importância desta no contexto da conservação de espécies aviárias (BARRIERE et al., 2014).

O detalhamento do histórico da eletroestimulação em aves pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1 - Histórico da eletroestimulação como método de colheita de sêmen em aves

Ano	Pesquisadores	Aves	Forma de aplicação de corrente elétrica	Especificações	Anestesia	Protocolo	Sucesso de colheita	IA
1934	Serebrovskii & Sokolovskaja	Gansos domésticos	Pólo negativo sobre a pele (região sacral) Pólo negativo imerso em água Bico da ave imerso em água	80 V	Não	3-4 segs de estímulo 1-2 segundo de intervalo	Sim	Não
1935	Burrows & Quinn	Gansos domésticos	-	-	Não		Sim, mas muitos óbitos	Não
1957	Watanabe et al.	Marrecos	Um pólo inserido em agulha hipodérmica na região sacral Um pólo intracloacal	30 V 60 a 80 mA	Não	3segs de estímulo 5segs de intervalo 3 a 5 repetições	Sim	Não
1978	Csuka et al.	Marreco de Pequim e pato almiscarados	Sonda intracoacal	25 a 30 V 35 a 40 mA	Não	6segs de estímulo 5segs de intervalo	Sim	Não
1980	Chelmonska & Geborska-Dym Kowska	Pato almiscarado	Sonda bipolar intracloacal	20V 20 a 60mA	-	-3segs de estímulo 5segs de intervalo	-	Não
1983	Harrison & Wasmund	Psitacídeos	Sonda bipolar intracloacal ou Sonda pólo simples + placa metálica na região sacral	4 a 17 V 4 a 19 mA	Não	Eletroestimulação associada a massagem dorso abdominal	Sim	Não
1985	Samour et al.	Pato almiscarado, marreco Mallard e ganso do Havai	Sonda intracloacal com dois eletrodos em anéis	5 a 30 V	Cloridrato de cetamina 20 a 30 mg/kg ou 25 mg/kg a cloridrato de xilazina 5mg/kg	3segs de estímulo 5segs de intervalo 6 séries de 5 a 8 estímulos Aumento de 5 em 5 V	Sim	Não
2013	Lierz et al.	Psitacídeos	Sonda bipolar intracloacal	1 a 14 V	Não	1 a 2 segs de estímulo 2 a 5 segs de intervalo 5 a 10 séries	Sim	Sim
2014	Fischer et al.	Ararinha azul	Sonda bipolar intracloacal	2,4 a 4,8 V	Não	1 a 2 segs de estímulo 1 a 2 segs de intervalo Máximo de 8 séries de 3 estímulos	Sim	Sim

Fonte: Serebrovskii; Sokolovskaja (1934); Burrows; Quinn (1935); Watanabe et al. (1957); Csuka et al. (1978); Chelmonska; Geborska-Dym Kowska (1980); Harrison ; Wasmund (1983); Samour et al. (1985); Lierz et al. (2013); Fischer et al. (2014); adaptação de (FREDIANI, 2016).

-: sem dado

### 3 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivos:

- Verificar a eficiência do uso do eletroestimulador para colheita de sêmen em diversas ordens de aves;
- Aprofundar nosso conhecimento em relação as características seminais das espécies estudadas;
- Pesquisar se há sazonalidade na produção espermática das espécies estudadas.

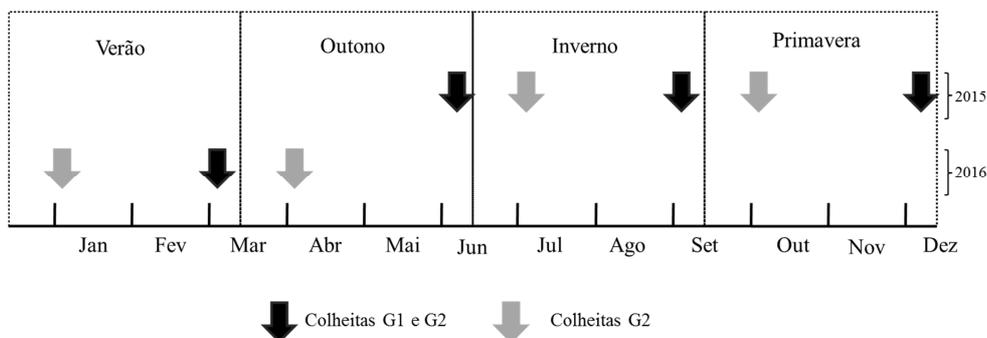
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

O projeto foi realizado ao longo de todo ano para averiguar os possíveis efeitos da sazonalidade sob a produção espermática. Dividimos nosso grupo amostral em dois: Grupo 1 (G1) – espécies de aves que possuem um número de indivíduos ( $n$ ) maior ou igual a 5 a ser coletado; Grupo 2 (G2) – espécies de aves que possuem um  $n$  de indivíduos menor ou igual a 4 a ser coletado. No caso do G1, foi realizada uma colheita de sêmen por indivíduo no início da estação. Já para o grupo G2, as colheitas foram realizadas duas vezes por estação do ano para cada indivíduo: uma no início da estação e outra no final. A primeira colheita ocorreu em julho de 2015 e a última, em abril de 2016, contemplando assim o período de um ano (Figura 1).

Durante o delineamento deste projeto, quatro hipóteses foram propostas. Buscando contemplá-las ao final do estudo, avaliou-se: (1) se este protocolo de eletroestimulação possibilita a colheita de sêmen em todas as ordens testadas; (2) se a manipulação pré-eletroestimulação por si só é suficiente para a obtenção de amostras seminais nas espécies testadas; (3) se as espécies estudadas apresentam padrões sazonais em sua produção espermática; e (4) se características sexuais relacionadas ao desenvolvimento do falo (para espécies que possuem falo) e aparência da cloaca (área e coloração) podem ser usadas para estimar qualidade seminal.

Figura 1 - Colheitas de sêmen por eletroestimulação nos grupos G1 e G2 ao longo do período de um ano



Fonte: (FREDIANI, 2016)

## 4.2 Animais

As aves utilizadas neste estudo são provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, estando então todas sob condições semelhantes de cativeiro e manejo, de acordo com a espécie. Foram realizadas colheitas em 22 espécies de aves de sete ordens. O n escolhido para representar cada espécie foi definido de acordo com a disponibilidade de machos adultos e saudáveis do plantel da instituição, sendo que estas espécies foram agrupadas nos grupos G1 e G2, como já citado, de acordo com o número de indivíduos que as representarão (Quadro 2).

Quadro 2 - Grupo experimental em que foi testada a técnica de colheita de sêmen por eletroestimulação ao longo de um ano

<b>Ordem</b>	<b>Espécie</b> <i>Nome científico</i> Nome popular	<b>N</b>	<b>Idade</b> (anos)	<b>Pareado/ Não Pareado</b>	<b>Grupo</b>
<b>Total</b>	<b>Total</b>	<b>Total</b>			<b>Total</b>
	<i>Cygnus melanocorypha</i> Cisne do pescoço preto	7	*	*	G1
	<i>Coscoroba coscoroba</i> Pato coscoroba	6	*	*	G1
Psitaciformes	<i>Amazona aestiva</i> Papagaio verdadeiro	5	11 a 26	1/4	G1
	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> Arara azul	5	11 a 20	5/0	G1
	<i>Phropyrrhura maracana</i> Maracanã	2	15	2/0	G2
Piciformes	<i>Pteroglossus aracari</i> Araçari de faixa	2	2 e 6	0/2	G2
	<i>Pteroglossus bailloni</i> Araçari banana	1	1,5	1/0	G2
	<i>Selenidera maculirostris</i> Araçari poca	1	7	0/1	G2
	<i>Ramphastos dicolorus</i> Tucano do bico verde	2	9 e 13	1/1	G2
	<i>Ramphastos tucanus tucanus</i> Tucano de peito branco	1	8	0/1	G2
Galiformes	<i>Aburria jacutinga</i> Jacutinga	2	9 e *	1/1	G2
	<i>Crax rubra rubra</i> Mutum-do-México	1	9	1/0	G2
	<i>Notocrax urumutum</i> Urumutum	2	*	2/0	G2
Accipitriformes	<i>Harpia harpyja</i> Gavião real	3	17 a 28	3/0	G2
	<i>Spizaetus tyrannus</i> Gavião pega macaco	4	6 a 29	2/2	G2
Strigiformes	<i>Asio stygius</i> Mocho diabo	2	*	0/2	G2
	<i>Bubo virginianus</i> Jacurutu	1	*	0/1	G2
	<i>Tyto alba</i> Suindara	2	11 e 23	0/2	G2
Cathartiformes	<i>Sarcoramphus papa</i> Urubu rei	2	9 a 33	1/1	G2
7	19	51			2

Fonte: (FREDIANI, 2016)

N: número de indivíduos

\*Há indivíduos sem dados referentes a idade ou pareamento.

### 4.3 Colheita de sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas ao longo de todo ano, para que pudéssemos pesquisar as possíveis influências estacionais sobre os parâmetros seminais e produção espermática. Era realizado jejum alimentar e hídrico prévio ao manejo das tentativas de colheita de sêmen, para evitar regurgitação e também diminuir as chances de contaminação de amostras por fezes e urato. O tempo de jejum variou conforme a espécie e foi supervisionado pela equipe veterinária da FPZSP. Os animais eram capturados de seus recintos imediatamente antes da colheita de sêmen e levados para o local aonde a mesa de eletroestimulação e análises eram montadas (Figura 2A). Procurou-se manter um ambiente silencioso, tranquilo e aclimatado com uso de ar condicionado quando necessário, para diminuir estímulos estressores. Apenas contenção física foi realizada e o animal era mantido, com os olhos cobertos, em decúbito dorsal sobre uma mesa recoberta de toalha ou colcha facilitando a visualização da cloaca (Figura 2B).

Antes de iniciar o procedimento de colheita de sêmen, as penas ao redor da cloaca eram aparadas com uma tesoura, e sujidades eram removidas com o auxílio de gazes e solução fisiológica (Cloreto de Sódio 0,9%), caso se fizesse necessário. Atribuía-se uma cor à porção externa da cloaca, e após posicionar uma escala de cores ao lado, a mesma era fotografada. Medidas dos diâmetros cloacais (Figura 2C) e observações a respeito do estado da cloaca (ressecada, úmida, vasos rompidos etc) e falo (pouco desenvolvido, bem desenvolvido, dificuldade em expor) também foram registradas.

Figura 2 - Metodologia para colheita de sêmen por eletroestimulação



Fonte: (FREDIANI, 2016)

2A: mesa de análises de amostras montada; 2B: exemplo de contenção física em um rapinante; 2C: medição de diâmetros de cloaca após realização da toaleta; 2D: correta inserção da probe do eletroestimulador (voltada para o assoalho dorsal da cloaca); 2E: colheita de sêmen em microcapilar graduado.

Iniciava-se o procedimento com uma massagem dorso abdominal breve com tentativa de colheita de sêmen, apenas para descartar a hipótese de que essa simples manipulação da ave seria suficiente para obter o ejaculado. Caso houvesse material a ser colhido após essa manipulação, a amostra era identificada como Amostra Pré-Estimulação. Para a eletroestimulação foi utilizado um eletroestimulador com controle para voltagem, miliamperagem e duração de estímulo e repouso (Duboi, Brasil), composto por probes plásticas com eletrodos bipolares de quatro tamanhos a serem escolhidas de acordo com o tamanho da cloaca da espécie, variando de 1,5 a 4 cm de comprimento e de 0,3 a 0,6 cm de diâmetro. A probe era umedecida com solução fisiológica e introduzida delicadamente na cloaca da ave, e posicionada de maneira a ter contato contínuo com a porção dorsal da cloaca, visando ao estímulo dos nervos responsáveis pela contração dos ductos deferentes (Figura 2D). Em animais com falo (ou hemipenis), era realizada a exposição e manutenção deste órgão exposto durante a eletroestimulação, antes da introdução da probe, para que os estímulos elétricos atingissem de fato o assoalho dorsal da cloaca e não o corpo do hemipenis.

Duas séries de quatro estímulos eram aplicadas durante o protocolo. Foi utilizada onda quadrática e frequência de 30 Hertz em todas as tentativas de colheita. A tensão (Volts = V) era aumentada gradualmente, a cada estímulo, e cada estímulo era repetido quatro vezes (Figura 3). A primeira série iniciava em 0,6 V e se aumentava 0,6 V a cada estímulo, terminando então a Série 1 com 2,4V. Após esse processo, realizava-se uma leve massagem para ordenhar o sêmen dos ductos deferentes para a cloaca. O material, caso houvesse, era recolhido então com o auxílio de um capilar microhematócrito graduado (Figura 2E). Uma nova série era então iniciada, indo de 1 a 4 V, com aumento de 1 V a cada estímulo. Novamente realizava-se a tentativa de colheita de ejaculado, e então o material recolhido era avaliado, havendo distinção entre as amostras da Pré- Estimulação, Série 1 e Série 2. Caso não se pudesse obter amostras ou não houvesse presença de espermatozoides nas mesmas, a colheita era dada como insucesso.

Figura 3 - Protocolo de eletroestimulação utilizado, em todas as aves do experimento, a cada tentativa de colheita de sêmen ao longo do período de um ano

	Estímulos 1	Estímulos 2	Estímulos 3	Estímulos 4	
Série 1	0,6 V	1,2 V	1,8 V	2,4 V	Tempo de duração do estímulo: 2 s
	0,6 V	1,2 V	1,8 V	2,4 V	
	0,6 V	1,2 V	1,8 V	2,4 V	
	0,6 V	1,2 V	1,8 V	2,4 V	
Tentativa de colheita e análise da amostra				Intervalo entre séries: 2 – 4 min	
	Estímulos 1	Estímulos 2	Estímulos 3	Estímulos 4	
Série 2	1,0 V	2,0 V	3,0 V	4,0 V	Tempo de duração do estímulo: 2 s
	1,0 V	2,0 V	3,0 V	4,0 V	
	1,0 V	2,0 V	3,0 V	4,0 V	
	1,0 V	2,0 V	3,0 V	4,0 V	

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Durante todo o procedimento, os reflexos ao estímulo elétrico na inervação pericloacal, região de retrizes e membros pélvicos (contrações) eram anotadas para que pudéssemos verificar se tais estímulos estavam sendo adequadamente transmitidos a essa região. Da mesma maneira, as reações dos animais aos estímulos elétricos, tais quais agitação e vocalização eram observadas e registradas na ficha de colheita (Anexo A). Com isso buscou-se analisar possíveis desconfortos relacionados às voltagens utilizadas, no intuito de sugerir, ao final do estudo, as menores voltagens necessárias para obter amostras, que causem o menor desconforto possível.

