ANA KARINA DA SILVA CAVALCANTE

Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados

São Paulo
2006

ANA KARINA DA SILVA CAVALCANTE

Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe

São Paulo

2006

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.1662
FMVZ

Cavalcante, Ana Karina da Silva
Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados / Ana Karina da Silva Cavalcante. -- São Paulo: A. K. D. Cavalcante, 2006.
98 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe.

1. Perdizes. 2. Colheita de semên animal. 3. Inseminação artificial animal. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAVALCANTE, Ana Karina da Silva

Título: Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus sobrinhos Victor e
Walter Viterbo, para que eles
nunca deixem de lutar por um
sonho, por mais difícil que pareça.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar tudo, principalmente momentos difíceis, com os quais eu procuro aprender a ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais Juvencio e Maria Aparecida, que são tudo o que eu queria ser, por me darem a vida, por me proporcionam tudo, como se eu fosse a melhor filha do mundo, mesmo que muitas vezes, eu não fizesse por merecer. Por servirem de modelo para que eu sempre andasse pelos caminhos da verdade e da retidão.

Ao meu irmão Walter, por me ajudar de todas as formas que um ser humano pode ajudar a outro e me ensinar o verdadeiro significado da palavra irmão, que sempre me proporcionou amizade, carinho e amor.

Aos meus sobrinhos Victor e Walter, por darem sentido a minha existência. Pelo carinho e felicidade de ver seus olhinhos brilhando a cada volta minha.

Aos meus avós e antepassados, por olharem por mim, mesmo que eu não consiga enxergá-los.

Aos meus amores Jairo, Thiago e Arthur, pelo incentivo e compreensão nos momentos em que estive ausente, preparando este estudo. Por me proporcionarem momentos felizes e permitirem esse adorável convívio familiar.

À Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe e ao Dr. Renato Campanarut Barnabe, meus mais sinceros e profundos agradecimentos, não só pela orientação, mas por me receberem como uma filha, sempre com palavras de carinho, confiança, respeito e afeto.

Ao Professor Humberto Tonhati, por acreditar no meu projeto de pesquisa e encarar o desafio de pô-lo em prática. Por disponibilizar todos os animais, materiais, equipamentos e funcionários necessários para a realização do experimento.

À Professora e amiga Sandra Aidar de Queiroz, pela amizade, confiança e encorajamento, sem os quais esta etapa seria impossível, e pelos quais não seria possível retribuir apenas com esta dedicatória. Jamais esquecerei nossas reuniões do D.I.V.A.!!!

À minha amiga/irmã Paola Góes, por dividir comigo os momentos difíceis e somar os momentos legais. Enfrentamos momentos complicados. Saímos da nossa terra natal, encontramos uma segunda mãe, fizemos nossas pesquisas, passamos por uma defesa de mestrado e agora a defesa do meu doutorado nós leva a caminhos diferentes. Mas o que posso dizer é que foi muito bom escrever uma parte da minha história acadêmica com você.

À minha amiga/irmã Ana Paula Mantovani, Tita, no começo não fui muito com a cara dela, porém o acaso me fez enxergar o quanto eu estava errada ao seu respeito. Morar com ela de segunda a quinta foi uma experiência bem diferente, mas muito interessante. Obrigada por trazer a melhor coxinha catupiry de Sorocaba, por me emprestar sua mãe de vez em quando e por garantir meu almoço de segunda-feira com o estrogonofe dela.

À minha amiga/irmã Mabel Cordeiro, que apesar do sobrenome, trabalha com cabras!! Posso falar que o acaso nos uniu, justamente na hora que mais precisava encontrar alguém com caráter e honestidade para morar em Jaboticabal, ela apareceu e me proporcionou a melhor estadia que eu poderia ter na fase experimental desse trabalho.

À amiga Luciana Keiko Hatamoto, por toda a ajuda, por estar sempre disposta e disponível para tirar minhas dúvidas e me aconselhar. Por confiar em mim e por sempre encontrar o lado bom dos acontecimentos.