#### 4.4 Avaliação do sêmen

Imediatamente após a colheita, o material ejaculado era avaliado macroscopicamente quanto à cor, volume e aspecto. Diluía-se então em meio Biggers-Whitten-Whittingam (BWW) (BIGGERS et al., 1971) e realizava-se as avaliações microscópicas imediatas (investigação da presença de espermatozoides, motilidade e motilidade progressiva). Além disso, informações referentes à presença ou não de contaminantes (urato, fezes, sangue) e pH eram anotadas na planilha de avaliação seminal.

O volume foi medido pela graduação presente no capilar microhematócrito. Para cor e aspecto da amostra, escalas foram confeccionadas, e como se trata de uma avaliação subjetiva, estas foram realizadas sempre pela mesma pesquisadora. Em aspecto da amostra, avaliou-se a opacidade e a viscosidade. A diluição em BWW variou conforme o volume de amostra obtida, para possibilitar que houvesse alíquotas para realizar todas as análises posteriores, mas foi utilizada preferencialmente uma diluição de 1:30 (uma parte de amostra para 30 partes de BWW). Uma alíquota de 3  $\mu$ l desta diluição era adequadamente homogeneizada, pipetada em uma lâmina, coberta por uma lamínula e analisada ao microscópio de luz, em aumento de 400X. Nesta primeira análise, pesquisava-se a presença de espermatozoides, e caso houvesse, já se avaliava a motilidade e motilidade progressiva. Essas avaliações também eram subjetivas, registradas sempre por uma mesma pessoa treinada para tal, em uma escala de 0 a 100% (visualização de 5 campos por amostra).

Outra alíquota de 5  $\mu$ l da diluição era pipetada em uma lâmina, homogeneizada por 30 segundos com corante Eosina e Nigrosina para realizar um esfregaço. Essas lâminas foram avaliadas em um prazo máximo de 12 horas, para avaliar a integridade de membrana dos espermatozoides. Inicialmente estipulou-se a contagem de 100 células espermáticas. Porém, como obtivemos amostras com concentração muito baixa, na maioria das leituras do esfregaço não foi possível contar esse número de espermatozoides.

Para concentração e morfologia espermática, 20  $\mu$ l de sêmen diluído em BWW era rediluído em 20  $\mu$ l de Formol Salino (FS) para ser fixado e avaliado posteriormente. Desta nova diluição, 20  $\mu$ l eram utilizados para estimar-se a concentração em câmara de Neubauer, 10  $\mu$ l de cada lado, com o uso de microscópio de luz (aumento de 400X). Para a avaliação da morfologia espermática, 8  $\mu$ l desta amostra fixada em FS eram pipetados em uma lâmina, cobertos por lamínula e selados com esmalte, para a confecção de câmeras úmidas. Avaliou-se então a morfologia dos espermatozoides em microscopia de contraste de fase, aumento de 1000 X. Da mesma maneira que ocorreu na avaliação dos esfregaços de Eosina e Nigrosina, havíamos proposto a contagem de 100 células, porém, isso muitas vezes não foi possível devido às concentrações muito baixas de espermatozoides.

#### 4.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo SAS System Windows. Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados, respectivamente, para dados que obedeceram ou não às premissas estatísticas da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. O nível de significância utilizado para rejeitar  $H_0$  será de 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados foram descritos principalmente através da média e erro padrão da média.

## 5 RESULTADOS

Os resultados e a discussão dos mesmos serão apresentados de maneira a contemplar as quatro hipóteses formuladas pelo nosso grupo durante o delineamento da pesquisa.

### 5.1 Eficiência da eletroestimulação na colheita de sêmen nas ordens testadas

Foram realizadas 301 tentativas de colheita de sêmen através de eletroestimulação ao longo do período de um ano. Nas espécies pertencentes ao G1, quatro tentativas por indivíduo foram realizadas, e para as espécies do G2, oito. Durante o projeto, dois animais vieram a óbito por causas outras que não estavam relacionadas às colheitas de sêmen: o único mutum-do-México, em agosto de 2015, e um papagaio verdadeiro, em dezembro de 2015. Além disso, algumas colheitas na ordem dos Anseriformes não puderam ser realizadas, pois os indivíduos precisavam ser capturados em um grande lago, e eventualmente ocorreram fugas. Isso explica o porquê de não haver um número fixo de tentativas de colheitas por espécie.

Das 301 tentativas de colheita, 58 resultaram em amostras contendo espermatozoides, o que daqui em diante serão as únicas amostras que trataremos por “amostras de sêmen” ou “amostras seminais”. Isso indica uma eficiência deste método de colheita de 19%, porém nesta abordagem estamos considerando o período de todo um ano e todas as espécies testadas (Tabela 1). Nota-se que a eficiência não foi a mesma para todas as espécies e que variou também conforme a estação do ano. A melhor eficiência foi alcançada em patos coscoroba (54%). Em urubu rei, suindara e para a maioria das espécies pertencentes à ordem dos Piciformes (araçari banana, araçari poca e tucano do peito branco), atingiu-se índices de eficiência da técnica maiores ou igual a 25%. No entanto, dentro da ordem dos Galiformes observamos baixa eficiência para os indivíduos disponíveis no estudo, sendo nula para o mutum-do-México (muito embora este indivíduo tenha sido submetido a apenas uma colheita, pois já no mês seguinte não foi realizada a tentativa de eletroejaculação, pois ele se encontrava debilitado e logo após, veio a óbito) e para os urumutuns. Não obtivemos nenhuma amostra de sêmen também do único indivíduo representante da espécie jacurutu. A eficiência nas demais espécies foi variável e será detalhada adiante relacionada à qualidade

seminal, porém nesta primeira análise mais superficial podemos notar que a técnica possibilitou a colheita de amostras de sêmen em todas as ordens em que foi testada.

Tabela 1 - Eficiência da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen dentro das espécies testadas durante o período de um ano

<b>Ordem</b>	<b>Espécie (N)</b>	<b>Tentativas de colheita</b>	<b>Colheitas com sptz</b>	<b>Eficiência*</b>
<b>Total</b>	<b>Total</b>	<b>Total</b>	<b>Total</b>	<b>(%)</b>
Anseriformes	Pato coscoroba (6)	24	13	54
	Cisne do pescoço preto (7)	24	3	12,5
Psitaciformes	Papagaio verdadeiro (5)	16	3	19
	Arara azul (5)	20	3	15
	Maracanã (2)	16	4	25
Piciformes	Araçari de faixa (2)	16	3	19
	Araçari banana (1)	8	2	25
	Araçari poca (1)	8	2	25
	Tucano do bico verde (2)	16	2	13
	Tucano de peito branco (1)	8	2	25
Galiformes	Jacutinga (2)	16	1	6
	Mutum-do-México (1)	2	0	0
	Urumutum (2)	15	0	0
Accipitriformes	Gavião real (3)	24	2	8
	Gavião pega macaco (4)	32	7	22
Strigiformes	Mocho diabo (2)	16	2	13
	Jacurutu (1)	8	0	0
	Suindara (2)	16	4	25
Cathartiformes	Urubu rei (2)	16	5	31
<b>7</b>	<b>19</b>	<b>301</b>	<b>58</b>	<b>19</b>

Fonte: (FREDIANI, 2016)

N: número de indivíduos; sptz: espermatozoides.

\*Relativo ao total de colheitas por eletroestimulação (não considerando a influência da sazonalidade reprodutiva)

## 5.2 A pré-estimulação na obtenção de sêmen

Como explicado anteriormente (item Material e Métodos), antes de iniciarmos a tentativa de colheita de sêmen através da eletroestimulação, uma breve manipulação da região dorso abdominal das aves, em direção a cloaca, era realizada. Nas espécies que possuem falo, essa manipulação era um pouco mais intensa, pois havia a necessidade de expor este órgão antes de introduzir a probe para que os estímulos elétricos atingissem a região almejada e não fossem direcionados sobre o falo. Essa manipulação era realizada e, após tal, caso houvesse na cloaca da ave material que pudesse ser sêmen, este era recolhido e analisado, denominado “Amostra Pré-Estimulação”. Desta maneira, pudemos distinguir se as amostras de sêmen obtidas estavam de fato relacionadas ao estímulo elétrico que aplicávamos, ou se uma simples massagem manual seria suficiente para colher sêmen nestes indivíduos, o que poderia reduzir a importância da eletroestimulação como método de colheita. De modo geral, vimos uma baixa eficiência da manipulação Pré-Estimulação na obtenção de amostras em todas as espécies testadas (17%) em relação às séries de estimulação elétrica (Série 1: 60% e Série 2: 66%). Dentre essas amostras, a porcentagem das que apresentaram espermatozoides foi ainda mais desigual entre a manipulação Pré-Estimulação (2%) e as Séries de estímulos 1 e 2 (11% e 12%, respectivamente). Sendo assim, a eficiência real dos métodos de colheita, que é a obtenção de amostras com espermatozoides de fato, foi estatisticamente melhor na eletroestimulação (Tabela 2).

Durante todo o estudo, observamos que em apenas uma tentativa de colheita em um indivíduo de cisne de pescoço preto não obtivemos amostras após os estímulos da Série 1 e Série 2, apesar de havermos obtido amostra Pré-Estimulação. A manipulação Pré-Estimulação proporcionou amostras de sêmen em outras tentativas de colheitas para indivíduos da ordem dos Anseriformes, mas nestes casos também foi possível obter amostras após a Série 1 ou Série 2, ou ambos. Verificamos estatisticamente a eficiência da Pré-Estimulação, da Série 1 e da Série 2, para cada espécie, na obtenção de amostras contendo espermatozoides, ou seja, amostras de sêmen (Tabela 3). Observamos que para a grande maioria das espécies (4 de 6 espécies), a Pré-Estimulação não resultou em amostras contendo espermatozoides. Sendo assim, consideramos que a Pré-Estimulação não é suficiente para obtenção de amostras de sêmen nas espécies testadas, nem mesmo para Anseriformes, visto que para alguns indivíduos dessa ordem foi necessário realizar ao menos uma série de estímulos elétricos para colher

amostras com espermatozoides. Deste modo, vimos a necessidade de compararmos a qualidade seminal entre as amostras, no intuito de pesquisar qual a melhor forma de colheita para cada espécie testada. Avaliamos então a qualidade do sêmen obtido através da Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2, em cada espécie do nosso grupo experimental. As características escolhidas para analisar a qualidade seminal foram: motilidade espermática (%), motilidade espermática progressiva (%), concentração espermática (sptz/ml), total de espermatozoides obtidos na amostra colhida (sptz/amostra) e total de espermatozoides móveis obtidos na amostra colhida (sptz móveis/amostra) (Tabelas 4 a 7). Nas duas únicas espécies em que a Pré-Estimulação resultou em amostra com espermatozoides, Pato Coscoroba e Cisne do Pescoço Preto, a qualidade espermática desta não diferiu das amostras obtidas através da Série 1 e Série 2 em nenhuma das características avaliadas. Para as demais espécies, algumas diferenças estatísticas foram observadas em determinadas características. Para araçari-banana e tucano de bico verde, a amostra obtida através da Série 1 apresentou melhores médias de concentração espermática, total de espermatozoides e total de espermatozoides móveis. No entanto, para o tucano de bico verde só poderíamos esperar este resultado, visto que não obtivemos nem amostra Pré-Estimulação e nem amostra Série 2. Uma situação parecida ocorreu para o gavião real, que teve melhores características de concentração espermática e total de espermatozoides na amostra Série 1, a única em que obteve-se espermatozoides. O mesmo aconteceu com a amostra de jacutinga, nas características motilidade e motilidade progressiva, que foram melhores para a amostra da Série 1, a única amostra obtida, e para mocho diabo, na característica total de espermatozoides que foi melhor na amostra da Série 2. Para as demais espécies, não houve diferença estatística entre as amostras colhidas. Desta maneira, consideramos a Série 1 e a Série 2 igualmente eficazes na obtenção de amostras com sêmen

Tabela 2 - Eficiência da Manipulação Pré-Estimulação, Eletroestimulação Série 1 e Série 2 na % de amostras obtidas e % de amostras obtidas com sêmen em todas as espécies testadas durante o período de um ano

<b>Método de Colheita</b>	<b>% Amostras obtidas</b>	<b>% Amostras com sptz</b>
Manipulação Pré-Eletroestimulação	17,67 <sup>A</sup>	2,00 <sup>A</sup>
Eletroestimulação Série 1	60,42 <sup>B</sup>	11,00 <sup>B</sup>
Eletroestimulação Série 2	66,08 <sup>B</sup>	12,00 <sup>B</sup>

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Letras sobrescritas iguais sinalizam valores de porcentagens médias que não diferiram estatisticamente, e letras sobrescritas diferentes, valores de porcentagens médias que diferiram estatisticamente. Estas comparações foram feitas entre os resultados da Manipulação Pré-Eletroestimulação, Eletroestimulação Série 1 e Eletroestimulação Série 2 ( $p < 0,05$ ; LSD Test).

Tabela 3 - Eficiência da colheita Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 na obtenção de amostras e na obtenção de amostras com espermatozoides para as espécies em que foi possível colher ao menos uma amostra de sêmen ao longo de um ano

Ordem	Espécie (N)	% Amostras obtidas (% Amostras com sptz)		
		Pré	Série 1	Série 2
Anseriformes	Pato coscoroba (6)	89,47 (26,32)	89,47 (31,58)	89,47 (26,31)
	Cisne do pescoço preto (7)	70,83 (8,33)	45,83 (4,17)	29,17 (4,17)
Psitaciformes	Papagaio verdadeiro (5)	0,00 (0,00)	27,78 (5,55)	38,89 (11,11)
	Arara azul (5)	0,00 (0,00)	70,00 (10,00)	85,00 (10,00)
	Maracanã(2)	0,00 (0,00)	56,25 (12,50)	50,00 (18,75)
Piciformes	Araçari de faixa (2)	0,00 (0,00)	80,00 (10,00)	80,00 (10,00)
	Araçari banana (1)	0,00 (0,00)	50,00 (25,00)	75,00 (25,00)
	Araçari poca (1)	0,00 (0,00)	87,50 (12,50)	75,00 (12,50)
	Tucano do bico verde (2)	0,00 (0,00)	100,00 (14,00)	100,00 (7,00)
	Tucano de peito branco (1)	0,00 (0,00)	100,00 (14,29)	100,00 (28,58)
Galiformes	Jacutinga (2)	26,67 (0,00)	60,00 (0,66)	46,67 (0,00)
	Mutum-do-México (1)	50,00 (0,00)	100,00 (0,00)	100,00 (0,00)
	Ururutum (2)	56,25 (0,00)	75,00 (0,00)	56,25 (0,00)
Accipitriformes	Gavião real (3)	0,00 (0,00)	88,90 (11,11)	83,33 (0,00)
	Gavião pega macaco (4)	0,00 (0,00)	37,50 (9,40)	56,25 (15,62)
Strigiformes	Mocho diabo (2)	0,00 (0,00)	1,50 (0,00)	56,25 (12,50)
	Jacurutu (1)	0,00 (0,00)	37,50 (0,00)	75,00 (0,00)
	Suindara (2)	0,00 (0,00)	37,50 (12,50)	68,75 (25,00)
Cathartiformes	Urubu rei (2)	0,00 (0,00)	81,25 (31,25)	81,25 (18,75)

Fonte: (FREDIANI, 2016).

N: número de indivíduos que compõe o grupo amostral da espécie. As porcentagens de amostras com espermatozoides (sptz) são relativas às porcentagens de amostras obtidas através de cada um dos três métodos de colheita (Pré: Amostras Pré-Estimulação, Série 1: Amostras Série 1, e Série 2: Amostras Série 2).

Tabela 4 - Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Anseriformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados: Média±Erro Padrão

<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Motilidade (%)</b>	<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	<b>Concentração (sptz.10<sup>6</sup> /ml)</b>	<b>Total de sptz (sptz.10<sup>3</sup>/amostra)</b>	<b>Total de sptz móveis (sptz móveis.10<sup>3</sup>/amostra)</b>
Cisne do pescoço preto	Pré-Estímulo	20,00±20,00	2,50±2,50	10,78±10,78	0,37±0,37	298,85±298,85
	Série 1	0,00	0,00	0,42±0,42	0,01±0,01	0,00
	Série 2	10,00±10,00	2,50±2,50	5,64±5,64	0,41±0,41	162,29±162,29
Pato coscoroba	Pré Estímulo	25,38±8,59	13,85±6,05	18,90 ±15,10	0,49±0,32	329,73±213,00
	Série 1	24,62±7,13	10,00±4,67	7,28±5,13	0,35±0,27	248,68±219,62
	Série 2	24,62±7,65	16,15±5,61	19,04±13,70	0,73±0,56	523,21±449,23

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Letras sobrescritas diferentes sinalizam valores de porcentagens médias que diferiram estatisticamente. Estas comparações foram feitas entre os resultados da Manipulação Pré-Eletroestimulação, Eletroestimulação Série 1 e Eletroestimulação Série 2 ( $p < 0,05$ ; LSD Test).

Tabela 5 - Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Psitaciformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados: Média±Erro Padrão

<b>Espécie</b>	<b>Amostra</b>	<b>Motilidade (%)</b>	<b>Motilidade Progressiva (%)</b>	<b>Concentração (sptz.10<sup>6</sup> /ml)</b>	<b>Total de sptz (sptz.10<sup>3</sup>/amostra)</b>	<b>Total de sptz móveis (sptz móveis.10<sup>3</sup>/amostra)</b>
Papagaio verdadeiro	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	0,00	0,00	2,19±2,19	0,01±0,01	0,00
	Série 2	13,33±13,33	0,00	37,86±36,97	0,03±0,03	10,43±10,43
Arara azul	Pré-Estímulo	0,00± 0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	3,33±3,33	0,00	NA	NA	NA
	Série 2	5,00± 5,00	0,00	NA	NA	NA
Maracanã	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	0,00	0,00	8,19±7,52	0,01±0,01	0,00
	Série 2	1,25±1,25	0,00	0,58±0,32	4,63±2,52	0,09±0,09

Fonte: (FREDIANI, 2016)

NA: Não foi possível avaliar.

Letras sobrescritas diferentes sinalizam valores de porcentagens médias que diferiram estatisticamente. Estas comparações foram feitas entre os resultados da Manipulação Pré-Eletroestimulação, Eletroestimulação Série 1 e Eletroestimulação Série 2 ( $p < 0,05$ ; LSD Test).

Tabela 6 - Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Piciformes e Galiformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados: Média±Erro Padrão

Espécie	Amostra	Motilidade (%)	Motilidade Progressiva (%)	Concentração (sptz.10 <sup>6</sup> /ml)	Total de sptz (sptz.10 <sup>3</sup> /amostra)	Total de sptz móveis (sptz móveis.10 <sup>3</sup> /amostra)
Araçari de faixa	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	0,00	0,00	0,08±0,08	0,90±0,90	0,00
	Série 2	10,00±10,00	6,67±6,67	4,32±4,30	0,01±0,01	4,39±4,39
Araçari banana	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>C</sup>	0,00 <sup>C</sup>
	Série 1	45,00±15,00	25,00±15,00	422,30±0,00 <sup>B</sup>	7,26±0,00 <sup>A</sup>	2179,08±0,00 <sup>A</sup>
	Série 2	30,00±30,00	20,00±20,00	50,35±0,00 <sup>C</sup>	0,19±0,00 <sup>B</sup>	114,80±0,00 <sup>B</sup>
Araçari poca	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	40,00±40,00	35,00±35,00	25,44±25,44	0,01±0,01	8,14±8,14
	Série 2	0,00	0,00	0,35±0,35	0,00	0,00
Tucano do bico verde	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
	Série 1	2,50±2,50	0,00	0,20±0,00	0,01±0,00 <sup>B</sup>	0,45±0,00 <sup>B</sup>
	Série 2	0,00	0,00	0,00	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>
Tucano de peito branco	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	30,00±30,00	10,00±10,00	0,47±0,47	0,02±0,02	9,58±9,58
	Série 2	27,50±22,50	2,50±2,50	1,46±0,00	0,02±0,00	1,11±0,00
Jacutinga	Pré-Estímulo	0,00 <sup>B</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	10,00± 0,00 <sup>A</sup>	100,00	NA	NA	NA
	Série 2	0,00 <sup>B</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00

Fonte: (FREDIANI, 2016)

NA: Não foi possível avaliar.

Letras sobrescritas diferentes sinalizam valores de porcentagens médias que diferiram estatisticamente. Estas comparações foram feitas entre os resultados da Manipulação Pré-Eletoestimulação, Eletoestimulação Série 1 e Eletoestimulação Série 2 (p < 0,05; LSD Test).

Tabela 7 - Efeito das colheitas Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 sob as características seminais das espécies de Accipitriformes, Strigiformes e Cathartiformes das quais foi possível obter amostras com espermatozoides ao longo do período de um ano. Valores apresentados são Média±Erro Padrão

Espécie	Amostra	Motilidade (%)	Motilidade Progressiva (%)	Concentração (sptz.10 <sup>6</sup> /ml)	Total de sptz (sptz.10 <sup>3</sup> /amostra)	Total de sptz móveis (sptz móveis.10 <sup>3</sup> /amostra)
Gavião real	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00 <sup>B</sup>	0,00 <sup>B</sup>	0,00
	Série 1	0,00	0,00	3,13±0,00 <sup>A</sup>	0,02±0,00 <sup>A</sup>	0,00
	Série 2	0,00	0,00	0,00 <sup>B</sup>	,00±0,00 <sup>B</sup>	0,00
Gavião pega macaco	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	21,43±13,88	15,71±11,52	45,32±41,20	0,07±0,07	57,12±53,95
	Série 2	0,71±0,71	0,00	1,90±1,20	0,01±0,01	0,51±0,51
Mocho diabo	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00 <sup>B</sup>	0,00
	Série 1	0,00	0,00	0,00	0,00 <sup>B</sup>	0,00
	Série 2	10,00±10,00	5,00±5,00	13,40±7,18	0,02±0,00 <sup>A</sup>	2,37±2,37
Suindara	Pré Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	7,50±4,79	3,75±2,39	NA	NA	NA
	Série 2	25,00±18,93	10,00±7,07	22,72±12,01	0,02±0,01	7,99±5,94
Urubu rei	Pré-Estímulo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Série 1	44,00±9,27	26,00±6,78	14,54±14,02	0,62±0,55	295,67±288,38
	Série 2	28,00±12,00	16,00±8,12	6,39±4,64	0,79.10 <sup>3</sup> ±0,73	466,60±442,90

Fonte: (FREDIANI, 2016)

NA: Não foi possível avaliar.

Letras sobrescritas diferentes sinalizam valores de porcentagens médias que diferiram estatisticamente. Estas comparações foram feitas entre os resultados da Manipulação Pré-Eletoestimulação, Eletoestimulação Série 1 e Eletoestimulação Série 2 (p < 0,05; LSD Test).

Com base nesses resultados e buscando ajustar o protocolo de eletroestimulação para cada espécie testada, investigamos também os efeitos das tensões elétricas aplicadas na Série 1 e na Série 2 sob a contaminação da amostra e as possíveis reações de dor ou desconforto causadas nos indivíduos. Primeiramente discriminamos todas as contaminações encontradas nas amostras obtidas após a manipulação Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2 (Tabelas 8 a 12). Neste relato foram consideradas todas as amostras obtidas, ou seja, amostras que continham espermatozoides e amostras que não continham espermatozoides. Após isso, determinamos estatisticamente se houve diferença na porcentagem de amostras não contaminadas e contaminadas entre as Séries 1 e 2, para cada espécie testada (Tabela 13). Notamos que não houve diferença estatística entre as Séries 1 e 2, sendo que as espécies urumutum, araçari banana e urubu rei foram as que apresentaram maiores porcentagens de amostras contaminadas, e as espécies tucano de bico verde, papagaio verdadeiro e araçari de faixa, as menores. Portanto, também no aspecto de contaminação não houve diferença entre as séries de estímulos, podendo-se utilizar qualquer uma das duas.

Tabela 8 - Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Anseriformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides

<b>Espécie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Pré</b>	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>
Cisne do pescoço preto	nenhuma	94,12 (16/17)	100 (14/14)	100 (11/11)
	urina	5,88 (1/17)	-	-
	fezes	-	-	-
	sangue	-	-	-
	miscelânea	-	-	-
Pato coscoroba	nenhuma	73,91 (17/23)	52,17 (12/23)	56,52 (-13/23)
	urina	21,74 (5/23)	34,78 (8/23)	17,39 (4/23)
	fezes	4,35 (1/23)	13,04 (3/23)	21,7 (45/23)
	sangue	-	-	4,35 (1/23)
	miscelânea	-	-	-

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Tipo: tipo de contaminação; c/t: amostras com a contaminação (ou ausência de) citadas dentro de um total de amostras obtidas; - : não houve o tipo de contaminação; miscelânea: mais de um tipo de contaminante.

Tabela 9 - Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Psitaciformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides

<b>Espécie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>
Papagaio verdadeiro	nenhuma	100 (6/6)	85,71 (6/7)
	urina	-	14,29 (1/7)
	fezes	-	-
	sangue	-	-
	miscelânea	-	-
Arara Azul	nenhuma	71,43 (10/14)	82,35 (14/17)
	urina	7,14 (1/14)	11,76 (2/17)
	fezes	7,14 (1/14)	-
	sangue	14,29 (2/14)	5,88 (1/17)
	miscelânea	-	-
Maracanã	nenhuma	77,78 (7/9)	87,50 (7/8)
	urina	-	-
	fezes	11,11 (1/9)	12,50 (1/8)
	sangue	11,11 (1/9)	-
	miscelânea	-	-

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Tipo: tipo de contaminação; c/t: amostras com a contaminação (ou ausência de) citadas dentro de um total de amostras obtidas; - : não houve o tipo de contaminação; miscelânea: mais de um tipo de contaminante.

Tabela 10 - Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Piciformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides

<b>Espécie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>
Araçari de faixa	nenhuma	86,62 (11/13)	86,62 (11/13)
	urina	7,69 (1/13)	7,69 (1/13)
	fezes	-	-
	sangue	7,69 (1/13)	7,69 (1/13)
Araçari banana	nenhuma	75,00 (13/4)	42,86 (3/7)
	urina	25,00 (1/4)	14,29 (1/7)
	fezes	-	28,57 (2/7)
	sangue	-	-
	miscelânea	-	14,29 (1/7)
Araçari poca	nenhuma	71,43 (5/7)	83,33 (5/6)
	urina	-	-
	fezes	14,29 (1/7)	16,67 (1/6)
	sangue	-	-
	miscelânea	14,29 (1/7)	-
Tucano de bico verde	nenhuma	86,67 (13/15)	87,50 (14/16)
	urina	13,33 (2/15)	12,50 (2/16)
	fezes	-	-
	sangue	-	-
	miscelânea	-	-
Tucano de peito branco	nenhuma	87,50 (7/8)	62,50 (5/8)
	urina	-	-
	fezes	-	-
	sangue	-	37,50 (3/8)
	miscelânea	12,50 (1/8)	-

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Tipo: tipo de contaminação; c/t: amostras com a contaminação (ou ausência de) citadas dentro de um total de amostras obtidas; - : não houve o tipo de contaminação; miscelânea: mais de um tipo de contaminante.