Ao amigo Marcilio Nichi, cuja competência está estampada nos olhos puxados, no jeito calado, que só expõe uma opinião quando tem certeza do que está falando, e que por isso tem suas considerações respeitadas no nosso meio acadêmico. Que tanto me ajudou. Quando o Oceano Atlântico resolveu afastar ele do VRA, eu pensei

que não poderia mais contar com suas contribuições, mas ele provou que essa distância não significava nada para uma pessoa competente e de boa vontade.

Às amigas Patrícia Tholon, Nádia Dibiasi e Letícia Purga, pelo renascimento do D.I.V.A e por me ensinarem a sobreviver em Jaboticabal, tomando sorvete da Ice by Nice e comendo yakisoba do Rio Mar!!

À “minha” estagiária predileta Aline Tavian, por me mostrar o quanto podemos fazer para proporcionar bem estar aos animais, por sua responsabilidade, dedicação e companheirismo, as principais qualidades que um estagiário deve ter, além disso, se tornou uma grande amiga.

Aos amigos que fiz na vida acadêmica, Thais, Lílian, Samira, Regina, Thiesa, Paulo, Graciana, Andréa, Sobrinho, Nélcio, Rogério, Viviane, Carla, Everton, Marcelo, Ricardo, Érika, Priscila, Tatiana.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. Mário Binelli, Profa. Dra. Mayra Helena Ortiz D’Avila Assumpção, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, Profa. Prof. Dr. Wilson Gonçalves Vianna.

À minha querida Dona Sívila. Por sempre cuidar de mim e das minhas plantinhas, quando eu viajava para realizar a parte experimental deste trabalho.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Reprodução Animal Harumi, Alice, Miguel, Maria Amélia, Jocimar, Irailton, Luiz, Belau.

Aos professores e funcionários da UNESP/Jaboticabal: Profa. Isabel Bolelli, Paulo, Prof. Wilter, Prof. Joaquim Manzano, Prof. César Esper, Prof. José Maurício Barbanto Duarte, Antônio Carlos, Gilberto, Angélica, Sr. Orandir, Roberta, Isabel.

Aos demais os funcionários da FMVZ/USP e FCAV/UNESP/Jaboticabal.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), por proporcionar uma bolsa de doutorado, sem qual nada disso seria possível.

Às perdizes, que involuntariamente entraram no meu experimento e que colaboraram com células espermáticas e óvulos. Posso dizer que sem elas, nada disso seria possível mesmo.

Agradeço, enfim, a todos que ajudaram na concretização desse sonho através de amizade, paciência, carinho, compreensão, palavras de incentivo e coragem. Para todas estas pessoas, uma simples dedicatória é injusta. Mais injusto ainda para as pessoas que eu esqueci de citar. Mas cada uma sabe que meu agradecimento não se dá em forma de palavras e sim de atitudes. Muito obrigada.

EPÍGRAFE

Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina
(Cora Coralina)

RESUMO

CAVALCANTE, A. K. S. **Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro:** comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados. [Reproductive parameters of captive male partridge (*Rhynchotus rufescens*): insemination versus natural service]. 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*) é um tinamídeo com amplos músculos peitorais muito apreciados por mercados especializados. No entanto, a produção em larga escala é inexpressiva, podendo ser melhorada através da inseminação artificial (IA). Sendo assim, o presente experimento teve como objetivos padronizar a coleta de sêmen, o teste hipo-osmótico, testar diferentes diluidores, tempos de refrigeração e doses inseminantes. Amostras seminais de 100 animais, pertencentes a FCAV/UNESP/Jaboticabal, foram empregadas na descrição do volume, pH, motilidade, vigor, concentração e alterações morfológicas. As coletas de sêmen foram realizadas em 2 ciclos. No primeiro ciclo foram realizadas a padronização da técnica de coleta de sêmen e a determinação do melhor meio hipo-osmótico, por meio de oito soluções. No segundo ciclo de coletas aplicou-se as técnicas já padronizadas; descreveu-se a motilidade e vigor espermático de amostras seminais diluídas em meios para sêmen de peru, TCM 199, TQC e solução fisiológica, refrigeradas por até 48h; além de terem sido realizadas IA em 128 fêmeas utilizando sêmen de 32 machos, os animais foram agrupados em quintetos (1 macho:4 fêmeas) no início do ciclo reprodutivo de 2004-2005. Metade dos quintetos foi mantida no sistema de monta natural e empregada como grupo controle (GC). A outra metade foi mantida em quintetos por apenas 2 meses. Em seguida, retirou-se os machos dos boxes das fêmeas, para formar os grupos inseminados (GI), cada um com uma dose inseminante de 10, 20, 30 ou 40×10^6 sptz. No primeiro ciclo