Tabela 11 - Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Galiformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides

<b>Espécie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Pré</b>	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>
Jacutinga	nenhuma	80,00 (4/5)	63,64 (7/11)	70,00 (7/10)
	urina	-	9,09 (1/11)	10,00 (1/10)
	fezes	-	18,18 (2/11)	-
	sangue	20,00 (1/5)	0,09 (1/11)	20,00 (2/10)
	miscelânea	-	-	-
Mutum-do-México	nenhuma	100,00 (1/1)	50,00 (1/2)	50,00 (1/2)
	urina	-	50,00 (1/2)	50,00 (1/2)
	fezes	-	-	-
	sangue	-	-	-
	miscelânea	-	-	-
Urumutum	nenhuma	75,00 (6/8)	50,00 (6/12)	40,00 (4/10)
	urina	-	-	-
	fezes	12,50 (1/8)	25,00 (3/12)	10,00 (1/10)
	sangue	12,50 (1/8)	25,00 (3/12)	40,00 (4/10)
	miscelânea	-	-	10,00 (1/10)

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Tipo: tipo de contaminação; c/t: amostras com a contaminação (ou ausência de) citadas dentro de um total de amostras obtidas; - : não houve o tipo de contaminação; miscelânea: mais de um tipo de contaminante.

Tabela 12 - Contaminações ocorridas durante o procedimento de tentativa de colheita de sêmen em Accipitriformes, Strigiformes e Cathartiformes. Aqui foram relacionadas todas as amostras colhidas ao longo de um ano, de todas as espécies testadas, contendo ou não espermatozoides

<b>Espécie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Série 1</b>	<b>Série 2</b>
Gavião real	nenhuma	52,38 (11/21)	56,25 (9/21)
	urina	23,81 (5/21)	19,05 (4/21)
	fezes	14,29 (3/21)	4,76 (1/21)
	sangue	-	23,81 (5/21)
	miscelânea	9,52 (2/21)	9,52 (2/21)
Gavião pega macaco	nenhuma	54,55 (6/11)	66,67 (12/18)
	urina	18,18 (2/11)	11,11 (2/18)
	fezes	-	5,56 (1/18)
	sangue	18,18 (2/11)	16,67 (3/18)
	miscelânea	9,09 (1/11)	-
Mocho diabo	nenhuma	50,00 (1/2)	77,78 (7/9)
	urina	50,00 (1/2)	11,11 (1/9)
	fezes	-	11,11 (1/9)
	sangue	-	-
	miscelânea	-	-
Jacurutu	nenhuma	66,67 (2/3)	83,33 (5/6)
	urina	33,33 (1/3)	16,67 (1/6)
	fezes	-	-
	sangue	-	-
	miscelânea	-	-
Suindara	nenhuma	83,33 (5/6)	81,82 (9/11)
	urina	16,67 (1/6)	18,18 (2/11)
	fezes	-	-
	sangue	-	-
	miscelânea	-	-
Urubu rei	nenhuma	53,85 (7/13)	42,86 (6/14)
	urina	15,38 (2/13)	21,43 (3/14)
	fezes	15,38 (2/13)	21,43 (3/14)
	sangue	7,69 (1/13)	14,29 (2/14)
	miscelânea	7,69 (1/13)	-

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Tipo: tipo de contaminação; c/t: amostras com a contaminação (ou ausência de) citadas dentro de um total de amostras obtidas; - : não houve o tipo de contaminação; miscelânea: mais de um tipo de contaminante.

Tabela 13 - Porcentagem de amostras (com ou sem espermatozoides) contaminadas colhidas nas Série 1 e na Série 2 de todas as espécies testadas durante o período de um ano

Espécie	% de amostras contaminadas		
	Série 1	Série 2	Valor de p
Cisne do pescoço preto	47,83	43,48	1,00
Pato coscoroba	0,00	14,29	0,77
Papagaio verdadeiro	28,57	17,65	0,34
Arara azul	22,22	12,50	0,47
Maracanã	15,38	15,38	0,60
Araçari de faixa	25,00	57,14	1,00
Araçari banana	28,57	16,67	0,60
Araçari poca	13,33	12,50	0,61
Tucano do bico verde	12,50	37,50	0,94
Tucano de peito branco	36,36	30,00	0,25
Jacutinga	50,00	50,00	0,76
Mutum-do-México	50,00	60,00	1,00
Urumutum	47,62	43,75	0,64
Gavião real	45,45	33,33	0,54
Gavião pega macaco	50,00	22,22	0,51
Mocho diabo	33,33	16,67	0,42
Jacurutu	16,67	18,18	0,57
Suindara	16,15	57,14	0,94
Urubu rei	47,83	43,48	0,57

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Teste Qui-Quadrado, considerando significativos valores de  $p < 0,05$ .

Quanto às prováveis reações de dor e desconforto, aqui relatadas como vocalização e agitação, registramos, a cada tentativa de colheita de sêmen, a tensão elétrica a partir da qual tais reações passaram a ser manifestadas, caso essa manifestação existisse. Tanto a vocalização quanto a agitação foram relatadas em cerca de 20% de todas as tentativas de colheita. Algumas espécies parecem ser mais sensíveis, pois apresentaram tais reações em mais de 30% das tentativas de colheita de sêmen (Tabela 14). As tensões mais altas, de 3 e 4 volts, foram as que geraram manifestação de vocalização e agitação em um maior número de indivíduos (Figura 4). Assim sendo, identificamos que a Série 2 pode levar a um desconforto maior que a Série 1, e por isso, para trabalhos futuros, tensões iguais ou maiores que 3 V talvez possam ser evitadas nos protocolos de colheita das espécies em questão.

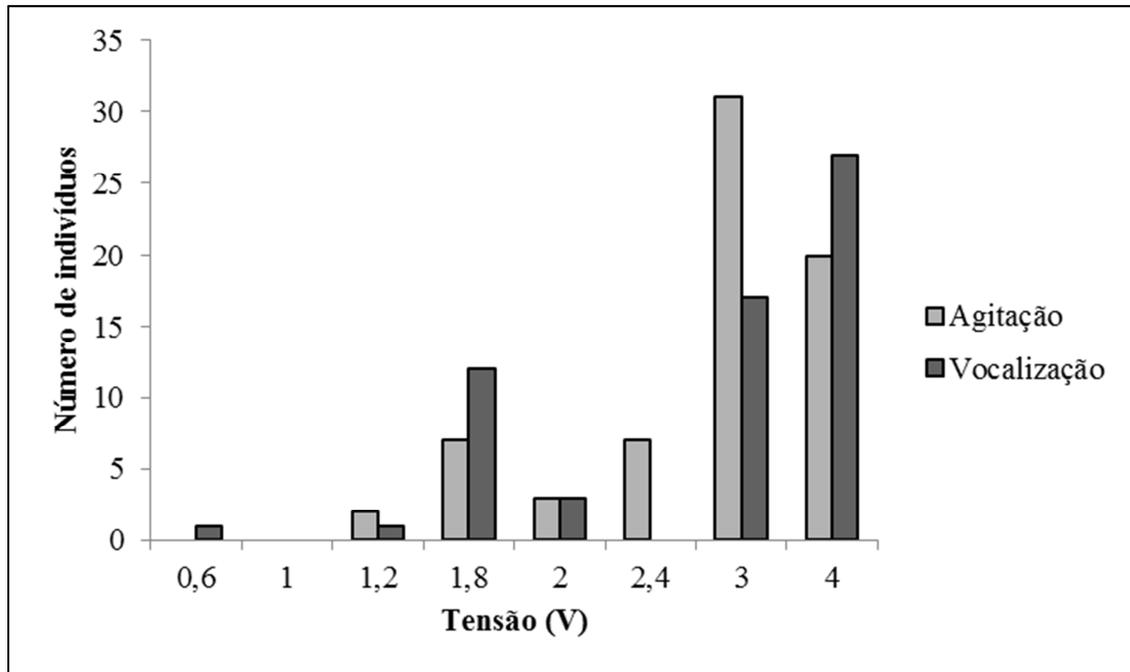
Tabela 14 - Registro das prováveis reações de dor ou desconforto dentro de cada espécie, a cada tentativa das colheitas que foram realizadas ao longo do período de um ano.

<b>Espécie (N)</b>	<b>Ocorrência de colheitas com manifestação de vocalização % (o/c)</b>	<b>Ocorrência de colheitas com manifestação de agitação % (o/c)</b>
Cisne do pescoço preto (7)	12,50 (3/24)	25,00 (6/24)
Pato coscoroba (6)	8,33 (2/24)	20,83 (5/24)
Papagaio verdadeiro (5)	0,00 (0/16)	6,25 (0/16)
Arara azul (5)	0,00 (0/20)	10,00 (2/20)
Maracanã (2)	6,25 (1/16)	18,75 (3/16)
Araçari de faixa (2)	43,75 (7/16)	18,75 (3/16)
Araçari banana (1)	50,00 (4/8)	25,00 (2/8)
Araçari poca (1)	75,00 (6/8)	25,00 (2/8)
Tucano do bico verde (2)	43,75 (7/16)	18,75 (3/16)
Tucano de peito branco (1)	12,50 (1/8)	37,50 (3/8)
Jacutinga (2)	25,00 (4/16)	37,50 (6/16)
Mutum-do-México (1)	0,00 (0/2)	0,00 (0/2)
Urumutum (2)	13,33 (2/15)	26,67 (4/15)
Gavião real (3)	25,00 (6/24)	33,33 (8/24)
Gavião pega macaco (4)	46,88 (15/32)	40,63 (13/32)
Mocho diabo (2)	12,50 (2/16)	18,75 (3/16)
Jacurutu (1)	62,50 (5/5)	0,00 (0/8)
Suindara (2)	25,00 (4/16)	18,75 (3/16)
Urubu rei (2)	18,75 (3/16)	18,75 (3/16)

Fonte: (FREDIANI, 2016)

N: número de indivíduos; o/c: quantidade de ocorrência dentro do total de tentativas de colheita de sêmen.

Figura 4 - Número de indivíduos que apresentaram prováveis reações de dor ou desconforto a partir da tensão (V) aplicada em diante

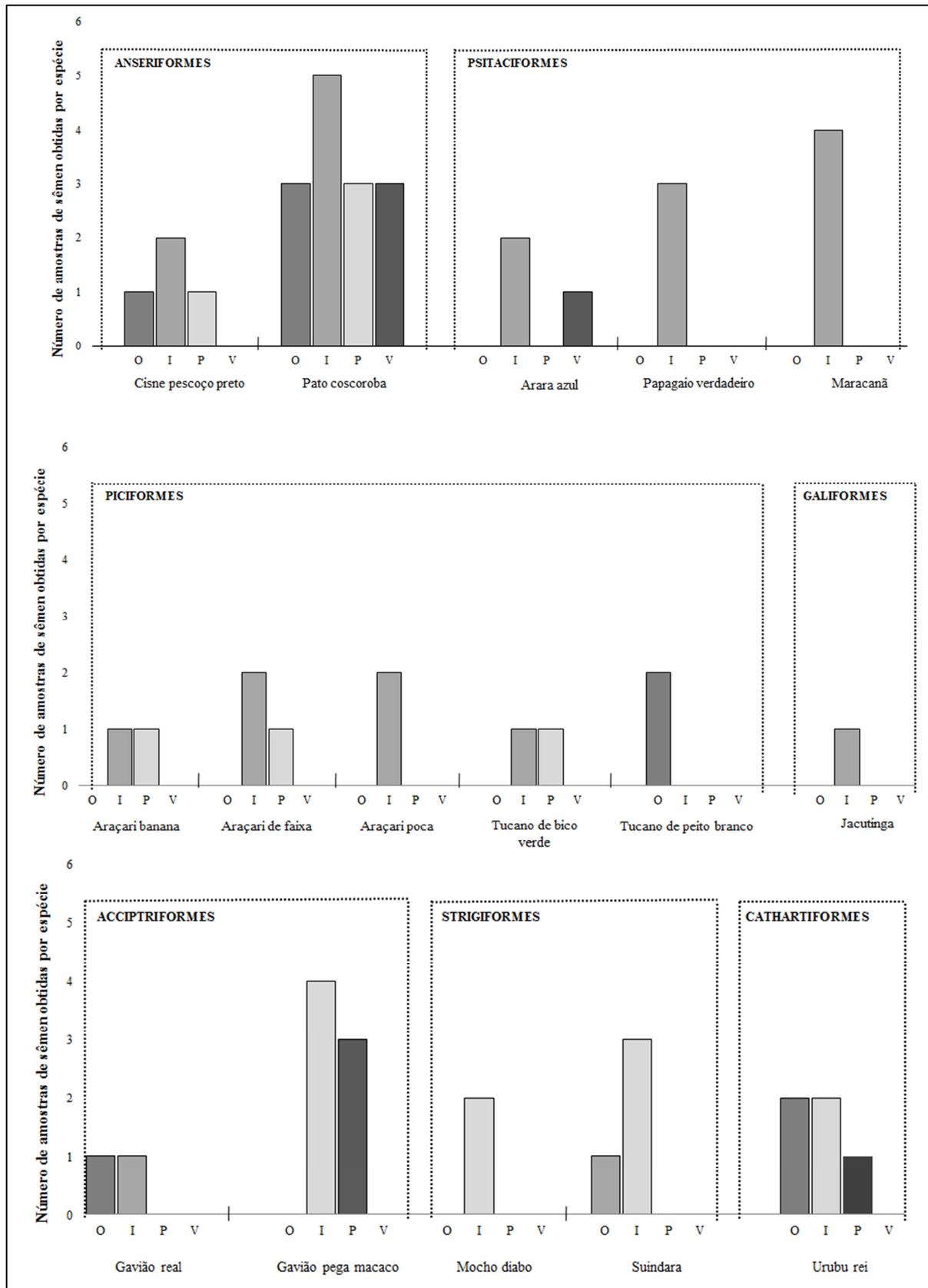


Fonte: (FREDIANI, 2016)

### 5.3 Sazonalidade da produção espermática

As tentativas de colheita de sêmen foram realizadas durante o período de um ano em todas as espécies testadas, objetivando identificar, para cada espécie, se há uma estação do ano na qual podemos obter amostras de sêmen de melhor qualidade. A primeira colheita ocorreu em julho de 2015 e a última, em abril de 2016, como já foi citado. A maior parte das colheitas bem sucedidas, ou seja, colheitas que resultaram em amostras seminais, ocorreu no inverno. Foram oito colheitas com amostras com espermatozoides durante os meses do outono, 35 no inverno, 13 na primavera e apenas quatro no verão (Figura 5). A única espécie que apresentou amostras seminais em todas as estações do ano foi o pato coscoroba, indicando uma menor influencia sazonal na produção espermática. O cisne de pescoço preto e o urubu rei apresentaram amostras de sêmen em três estações do ano. Todos os Ranfastídeos (araçarís e tucanos), exceto o tucano de peito branco, os Accipitriformes (gavião real e gavião pega macaco), a suindara e a arara azul tiveram amostras de sêmen em duas estações do ano. Por fim, apenas foi possível obter sêmen em uma estação do ano dos indivíduos das espécies papagaio, maracanã, tucano de peito branco, jacutinga e mocho diabo, indicando forte tendência à sazonalidade da produção espermática.

Figura 5 - Número de amostras de sêmen obtidas de cada espécie em cada estação do ano.



Fonte: (FREDIANI, 2016)

O:outono, I: Inverno, P: Primavera, V: Verão

Investigamos, estatisticamente, os efeitos da provável influência sazonal na produção espermática sobre a qualidade seminal em cada espécie. Para avaliar a qualidade do sêmen utilizamos as seguintes características: motilidade espermática (%), motilidade espermática progressiva (%), concentração espermática (sptz/ml), total de espermatozoides obtidos na amostra colhida (sptz/amostra) e total de espermatozoides móveis obtidos na amostra colhida (sptz móveis/amostra). Para as espécies com amostras em apenas uma estação do ano organizamos os dados de maneira descritiva, já que não havia outra estação para comparar (Tabela 15). Para espécies com amostras seminais em duas estações do ano, utilizamos o teste de Wilcoxon para comparar as características entre as estações (Tabela 16). Para espécies com amostras seminais em três ou quatro estações do ano, o teste utilizado foi o LSD (Tabela 17). Apenas para o urubu rei foi verificada uma diferença estatística na característica motilidade espermática entre as estações em que foi possível colher amostras seminais nos indivíduos desta espécie. Nas demais espécies, não houve diferença significativa em quaisquer características entre as amostras seminais obtidas. Isso indica que há tendência à sazonalidade da produção espermática para a maioria das espécies testadas e que, dentro dos meses em que essas amostras seminais foram obtidas não há como escolhermos um mês mais adequado para a tentativa de colheita, pelo menos a partir desse estudo. No entanto, saber em quais meses foi possível obter amostras seminais já nos é de grande valia para nortear programas de reprodução assistida.

Tabela 15 - Valores de Média  $\pm$  erro padrão e intervalo (em parênteses) das características espermática das espécies em que amostras de sêmen com espermatozoides foram obtidas em uma única estação do ano

Espécie	Estação	Volume ( $\mu$ l)	Motilidade (%)	Motilidade Progressiva (%)	Concentração (sptz. $10^6$ /ml)	Total de sptz (sptz. $10^3$ /amostra)	Total de sptz móveis (sptz móveis. $10^3$ /amostra)
Papagaio verdadeiro	Inverno	1,73 $\pm$ 1,19 (0,40-4,10)	6,67 $\pm$ 16,33 (0-40)	0,00	20,02 $\pm$ 45,02 (0-111,78)	17,66. $10^3 \pm 31,56$ (0- 78,25)	5,22. $10^3 \pm 12,78$ (0-31,30)
Maracanã	Inverno	5,32 $\pm$ 2,58 (1,10-5,10)	0,63 $\pm$ 1,77 (0-5)	0,00	4,93 $\pm$ 11,39 (0-30,68)	8,31 $\pm$ 12,04 (0-33,76)	0,04 $\pm$ 0,10 (0-0,26)
Tucano de Peito Branco	Inverno	41,85 $\pm$ 37,68 (15,20-68,50)	28,75 $\pm$ 15,33 (0-60)	6,25 $\pm$ 4,73 (0-20)	0,80 $\pm$ 0,43 (0-1,4)	18,03 $\pm$ 9,44 (0-31,92)	6,75 $\pm$ 6,21 (0-1,1)
Jacutinga	Primavera	11,55*	5,00 $\pm$ 7,07 (0-10)	50,00 $\pm$ 70,71 (0-100)	NA	NA	NA
Mocho diabo	Inverno	2,4 $\pm$ 1,4 (1,00-3,80)	5,00 $\pm$ 10,00 (0-20)	2,50 $\pm$ 5,00 (0-10)	6,70. $10^6 \pm 9,71$ (0-20,58)	11,06 $\pm$ 12,83 (0-23,66)	1,18. $10^3 \pm 2,37$ (0-4,73)

Fonte: (FREDIANI, 2016)

\*amostra única

sptz: espermatozoides.

Tabela 16 - Valores de Média  $\pm$  Erro Padrão das características espermática das espécies em que foi possível obter amostras de sêmen em duas estações do ano (Wilcoxon Test)

Espécie	Estação	Volume ( $\mu$ l)	Motilidade (%)	Motilidade Progressiva(%)	Concentração (sptz. $10^6$ /ml)	Total de sptz (sptz. $10^3$ /amostra)	Total de sptz móvei (sptz móveis. $10^3$ /amostra)
Arara azul	Inverno	7,65 $\pm$ 3,25	6,67 $\pm$ 3,33	0,00	NA	NA	NA
	Verão	3,15*	0,00	NA	NA	NA	NA
Araçari de faixa	Inverno	7,5 $\pm$ 4,1	7,50 $\pm$ 7,50	5,00 $\pm$ 5,00	3,27 $\pm$ 3,22	11,43 $\pm$ 10,83	3,29 $\pm$ 3,29
	Primavera	7,90*	0,00	0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,00	0,00
Araçari banana	Inverno	32,3*	15,00 $\pm$ 15,00	5,00 $\pm$ 5,00	422,30 $\pm$ 0,00	7263,59 $\pm$ 0,00	2179,08 $\pm$ 0,00
	Primavera	6*	60 $\pm$ 0,00	40,00	50,35 $\pm$ 0,00	191,33 $\pm$ 0,00	114,80 $\pm$ 0,00
Araçari poca	Inverno	8,1*	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,35	2,86 $\pm$ 2,86	0,00 $\pm$ 0,00
	Primavera	0,4*	40,00 $\pm$ 40,00	35,00 $\pm$ 35,00	25,44 $\pm$ 25,44	10,17 $\pm$ 10,17	8,14 $\pm$ 8,14
Tucano do bico verde	Inverno	43,75*	2,50 $\pm$ 2,50	0,00	0,10 $\pm$ 0,10	4,46 $\pm$ 4,46	0,22 $\pm$ 0,22
	Primavera	10*	0,00	0,00	NA	NA	NA
Gavião real	Inverno	5,75*	0,00	0,00	1,57 $\pm$ 0,00	9,01 $\pm$ 9,01	0,00
	Outono	4,2*	0,00	0,00	NA	NA	NA
Gavião pega macaco	Inverno	5,11 $\pm$ 1,26	9,38 $\pm$ 8,68	3,75 $\pm$ 3,75	4,67 $\pm$ 3,61	10,94 $\pm$ 7,40	2,67 $\pm$ 2,28
	Primavera	1,6 $\pm$ 0,42	13,33 $\pm$ 13,33	13,33 $\pm$ 13,33	58,81 $\pm$ 58,19	102,67 $\pm$ 101,84	81,64 $\pm$ 81,64
Suindara	Inverno	1,1 $\pm$ 0,32	21,67 $\pm$ 12,22	9,17 $\pm$ 4,55	17,04 $\pm$ 10,22	11,59 $\pm$ 6,71	5,99 $\pm$ 4,65
	Outono	2*	0,00	0,00	NA	NA	NA

Fonte: (FREDIANI, 2016)

\*amostra única

sptz: espermatozoides.

Tabela 17 - Valores de Média ± Erro Padrão das características espermática das espécies em que foi possível obter amostras de sêmen em três ou quatro estações do ano (LSD Test). Resultados apresentados através da Média ± Erro Padrão)

Espécie	Estação	Volume (µl)	Motilidade (%)	Motilidade Progressiva (%)	Concentração (sptz/ml)	Total de sptz (sptz/amostra)	Total de sptz móveis (sptz móveis/amostra)
Cisne do pescoço preto	Outono	34,65*	0,00	0,00	NA	NA	NA
	Inverno	55,95±16,05	10,00±10,00	2,50±2,50	4,54±4,13	311,23±302,05	121,72±121,72
	Primavera	27,3*	0,00	0,00	NA	NA	NA
Pato coscoroba	Outono	86,66±49,60	20,00±8,94	8,33±5,43	4,75±4,75	99,79±99,79	39,92±39,92
	Inverno	227,06±99,13	26,25±10,85	15,00±8,02	10,35±8,57	485,38±457,38	457,38±367,72
	Primavera	521,68±292,52	21,67±8,72	8,33±4,01	1,68±1,19	237,90±112,97	93,21±47,92
	Verão	117,52±66,77	30,00±13,42	20,00±10,00	29,23±22,41	1083,73±925,52	819,31±748,95
Urubu rei	Outono	29,37±11,52	32,50±11,09 <sup>AB</sup>	25,00±8,66	10,91±8,91	401,06±383,66	199,36±192,39
	Inverno	190,42±89,93	55,00±5,00 <sup>A</sup>	25,00±8,66	13,88±10,78	1966,57±1762,03	1159,49±1077,67
	Primavera	204,75*	5,00±5,00 <sup>B</sup>	5,00±5,00	0,26±0,26	36,48±36,48	3,65±3,65

Fonte: (FREDIANI, 2016)

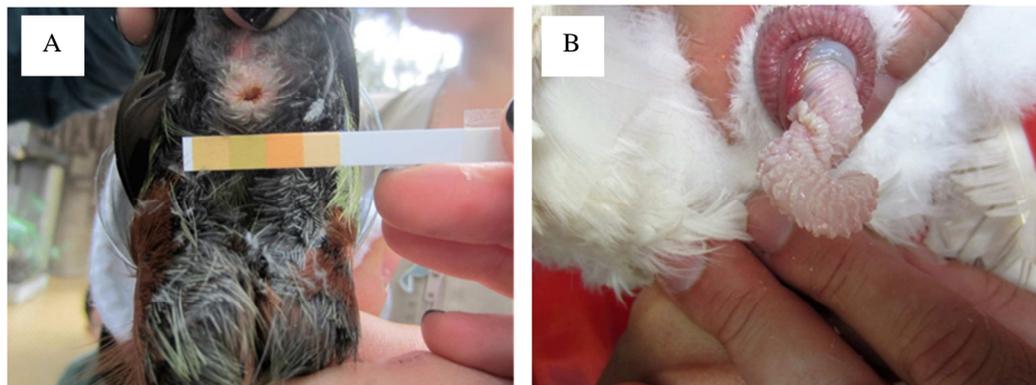
\*amostra única.

Letras sobrescritas diferentes sinalizam valores que diferiram estatisticamente nas comparações entre as estações do ano ( $p < 0,05$ ); LSD Test

#### 5.4 Características de falo e cloaca em relação a qualidade de sêmen

Durante todo o experimento, em todas as tentativas de colheita de sêmen avaliamos a cloaca dos indivíduos antes da introdução da probe e início da eletroestimulação. Fotografamos a cloaca de cada indivíduo (Figura 6A) e atribuímos uma coloração a esta, o que foi realizado de maneira subjetiva, porém dentro de uma escala de cores confeccionada para este fim, sempre pelo mesmo pesquisador. Registramos medidas de diâmetros cloacais, verticais e horizontais, para posteriormente obter medidas da área da cloaca. Em espécies que possuem falo realizamos uma avaliação, também subjetiva e feita sempre pelo mesmo pesquisador (em que 1: falo pouco desenvolvido - coloração mais clara, pouco edemaciado, pouca vascularização aparente; e 2: falo bem desenvolvido – coloração mais escura, edemaciado e mais vascularização aparente) logo após a exposição deste órgão, e antes da introdução da probe (Figura 6B).

Figura 6 - Características relacionadas ao desenvolvimento da cloaca e do falo (para animais que possuem falo) foram registradas durante todas as tentativas de colheita de sêmen



Fonte: (FREDIANI, 2016)

6A: Atribuição de cor a cloaca. 6B: Exposição do falo e atribuição de quantificação de seu desenvolvimento.

Essas informações foram então registradas individualmente ao longo do período de um ano. Buscou-se então correlacioná-las com as estações do ano, já que durante a explanação da primeira hipótese pudemos sugerir qual a melhor estação para realizarmos as colheitas de sêmen em cada espécie. A tentativa de correlacionar as médias de medidas de área de cloaca

com as estações do ano nos apresentou diferenças significativas apenas para três espécies: papagaio verdadeiro, gavião real e suindara (Tabela 18). Para papagaio verdadeiro, o maior valor médio de área de cloaca foi registrado no outono. Os valores de inverno e verão não diferiram, sendo as segundas maiores médias, e na primavera, a média foi a menor. A única estação do ano em que foi possível obter amostras de sêmen em papagaios foi no inverno e portanto, para esses indivíduos não há uma associação clara entre áreas maiores de cloaca e obtenção de amostras. Para gavião real, a maior média foi registrada no inverno. A segunda maior média, verificada no verão, não diferiu estatisticamente da do inverno e nem da média da primavera. A menor média, foi a do outono. As amostras de sêmen obtidas dos indivíduos de gavião real ocorreram no outono e no inverno. Logo, para esses indivíduos, pelo menos um dos sucessos de colheita de sêmen coincidiu com as maiores médias de área cloacal. Para as suindaras, a maior média de área de cloaca foi vista no inverno, seguida das médias de outono e primavera que não diferiram entre si e nem das médias de inverno e verão, e a menor média ocorreu no verão. Os indivíduos de suindara proporcionaram amostras de sêmen no outono e no inverno. Sendo assim, para suindaras, nesta análise, seria possível sugerir que as maiores médias de medidas de área de cloaca podem ter relação com a produção de amostras com sêmen.