padronizou-se o método de coleta, no segundo empregou-se a técnica padronizada e os valores encontrados para a média e erro padrão da média de 231 amostras para volume, aspecto, motilidade, vigor, pH e concentração espermática foram: $23,59 \pm 1,30 \mu\text{l}$; $1,81 \pm 0,03$; $73,06 \pm 1,41\%$; $3,06 \pm 0,08$; 8 ± 0 ; $5,25 \pm 0,74 \times 10^9 \text{ sptz/ml}$; respectivamente. A motilidade correlacionou positivamente com a porcentagem média de células normais ($r=0,4$; $p<0,0001$) e negativamente com as porcentagens de defeitos totais e de cabeça solta ($r=-0,4$; $p<0,0001$). A porcentagem de caudas enroladas nas soluções hipo-osmóticas testadas variaram de $73,25 \pm 3,3$ a $84,52 \pm 2,21\%$. A solução hipo-osmótica de 100mOsm demonstrou ser adequada e foi empregada em 81 amostras, resultando em $82,0 \pm 1,38\%$ de espermatozóides com membrana íntegra, gerando uma correlação positiva ($r=0,4$; $p<0,0002$) entre esta variável e a motilidade. As amostras seminais diluídas em solução fisiológica não apresentaram motilidade e vigor após refrigeração, diferente das demais. As amostras refrigeradas por 24 e 48h em TCM 199 apresentaram melhores resultados de motilidade e vigor do que as que permaneceram no diluidor para sêmen de peru e TQC. Não foi possível observar diferenças estatísticas significantes entre os resultados da comparação dos índices reprodutivos entre GI e GC, porém os valores médios de ovos férteis obtidos no sistema de monta natural ($2,22 \pm 0,29$) foram menores do que os grupos inseminados com 30 ($4,44 \pm 1,81$) e $40 \times 10^6 \text{ sptz/dose}$ inseminante ($3,65 \pm 1,66$). Os resultados do presente experimento permitiram concluir que é possível a coleta e avaliação de sêmen de perdizes para o posterior emprego de biotecnologias tais como a inseminação artificial, sendo que esta pode ser utilizada a curtíssimo prazo, com a finalidade de aumentar a produção e melhorar o manejo genético deste animal.

Palavras-chaves: Perdizes. Colheita de sêmen animal. Inseminação artificial animal.

ABSTRACT

CAVALCANTE, A. K. S. **Reproductive parameters of captive male partridge (*Rhynchotus rufescens*):** artificial insemination versus natural service. [Parâmetros reprodutivos de perdizes machos (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro: comparação entre os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados]. 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The partridge (*Rhynchotus rufescens*) belongs to the tinamidae family and possesses breast muscles which are quite appreciated in high cuisine. However, there is an insignificant large scale production, which could be improved using the artificial insemination (AI). The present experiment aimed to standardize semen collection and the hypoosmotic swelling test and to test dilutors, refrigeration times and insemination doses in partridges. Semen samples of 100 animals, belonging to the FCAV/UNESP/Jaboticabal, were used to describe the volume, pH, motility, vigor, concentration and morphologic alterations. Semen collections were performed in 2 stages. The first stage consisted of standardizing the technique of semen collection and of verifying the most adequate hypoosmotic medium (8 different osmolarities). In the second stage, the standardized techniques were applied; motility and vigor were evaluated in samples diluted in turkey semen extender, TCM 199, TQC and physiologic saline solution, refrigerated until 48 hours. Still in the second stage, 128 females and 32 males were allocated in groups of 5 (1 male:4 females) in the beginning of 2004-2005 reproductive season. Half of the quintets were bred using natural service (control group - CG); the other half was kept as quintets for 2 months, after which males were removed and allocated in quartets with no physical contact with the females. The females of this group were then inseminated (inseminated group – IG) with 10, 20, 30 e 40×10^6 sptz/ insemination dose. In the first experimental stage, 231 samples were evaluated for volume, aspect, motility, vigor, pH e sperm