Tabela 18 - Médias  $\pm$  Erro padrão das medidas de área das cloacas de todas as espécies testadas nas quatro estações do ano

Espécie	Inverno	Outono	Primavera	Verão
Cisne do pescoço preto	1,7483 $\pm$ 0,25837	2,008 $\pm$ 0,14122	1,63363 $\pm$ 0,13476	1,56967 $\pm$ 0,11167
Pato coscoroba	1,64934 $\pm$ 0,19433	1,62054 $\pm$ 0,18059	1,40848 $\pm$ 0,14221	1,39539 $\pm$ 0,07342
Papagaio verdadeiro	0,61104 $\pm$ 0,06767 <sup>AB</sup>	0,73513 $\pm$ 0,08066 <sup>A</sup>	0,48106 $\pm$ 0,01374 <sup>B</sup>	0,5969 $\pm$ 0,06209 <sup>AB</sup>
Arara azul	1,31161 $\pm$ 0,09769	1,36345 $\pm$ 0,09634	1,31319 $\pm$ 0,12526	1,12155 $\pm$ 0,09475
Maracanã	0,57138 $\pm$ 0,01173	0,59952 $\pm$ 0,12699	0,62046 $\pm$ 0,04658	0,58512 $\pm$ 0,09168
Araçari de faixa	0,47124 $\pm$ 0,05479	0,54782 $\pm$ 0,07286	0,50265 $\pm$ 0,06672	0,40841 $\pm$ 0,12953
Araçari banana	0,40841 $\pm$ 0,03142	0,47124 $\pm$ 0,15708	0,40841 $\pm$ 0,03142	0,40841 $\pm$ 0,03142
Araçari poca	0,47517 $\pm$ 0,09032	0,55763 $\pm$ 0,00785	0,60083 $\pm$ 0,03534	0,50265 $\pm$ 0
Tucano do bico verde	0,54192 $\pm$ 0,04278	0,58709 $\pm$ 0,06137	0,5164 $\pm$ 0,02997	0,52818 $\pm$ 0,03338
Tucano de peito branco	0,55763 $\pm$ 0,00785	0,59298 $\pm$ 0,09817	0,56156 $\pm$ 0,06676	0,58905 $\pm$ 0,03927
Jacutinga	1,5492 $\pm$ 0,22657	1,16828 $\pm$ 0,04814	1,18595 $\pm$ 0,13802	1,49029 $\pm$ 0,06759
Mutum-do-México	1,69646	1,79071	NA	NA
Ururutum	0,95033 $\pm$ 0,12344	1,2154 $\pm$ 0,15985	1,07992 $\pm$ 0,11726	1,08778 $\pm$ 0,15807
Gavião real	2,11796 $\pm$ 0,11127 <sup>A</sup>	1,53676 $\pm$ 0,17074 <sup>C</sup>	1,69384 $\pm$ 0,06968 <sup>BC</sup>	2,04204 $\pm$ 0,09407 <sup>AB</sup>
Gavião pega macaco	0,80405 $\pm$ 0,06955	0,92382 $\pm$ 0,20947	0,85118 $\pm$ 0,09578	0,73631 $\pm$ 0,05565
Mocho diabo	0,55174 $\pm$ 0,07637	0,44768 $\pm$ 0,03656	0,52229 $\pm$ 0,03985	0,4948 $\pm$ 0,03656
Jacurutu	0,61654 $\pm$ 0,01178	0,56156 $\pm$ 0,0432	0,55763 $\pm$ 0,13352	0,58512 $\pm$ 0,01964
Suindara	0,42608 $\pm$ 0,04306 <sup>A</sup>	0,33968 $\pm$ 0,02429 <sup>AB</sup>	0,32987 $\pm$ 0,02244 <sup>AB</sup>	0,28274 $\pm$ 0,02721 <sup>B</sup>
Urubu rei	3,48913 $\pm$ 0,52885	2,64876 $\pm$ 0,5315	2,34638 $\pm$ 0,30047	3,12588 $\pm$ 0,15471

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Letras sobrescritas diferentes sinalizam diferença estatística entre as médias das medidas de área de cloaca em cada estação do ano ( $p < 0,05$ ; LSD Test).

Buscamos também correlacionar as cores de cloaca registradas com as estações do ano (Tabela 19). Como as cores foram dadas em uma escala em que 1: pálido, 2: alaranjado, 3: rosa claro, 4: rosa, 5: rosa escuro e 6: hiperêmica, isso nos permitiu supor valores maiores de média de cor como cloacas de indivíduos mais sexualmente ativos. Sabe-se, porém, que a maior parte dos indivíduos do nosso grupo não estava pareada e nem com histórico de cópula durante todo o experimento e por isso, essa coloração de cloaca não estaria relacionada às tentativas de cópula em si. Além disso, alguns indivíduos não foram passíveis de avaliação, pois apresentavam cloacas pigmentadas (ex: araras azuis, papagaios verdadeiros e alguns araçarís). Foram observadas diferenças estatísticas na média da coloração de cloacas nas espécies pato coscoroba, maracanã, mocho diabo, suindara e urubu. Para pato coscoroba, as médias de cor de cloaca do verão, outono e inverno foram estatisticamente iguais e maiores que a média da primavera. Essa espécie proporcionou amostras de sêmen em todas as estações do ano. A média de cor de cloaca de outono, para maracanã, foi a maior. As médias de verão e inverno foram iguais entre si e não diferiram das médias de outono e primavera, sendo que a média de primavera foi a menor. O inverno foi a única estação em que foi possível obter sêmen de indivíduos de maracanãs, não coincidindo então com a observação de médias maiores de cor de cloaca. A espécie mocho diabo teve maior média de cor de cloaca no verão, seguida da média de outono, que não diferiu da média de verão e nem das médias de inverno e primavera, que foram estatisticamente iguais e menores. Os indivíduos de mocho diabo apenas tiveram amostras de sêmen no inverno. No caso dos machos de suindara deste estudo, a maior média de cor de cloaca foi registrada no outono, seguida da média de inverno e das médias de primavera e verão que não diferiram entre si. Como já foi relatado, as suindaras tiveram amostras de sêmen no outono e no inverno, mais uma vez podendo-se sugerir a correlação das mudanças na cloaca com obtenção de sêmen. Por fim, o urubu teve maior média de coloração de cloaca no verão, seguida das médias de inverno e primavera que não diferiram nem entre si e nem das médias de verão e outono, sendo esta última, a menor. Foi possível colher sêmen dos urubus no outono, inverno e primavera, não nos trazendo nenhuma relação clara quanto cor de cloaca e obtenção de amostras de sêmen. Esses resultados apenas sugerem que para algumas espécies essas características de cloaca podem ser relacionadas a produção de sêmen, porém, não nos trazem segurança para tomar isso como uma correlação usual.

Tabela 19 - Média e erro padrão da coloração de cloaca de todas as espécies testadas, com exceção das espécies que apresentavam cloaca pigmentada, ao longo das quatro estações do ano, dentro de uma escala de cor progressiva (em que 1: pálido, 2: alaranjado, 3: rosa claro, 4: rosa, 5: rosa escuro e 6: hiperêmica)

Espécie	Coloração de cloaca			
	Inverno	Outono	Primavera	Verão
	Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Cisne do pescoço preto	4,80±1,07	3,67±0,33	3,50±0,22	4,00±0,00
Pato coscoroba	4,00±0,37 <sup>A</sup>	4,17±0,17 <sup>A</sup>	3,17±0,17 <sup>B</sup>	4,00±0,00 <sup>A</sup>
Maracanã	2,50±0,29 <sup>AB</sup>	3,00±0,00 <sup>A</sup>	2,00±0,00 <sup>B</sup>	2,50±0,29 <sup>AB</sup>
Araçari poca	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,00	2,50±0,50
Tucano do bico verde	2,75±0,48	2,75±0,25	2,25±0,25	2,25±0,25
Tucano de peito branco	2,50±0,50	2,00±0,00	3,50±0,50	2,50±0,50
Jacutinga	2,75±0,48	2,50±0,29	2,75±0,75	3,00±0,00
Urumutum	2,00±0,00	2,25±0,25	2,25±0,25	2,00±0,00
Gavião real	3,17±0,17	2,67±0,56	3,17±0,17	3,17±0,17
Gavião pega macaco	2,63±0,50	2,63±0,38	2,88±0,48	2,50±0,46
Mocho diabo	3,00±0,00 <sup>B</sup>	3,75±0,48 <sup>AB</sup>	3,00±0,00 <sup>B</sup>	4,25±0,63 <sup>A</sup>
Jacurutu	3,50±0,50	1,50±1,50	3,00±0,00	2,00±1,00
Suindara	3,50±0,29 <sup>B</sup>	4,00±0,00 <sup>A</sup>	3,00±0,00 <sup>C</sup>	3,00±0,00 <sup>C</sup>
Urubu rei	2,50±0,29 <sup>AB</sup>	1,75±0,25 <sup>B</sup>	2,50±0,29 <sup>AB</sup>	3,50±0,65 <sup>A</sup>

Fonte: (FREDIANI, 2016).

Letras sobrescritas diferentes sinalizam diferença estatística entre as colorações de cloaca em cada estação do ano ( $p < 0,05$ ; LSD Test).

A respeito do falo, tentamos correlacionar o desenvolvimento deste órgão com características de sêmen. Agrupamos para essa análise as espécies que possuem falo e das quais foi possível colher amostras de sêmen: pato coscoroba, cisne do pescoço preto e jacutinga (Tabela 20). Apenas para a característica volume seminal vimos diferença estatisticamente significativa entre as amostras de indivíduos com falo pouco desenvolvidos e bem desenvolvidos, sendo que este último grupo apresentou volumes maiores. Através de tais análises podemos verificar que esta é a única hipótese que não pode ser sustentada, pois não houve correlações suficientes para tal.

Tabela 20 - Investigação do efeito do falo pouco desenvolvido e bem desenvolvido sob características de qualidade seminal. Apenas para as espécies que possuem falo e das quais foi possível obter amostras de sêmen (cisne de pescoço preto, pato coscoroba e jacutinga)

Características seminais	Falo pouco desenvolvido	Falo bem desenvolvido	Valor de p
Volume	39,88±16,71 *	87,40±20,17 *	0,04
Motilidade (%)	16,67±7,72	21,43±4,20	0,41
Motilidade Progressiva (%)	5,00±2,30	13,81±3,61	0,42
Concentração (sptz.10 <sup>6</sup> /ml)	4, 88±3,14	15,12±6,98	0,23
Sptz totais (sptz móveis. 10 <sup>3</sup> /ml)	685,25,06±424,33	149,15±51,68	0,71
Total de sptz móveis (sptz móveis. 10 <sup>3</sup> amostra)	197,63±135,18	63,45±25,00	0,50

Fonte: (FREDIANI, 2016).

\* representam diferença estatística ente características seminais de indivíduos com falo pouco desenvolvido e falo bem desenvolvido ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon Test).

### 5.5 Características macro e microscópicas do sêmen

Os dados a respeito das características seminais, levantadas ao longo do período de um ano de todas as espécies em que se fez possível obter sêmen, estão apresentados de maneira descritiva. No momento da colheita de amostras, atribuíamos subjetivamente características de cor, opacidade e viscosidade dentro de uma escala, e sempre por um mesmo pesquisador (Quadro 3). Dentre os ejaculados com espermatozoides, para cada espécie, discriminamos todas as cores, opacidades e viscosidades de amostra registradas (Tabelas 21 e 22). Notamos que a maioria das amostras apresentou-se transparente (sem cor) e translúcida (com opacidade nula). A viscosidade foi bastante variável entre as amostras. O volume e o pH das amostras com espermatozoides também foram tabulados (Tabela 23) e nessas características também pudemos observar uma grande variação. Os maiores volumes médios foram os das amostras obtidas de pato coscoroba, seguido do urubu rei e do cisne de pescoço preto. Suindara, papagaio e mocho diabo apresentaram os menores volumes.

Por último, relatou-se os valores mínimos e máximos de concentração espermática (sptz/ml) encontrada em cada espécie, e a média de concentração espermática destas (Tabela

24). As espécies das quais obtivemos amostras mais concentradas foram araçari banana, com 422 bilhões de spz por ml, gavião pega macaco, com 291 bilhões de spz por ml e o papagaio verdadeiro, com quase 112 bilhões de spz por ml. Não foi possível calcular a concentração espermática para arara azul e nem para jacutinga, pois após a diluição em formol salina, não pudemos encontrar espermatozoides nos testes na câmara de Neubauer. Portanto, acreditamos que a concentração dessas amostras foi bem baixa. Tucano de bico verde e gavião real não apresentaram valores máximos e mínimos de concentração espermática pelo fato de terem apenas um único valor de concentração tabulado.

Quadro 3 - Escalas de cor, opacidade e viscosidade utilizada para caracterizar as amostras colhidas

Amostra					
Cor		Opacidade		Viscosidade	
transparente	0	translúcida	0	liquido	0
esbranquiçada	1	pouco opaca	1	pouco viscoso	1
acinzentada	2	opaca	2	viscoso	2
amarelada	3			muito viscoso	3
avermelhada	4			cremoso	4
vermelha	5				

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Tabela 21 - Características macroscópicas (cor, opacidade e viscosidade) das amostras de sêmen nas espécies G1 em que foi possível obtê-las

Espécie	Cor (a/t)	Opacidade % (a/t)	Viscosidade (a/t)
Cisne do pescoço preto	transparente 80,00 (4/5)	translúcido 20,00 (1/5)	liquido 20,00 (1/5)
	esbranquiçada 20,00 (1/5)	pouco opaco 80,00 (4/5)	pouco viscoso 60,00 (3/5)
			viscoso 20,00 (1/5)
Pato coscoroba	transparente 92,86 (26/28)	translúcido 85,71 (24/28)	liquido 10,71 (3/28)
	esbranquiçada 7,14 (2/28)	pouco opaco 14,28 (4/28)	pouco viscoso 64,28 (18/28)
			viscoso 25,00 (7/28)
Papagaio verdadeiro	transparente 100,00 (3/3)	translúcido 100,00 (3/3)	pouco viscoso 100,00 (3/3)
Arara azul	transparente 100,00 (4/4)	translúcido 100,00 (4/4)	líquido 25,00 (1/4)
			pouco viscoso 75,00 (3/4)

Fonte: (FREDIANI, 2016)

a/t: amostras com a característica citada dentro de um total de amostras obtidas.

Tabela 22 - Características macroscópicas (cor, opacidade e viscosidade) das amostras de sêmen nas espécies G2 em que foi possível obtê-las

Espécie	Cor (a/t)	Opacidade % (a/t)	Viscosidade (a/t)
Maracanã	trasparente 100,00 (5/5)	translúcido 100,00 (5/5)	pouco viscoso (5/5)
Araçari de faixa	trasparente 100,00 (4/4)	translúcido 100,00 (4/4)	pouco viscoso 100,00 (4/4)
Araçari banana	trasparente 100,00 (4/4)	translúcido 100,00 (4/4)	pouco viscoso 50,00 (2/4) viscoso 50,00 (2/4)
Araçari poca	trasparente 100,00 (2/2)	translúcido 100,00 (2/2)	pouco viscoso 100,00 (2/2)
Tucano do bico verde	trasparente 100,00 (2/2)	translúcido 100,00 (2/2)	pouco viscoso 50,00 (1/2) viscoso 50,00 (1/2)
Tucano de peito branco	trasparente 100,00 (3/3)	translúcido 100,00 (3/3)	pouco viscoso 100,00 (3/3)
Jacutinga	trasparente 100,00 (1/1)	translúcido 100,00 (1/1)	liquido 100,00 (1/1)
Gavião real	trasparente 50,00 (1/2) esbranquiçada 50,00 (1/2)	translúcido 50,00 (1/2) pouco opaco 50,00 (1/2)	pouco viscoso 100,00 (2/2)
Gavião pega macaco	trasparente 100,00 (8/8)	translúcido 100,00 (8/8)	pouco viscoso 62,5 (5/8) viscoso 37,5 (3/8)
Mocho diabo	trasparente 100,00 (2/2)	translúcido 100,00 (2/2)	pouco viscoso 100,00 (2/2)
Suindara	trasparente 100,00 (5/5)	translúcido 100,00 (5/5)	pouco viscoso 80,00 (4/5) viscoso 20,00 (1/5)
Urubu rei	trasparente 62,5 (5/8) esbranquiçada 37,5 (3/8)	translúcido 62,5 (5/8) pouco opaco 37,5 (1/8)	viscoso 62,5 (5/8) muito viscoso 37,5 (3/8)

Fonte: (FREDIANI, 2016).

a/t: amostras com a característica citada dentro de um total de amostras obtidas.

Tabela 23 - Intervalos de valores de pH e volume e médias de volumes das amostras de sêmen obtidas através de eletroestimulação\* em cada espécie

Espécie	Volume (µl)	pH**
	Média (Intervalo)	Intervalo
Cisne do pescoço preto	40,45 (22,05-72,00)	8,0-8,7
Pato coscoroba	118,21 (4,47-181,65)	6,7-8,7
Papagaio verdadeiro	1,73 (0,40-4,10)	8,4-8,7
Arara azul	4,61 (2,15-10,90)	6,7-7,2
Maracanã	5,32 (1,10-5,10)	7,2-7,5
Araçari de faixa	5,78 (1,00-11,80)	7,0-8,4
Araçari banana	9,58 (2,20-17,20)	7,2***
Araçari poca	4,25 (0,90-8,10)	7,2***
Tucano do bico verde	26,87 (10,00-43,75)	7,2***
Tucano de peito branco	41,85 (15,20-68,50)	8,7-9,0
Jacutinga	11,55 ***	7***
Gavião real	4,98 (4,20-5,75)	7,0-7,2
Gavião pega macaco	2,96 (0,90-8,05)	6,4-8,4
Mocho diabo	2,40 (1,00-3,80)	7,5***
Suindara	1,60 (0,20-2,00)	7,0-8,1
Urubu rei	72,27 (8,40-138,60)	7,2-8,4

Fonte: (FREDIANI, 2016)

\*Não foi feita distinção entre Série 1 e Série 2 visto que não houve diferença estatística entre os volumes e valores de pH das mesmas.

\*\*Valores de pH obtidos de amostras não contaminadas.

\*\*\* Valor único.

Tabela 24 - Médias e intervalo entre os valores mínimos e máximos de concentração de espermatozoides (sptz/ml) das amostras seminais obtidas por eletroestimulação\* ao longo de um ano

Espécie	Concentração espermática (sptz.10 <sup>6</sup> /ml)	
	Média	Intervalo
Cisne do pescoço preto	16,84	1,26-32,34
Pato coscoroba	7,16	0,44-52,78
Papagaio verdadeiro	40,05	1,78-111,78
Arara azul	NA	NA
Maracanã	8,62	0,65-30,69
Araçari de faixa	4,37	0,53-12,91
Araçari banana	157,62	0,20-422,30
Araçari poca	25,79	0,70-50,87
Tucano do bico verde	0,2	**
Tucano de peito branco	1,2	0,94- 1,46
Jacutinga	NA	NA
Gavião real	3,13	**
Gavião pega macaco	65,35	0,68-291,57
Mocho diabo	13,4	6,23-20,58
Suindara	34,08	27, 30-40,86
Urubu rei	12,2	0,53-28,56

Fonte: (FREDIANI, 2016).

\*Não foi feita distinção entre Série 1 e Série 2 visto que não houve diferença estatística entre os valores de concentração espermática das mesmas.

\*\* Valor único.

NA: Não foi possível analisar.

## 6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos ao final deste estudo, confirmamos a viabilidade da eletroestimulação como um método de colheita de sêmen, ao menos nessas espécies em que foi testada. A eficiência da técnica provavelmente teve influência de fatores, tais quais: estímulos ambientais que nem sempre puderam ser os mais adequados a reprodução da espécie, presença ou não de fêmeas no recinto, pareamento dos animais com fêmeas, variação individual, etc. Alguns indivíduos do nosso grupo amostral, mesmo os que estavam com presença de fêmeas, tinham histórico de nem sequer um ovo fértil. Obviamente esse fato pode estar relacionado também às fêmeas. No entanto, um caso que nos sugere que o ambiente e o pareamento são importantes para a produção de espermática (e por isso, para o sucesso das colheitas de sêmen), foi o de um indivíduo de harpia, do qual só pudemos obter amostra com espermatozoides no inverno, após ele ter sido transferido para um recinto mais adequado à espécie, junto com a fêmea, com a qual passou a apresentar cópulas. Neste período, e mesmo após a colheita de sêmen, a fêmea ovipôs dois ovos. No entanto, até o momento que acompanhamos, esses ovos não resultaram em prole e a fertilidade não foi comprovada. Sendo assim, concluir sobre a eficiência da técnica de colheita de sêmen através da eletroestimulação envolve um estudo aprofundado caso a caso. Porém, constatar que ela possibilita a colheita de amostras seminais, da maneira como foi realizada, é possível.

Definimos que, exceto para Anseriformes, apenas a manipulação dorso abdominal e ordenha da cloaca não foram suficientes para obter amostras de sêmen dos indivíduos de nosso grupo amostral, que não estavam condicionados à massagem, e que, no entanto, a eletroestimulação proporcionou tal obtenção. Isso reforça as vantagens da eletroestimulação sobre a massagem dorso abdominal em aves silvestres, por não exigir condicionamento prévio dos animais, endossando sua praticidade de execução e provável aplicação bem sucedida inclusive em animais de vida livre. Em cisnes do pescoço preto e pato coscoroba obtivemos um sucesso estatisticamente equivalente nas colheitas de sêmen Pré-Estimulação, Série 1 e Série 2, no que diz respeito à amostras com espermatozoides e qualidade seminal. Essas espécies possuem falo, e a exposição deste órgão, que era realizada previamente a introdução da probe do eletroestimulador, exigia uma maior manipulação da região cloacal. Este fato pode ter levado a liberação do sêmen contido nos ductos deferentes destes indivíduos. Ainda assim, para alguns indivíduos desta ordem, a manipulação Pré-Estimulação não resultou em

nenhuma amostra seminal. Ademais, na ordem dos Galiformes, que também possuem falo e passaram por manipulação semelhante, não houve ocorrência de amostras pré-estímulo. Entretanto, o sucesso geral (Pré-Estimulação, Série 1, Série 2) de colheita de sêmen dos machos que compunham tal ordem foi quase nulo, podendo estar mais relacionado de fato a características individuais. Para as demais ordens, verificamos uma eficiência estatisticamente igual da obtenção de amostras e da qualidade seminal entre as Séries 1 e 2.

No que diz respeito à contaminação das amostras, também não houve diferença entre as séries de estímulos, concluindo-se assim que podemos utilizar qualquer uma das duas. A contaminação é uma das grandes críticas ao uso da eletroestimulação na colheita de sêmen, relatada como uma das causas do abandono da técnica. Fischer et al. (2014) descrevem a ocorrência de quase 40% (13 de 32 amostras) de amostras contaminadas em ararinhas azuis (*Cyanopsitta spixii*), utilizando um protocolo com dois a seis impulsos de 2,4 a 4,8V, em no máximo três séries de repetições. Em nosso protocolo, na ordem dos Psitacídeos a ocorrência de contaminação de amostras não ultrapassou 29%. Acreditamos que o manejo previamente realizado às tentativas de colheita foi fundamental para reduzir tal problema. Os animais eram mantidos em jejum alimentar e hídrico, horas antes da eletroestimulação, sendo o tempo de jejum adequado a cada espécie. Além disso, os procedimentos de captura dos animais no recinto e contenção física foram realizados por estagiários e funcionário treinados e habilitados para tal, de maneira a minimizar efeitos estressores. Ou seja, realizamos todos os procedimentos de forma rápida, em ambiente silencioso, tranquilo e aclimatado com uso de aquecedor ou ar condicionado. Discriminamos as contaminações de amostra sempre que elas ocorreram, mas no momento da colheita muitas vezes pudemos diminuir o grau de contaminação no material colhido, evitando a região em que fezes, urina ou sangue estavam. Por isso, é possível que tenha havido um efeito bem variável destes contaminantes na qualidade espermática, algo que, infelizmente, não pudemos mensurar. De qualquer maneira, com esses cuidados prévios à eletroestimulação, e com o uso de tensões mais baixas do que as relatadas na literatura e probes adequadas ao tamanho das cloacas, inseridas de modo a estimular mais diretamente os nervos envolvidos na ejaculação, provamos ser possível obter uma maior parcela de amostras isentas de contaminação. Conclusivamente, também no aspecto de contaminação não houve diferença entre as séries de estímulos, podendo-se optar por qualquer uma das duas.

A ocorrência de dor ou desconforto em resposta aos estímulos elétricos utilizados foi uma das nossas grandes preocupações no delineamento do projeto, já que optamos por não

usar sedação ou anestesia dos animais por acreditarmos que tal administração de fármacos poderia trazer mais riscos aos mesmos do que a própria estimulação elétrica. Ademais, buscamos utilizar tensões elétricas iguais ou menores às já citadas nos últimos trabalhos em psitacídeos que também não utilizaram sedação, e não relataram dor apresentada pelas aves (LIERZ et al., 2013; FISCHER et al., 2014). Em nosso estudo, vimos que, para a maioria das espécies, houve uma porcentagem baixa de manifestações de vocalização e agitação, o que nos leva a considerar este protocolo de eletroestimulação passível de ser realizado sem a utilização de sedativos ou anestésicos. No entanto, pelo fato de ambas as séries terem resultado em amostras seminais de características bastante parecidas e por haver um maior número de manifestações de agitação e vocalização para as tensões de 3 e 4 volts, sugerimos que se utilize tensões mais baixas a essas nos protocolos de colheita de sêmen, visando evitar o desconforto ou dor nos indivíduos. Lembrando também que um manejo de contenção física adequado, com a utilização de tubos, malhas ou colchas dependendo da espécie, cobrindo-se sempre os olhos dos indivíduos e mantendo um ambiente tranquilo, são essenciais para minimizar o estresse, que pode ser responsável por desconforto e pânico e levar à agitação e vocalização. Como tivemos bastante atenção a tais medidas e registramos as manifestações das reações dos indivíduos no exato momento em que aplicávamos as tensões elétricas, estamos seguros em relacioná-las.

A observação de ciclos reprodutivos que ocorrem em muitas espécies de aves, as quais possuem momentos específicos do ano para acasalar-se, copular e gerar prole (UBUKA; BENTLEY, 2011) bem como as variações sazonais no tamanho e constituição dos testículos de algumas espécies de aves (DEVICHE et al., 2011) levam a crer que a produção espermática tende a ser sazonal para a maioria das espécies, e por isso, para cada espécie há um melhor momento para realizarmos a colheita de sêmen. Com base em nossos resultados, consideramos que para a maioria das espécies relacionadas neste estudo isso também ocorre. No entanto, pesquisas futuras, com menor intervalo de tempo entre as colheitas, por exemplo, uma vez ao mês, e com um número maior de indivíduos poderiam esclarecer melhor tal ciclicidade. De qualquer forma, essa primeira análise pode servir de base caso haja uma espécie de interesse a ser estudada.

A única hipótese a qual nossos estudos forneceram poucos indícios para suportar foi a última, a respeito das características sexuais secundárias. Apoiamos esta hipótese nas observações de avicultura comercial, nas quais machos reprodutivamente ativos apresentam coloração de cloaca mais forte (rosa escura, hiperêmica), cloacas mais edemaciadas. E

também nas observações de espécies de aves com dimorfismo sexual, nas quais, no período de acasalamento, os machos apresentam características sexuais secundárias mais desenvolvidas (MOLLER et al., 1994). Em nosso estudo, apenas o falo (ou hemipênis) de animais que o possuem foi levado em consideração. Como já foi explicada, a maioria dos machos nos quais testamos a técnica de colheita de sêmen não estava pareada. Alguns nem mesmo tinham histórico de ovos férteis e nem apresentavam comportamento de cópula. Além disso, para alguns indivíduos, como os da ordem dos Anseriformes, essas informações nem sempre eram possíveis de obter, já que estes animais vivem em um grande lago, o que dificulta que se acompanhe com precisão seu comportamento sexual. Aliás, era um dos nossos objetivos estudar os efeitos da condição de pareado/não pareado e com/sem histórico reprodutivo ou comportamento sexual na qualidade seminal. Porém, não conseguimos grupos antagônicos com número de indivíduos suficiente para realizar esta avaliação. Sabemos que os comportamentos de acasalamento e cópula dependem sobremaneira de um ambiente hormonal apropriado, e que este ambiente está relacionado com as variações climáticas (luz, temperatura, umidade), ambientais (disponibilidade de material e local de ninho, local de acasalamento), da disponibilidade de alimentos e da presença de parceiros, e densidade populacional adequada. Lembrando ainda que cada espécie tem suas exigências estimulatórias, e inúmeros rituais de acasalamento podem ser relatados em vida livre. Em ambiente de cativeiro, muitas vezes não há a possibilidade de prover todos esses estímulos aos animais, e por isso, o desencadeamento da reprodução natural fica comprometida. Isso pode ser uma razão pela qual não haja uma mudança tão nítida nas características sexuais secundárias. Outra explanação seria a de que essas características que escolhemos talvez não sejam as mais apropriadas para essa análise.

Quanto a qualidade das amostras seminais obtidas, por falta de parâmetros registrados em literatura para as espécies em questão, pouco podemos especular. O intuito desta parte da pesquisa foi relatar, de maneira descritiva, algumas das características seminais encontradas para auxiliar a esboçar os parâmetros seminais das espécies em questão, principalmente daquelas que pouco ou nada se tem registrado em literatura, como as da ordem dos Piciformes. As tentativas de colheita de sêmen em Anseriformes realizadas por Samour et al. (1985) resultaram em um volume médio de 300  $\mu$ l para pato almiscarado, e 150  $\mu$ l tanto para marreco Mallard quanto para ganso do Havaí. As concentrações encontradas por Samour et al. (1985) foram, respectivamente,  $7500 \cdot 10^6$  spz/ml,  $6800 \cdot 10^6$  spz/ml e  $6500 \cdot 10^6$  spz/ml. Em nosso estudo, encontramos o volume médio de 40,45  $\mu$ l para cisne de pescoço preto e

118,21  $\mu\text{l}$  para pato coscoroba, e as concentrações médias foram, respectivamente,  $16,84 \cdot 10^6$  sptz/ml e  $7,16 \cdot 10^6$  sptz/ml, sendo então bem inferiores as alcançadas por Samour. Lierz et al. (2013) relataram o volume médio de  $7,4 \mu\text{l}$  (e variação de 3 a  $19,5 \mu\text{l}$ ) e concentração média de  $70 \cdot 10^6$  sptz/ml para o grupo de diversas espécies de araras em que a eletroestimulação foi testada. Em nossas araras azuis obtivemos um volume médio de  $4,61 \mu\text{l}$  (e variação de  $2,15$  a  $10,90 \mu\text{l}$ ), porém a concentração provavelmente era muito baixa, impossibilitando a avaliação. Para diversas espécies de papagaios, neste mesmo estudo (LIERZ et al., 2013) obteve-se o volume médio de  $8,5 \mu\text{l}$  (de  $2,8$  a  $18,4 \mu\text{l}$ ) e concentração média de cerca de  $77 \cdot 10^6$  sptz/ml. Para os papagaios verdadeiros de nosso projeto, o volume médio encontrado foi de  $1,73 \mu\text{l}$  (de  $0,40$  a  $4,10 \mu\text{l}$ ) e concentração média de  $40 \cdot 10^6$  sptz/ml. Para Psitaciformes então, a comparação com dados da literatura foi menos discrepante do que para Anseriformes, lembrando apenas que as espécies estudadas em nosso trabalho não são as mesmas dos trabalhos utilizados nas comparações.

Para sabermos se a qualidade seminal é suficientemente boa para que estas amostras sejam utilizadas em inseminações artificiais ou para criopreservação, necessitaríamos realizar um estudo mais aprofundado, conduzindo essas biotécnicas e verificando o sucesso alcançado. Pelo fato de termos trabalhado com um número de indivíduos por espécie, em sua maioria, muito pequeno, as análises estatísticas foram comprometidas. Além disso, o volume das amostras, para a maioria das espécies era muito reduzido, dificultando também as análises das características microscópicas. Quando diluíamos as amostras em BWW e FS para permitir as análises propostas, isso geralmente levava a amostras de concentração de espermatozoides extremamente baixa. Devido a esse fato, a contagem de células na concentração foi bastante complicada. Da mesma maneira, encontramos obstáculos na avaliação da integridade de membrana através da técnica de esfregaço em Eosina e Nigrosina, bem como a avaliação da morfologia em câmara úmida, pois muitas vezes não encontrávamos células a serem contadas, ou então encontrávamos muito poucas, o que nos impediu de obter valores confiáveis para analisar estatisticamente essas características.

## 7 CONCLUSÃO

Concluimos que a eletroestimulação é de fato um método adequado de colheita de sêmen nas espécies em que foi testada, e que provavelmente este protocolo possa ser extrapolado, com os ajustes de tensões sugeridos e demais ajustes que se julgarem necessários (tamanho de probe, número de repetição de séries) para demais espécies de aves, ao menos nas ordens investigadas nessa pesquisa. Por isso, vemos a eletroestimulação como uma importante ferramenta dentro de protocolos de reprodução assistida, possibilitando as pesquisas futuras, tanto em populações *ex situ* quanto *in situ*, e a utilização do sêmen em biotécnicas como a inseminação artificial e a criopreservação de germoplasma.

Apesar das dificuldades relatadas e de infelizmente não termos obtido todas as respostas almejadas no momento do delineamento de nosso estudo, acreditamos termos trazido informações muito preciosas a respeito da aplicabilidade da eletroestimulação em aves, bem como acerca das características seminais que podem ser encontradas nessas espécies. Temos o intuito, com isso, de inspirar e dar suporte a futuras pesquisas para dar continuidade ao desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, tão necessárias a conservação e manutenção das espécies.

## REFERÊNCIAS

- BARRIERE, L.; MELARA, R.; LAZO, F. Prototipo de electro-eyeculador para aves em peligro de extinción em El Salvador. **El Salvador Ciencia & Tecnologia**, II Etapa, v. 19, n. 26, p. 12- 17, 2014.
- BETZEN, K. M. **Techniques for electrical semen collection from birds**. 1985. 94 p. Tese (Doutorado) - Faculty of the Graduate College of the Oklahoma State University, 1985. Disponível em: <<https://shareok.org/handle/11244/15898>>. Acesso em:12 jul. 2016.
- BLANCO, J. M.; WILDT, D. E.; HÖFLE, U.; VOELKER, W.; DONOGHUE, A. M. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. **Theriogenology**, v. 71, p. 200-213, 2009.
- BIGGERS, J. D.; WHITTEN, W. K.; WHITTINGHAM, D. G. The culture of mouse embryos in vitro. In: DANIEL, J. C. **Methods in mammalian embryology**. San Francisco, CA: Freeman and Co, 1971. p. 86-116.
- BIRD LIFE INTERNATIONAL. **Espécies brasileiras globalmente ameaçadas de extinção**. 2014. Disponível em: <<http://savebrasil.org.br/wp/especies-brasileiras-globalmente-ameacadas-de-extincao>>. Acesso em: 31 jan. 2015.
- BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. **Poultry Science**, v. 14, n. 4, p. 251-253, 1935.
- BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v.16, p. 19-24, 1937.
- CAPARROZ, R.; GUEDES, N. M. R.; BIANCHI, C. A.; WAJNTAL, A. Analysis of the genetic variability and breeding behavior of wild populations of two Macaw species (Psittaciformes: Aves) by DNA fingerprinting. **Ararajuba**, v. 9, p. 43-49, 2001.
- CHELMONSKA, B.; JERYSZ, A.; LUKASZEWICZ, E; KOWALCZYK, A.; MALECK, I. Semen collection from japanese quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, n. 1, p. 19-24, 2008.
- DEVICHE, P.; HURLEY, L. L.; FOKIDIS, H. B. Avian testicular structure, function, and regulation. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. L. **Hormonal and reproduction of vertebrates**. San Diego, CA: Elsevier Inc., 2011. v. 4, p. 30–46.
- FISCHER, D.; NEUMANN, D.; PURCHASE, C.; BOUTS, T.; MEINECKE-TILLMANN, S.; WEHREND, A.; LIERZ, M. The Use of semen evaluation and assisted reproduction in spix's macaws in terms of species conservation. **Zoo Biology**, v. 999, p. 1-11, 2014.
- GEE, G. F.; TEMPLE, S. A.; WATSON, P. F. (Ed.). **Artificial insemination for breeding non-domestic birds**. London: Academic Press, 1978. v. 43, p. 51-72.
- HUMPHREYS, P. N. Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, p. 327-336, 1972.
- LIERZ, M.; REINSCHMIDT, M.; MULLER, H.; WINK, M.; NEUMANN, D. A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). **Scientific Reports**, v. 3, n. 2066. p. 1–8, 2013.

- MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B.; LINDSAYA, D. R. Methods for collecting semen from the male emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Australian Society of Animal Production**, v. 20, p. 434, 1994.
- MOLLER, A. P. Directional selection on directional asymmetry: testes size and secondary sexual characters in birds. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 258, p. 144–151, 1994.
- MOORE, C. R.; GALLAGHER, T. F. Seminal vesicle and prostate function as a testes hormone indicator: the electric ejaculation test. **American Journal of Anatomy**, v. 45, p. 39-69. 1930.
- PIZZARI, T.; BIRKHEAD, T. R. Female feral fowl eject sperm of subdominant males. **Nature**, v. 405, p. 787–789, 2000.
- QAMAR, A. Y.; KHAN, A. U.; JAMIL, A.; ABUBAKAR, M. Biotechnology and animal. In: ABUBAKAR, M.; SAEED, A., KIL, O. The role of biotechnology in improvement of livestock. Berlin:Springer, 2015. P 3-4.
- QUAY, W. B. Cloacal lavage of sperm: a technique for evaluation of reproductive activity. **North American Bird Bander**, v. 9, p. 2–7, 1984.
- RYBNIK, P. K.; HORBANCZUK, J. O.; NARANOWICZ, H.; LUKASZEWICZ, E.; MALECKI, I. A. Semen collection in the ostrich (*Struthio camelus*) using a dummy or a teaser female. **British Poultry Science**, v. 48, n. 5, p. 635-643, 2007.
- SAINT JALME, M.; GAUCHER, P.; PAILLAT, P. Artificial insemination in Houbara bustards (*Chlamydotisundulata*): influence of the number of spermatozoa and insemination frequency on fertility and ability to hatch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 93-103, 1994.
- SAINT JALME, M. Endangered avian species propagation: an overview of functions and techniques. International congress on bird reproduction, Special Issue. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 3, p. 87–203, 2002.
- SAMOUR, H. J.; SPRATT, D. M. J.; HUTTON, R. E.; JONES, D. M. Studies on semen collection in waterfowl by electrical stimulation. **British Veterinary Journal**, v. 141, n. 3, p. 265–268, 1985.
- SAMOUR, J. H. Semen collection, spermatozoa cryopreservation, and artificial insemination in nondomestic birds. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 18, n. 4, p. 219-223, 2004.
- SILVEIRA, L. F.; RODA, S. A.; SANTOS, A. M. M.; SOARES, E. S.; BIANCHI, C. A. **Plano de ação para a conservação do Mutum-de-Alagoas (Mitu mitu = Pauxi mitu)**. Brasília: ICMBio, 2008. (Série Espécies Ameaçadas 7).
- UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. Neuroendocrine control of reproduction in birds. In: NORRIS, D. O.; LOPEZ, K. L. **Hormonal and reproduction of vertebrates**. San Diego, CA: Elsevier Inc., 2011. v. 4, p. 9–14.
- WATANABE, M. An Improved Technique of the Artificial Insemination in Ducks. **Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry**, v.1, p.363-371, 1957

## Anexo A - Ficha de tentativa de colheita de semen por eletroestimulação

Ordem									
Espécie		Identificação	Idade (anos)	Comportamento Reprodutivo		Histórico de Filhotes			
MÊS ANO						Data: / /			
Dlong. cloaca	Dvert. cloaca	Cor cloaca	Probe	Observações falo		Observações de colheita			
Pré-estimulação	Série 1	Série 2	Volume total	Cor	Opacidade	Viscosidade			
	0,6:	1:							
	1,2:	2:	pH	Diluição BWW	Motilidade	Progressiva	Diluição FS		
	1,8:	3:							
	2,4:	4:	Integridade membrana		Concentração				
Amostra (V)	Amostra (V)	Amostra (V)							
			Morfologia						
Sujidade	Sujidade	Sujidade	Normais (%)	Cauda	Cabeça				
				Enrol.:	Pequena:	Grande:			
Sptz (S/N)	Sptz (S/N)	Sptz (S/N)	Def. Implant. (%)	Enrol. Cab.:	Redonda Peq.:	Redonda Gde.:			
				Dobrada:	Alongada:	Disforme:			
Observações			P. Intermediária	Dupla:	Solta Normal:	Solta Anormal:			
			Dobrada:	Gota:	Def.Membrana:	Gota:			
			Deformidade:			Dupla:			
			Gota:						
					Total:			Total:	
					Total:	<b>Total contados</b>	<b>Defeitos primários:</b>		
		Total:			<b>Defeitos secundários:</b>				

Fonte: (FREDIANI, 2016)

Dlong. cloaca: diâmetro longitudinal da cloaca; Dvert. cloaca: diâmetro vertical da cloaca; Amostra (V): volume de amostra; Sptz (S/N): presença (SIM) ou ausência (NÃO) de espermatozoides; Def. Implant.: defeitos de implantação de pescoço em cabeça de espermatozoide; P. intermediária: peça intermediária; Enrol.: enrolada; Enrol. Cab.: enrolada na cabeça; Redonda peq.: redonda pequena; Redonda gde.: redonda grande; Def. membrana: deformidade de membrana plasmática.