concentration with values averaging $23.59 \pm 1.30 \mu\text{l}$, 1.81 ± 0.03 , $73.06 \pm 1.41\%$, 3.06 ± 0.08 ; 8 ± 0 ; $5.25 \pm 0.74 \times 10^9 \text{ sptz/ml}$, respectively. Motility was positively correlated with percentage of normal cells ($r=0.4$; $p<0.0001$) and negatively correlated with the percentages of total sperm defects ($r=-0.4$; $p<0.0001$) and detached head ($r=-0.4$; $p<0.0001$). Percentage of swollen tails in the hipoosmotic solutions ranged from 73.25 ± 3.3 a $84.52 \pm 2.21\%$. The solution of 100mOsm was the most adequate, being used in 81 samples, which averaged $82.0 \pm 1.38\%$ of sperm cells with intact membrane. A positive correlation ($r=0.4$; $p<0.0002$) was found between the percentage of cells with intact membrane and motility. Neither motility or vigor were observed in samples diluted in physiologic saline solution, different for the other tested solutions. After both 24 and 48 hours of refrigeration, TCM 199 showed the highest results of motility and vigor when compared to the turkey extender and the TQC. No differences on the general reproductive indexes were found between animals from IG or CG. However, mean values of fertile eggs from CG (2.22 ± 0.29) were lower ($p<0.05$) than groups inseminated with 30 (4.44 ± 1.81) and $40 \times 10^6 \text{ sptz/insemination dose}$ (3.65 ± 1.66). Results allowed to infer that the techniques of semen collection and evaluation in partridges standardized in the present experiment may be used in a short term period for reproductive technologies such as artificial insemination, which could increase the production and improve the genetic management of these animals.

Keys word: Partridges. Animal semen collection. Animal artificial insemination.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	-	Fórmula das soluções de formol salino e iso-osmótica ..	96
Apêndice B - Figura 1	-	Início da coleta de sêmen.....	97
Apêndice B - Figura 2	-	Coleta de sêmen	97
Apêndice B - Figura 3	-	Término da coleta de sêmen	97
Apêndice B - Figura 4	-	Falo (porção fixa)	97
Apêndice B - Figura 5	-	Falo (porção eversível)	97
Apêndice C - Figura 6	-	Papilas dos ductos deferentes de perdizes	98
Apêndice C - Figura 7	-	Detalhe das papilas do ducto deferente de perdizes	98
Apêndice C - Figura 8	-	Fotomicrografia de espermatozóide com cabeça dobrada (1000x)	98
Apêndice C - Figura 9	-	Fotomicrografia de espermatozóide com cauda dobrada (1000x)	98
Apêndice C - Figura 10	-	Fotomicrografia de peça intermediária com debris celulares (1000x)	98
Apêndice C - Figura 11	-	Fotomicrografia do padrão de enrolamento de cauda em solução de 300mOsm (400x)	98
Apêndice C - Figura 12	-	Fotomicrografia do padrão de enrolamento de cauda em solução de 100mOsm (400x)	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	- Média e erro padrão da média do volume, motilidade, vigor, pH e concentração espermática de ejaculados de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre outubro de 2003 e abril de 2004 - Jaboticabal - SP – 2003 – 2004.....	40
Tabela 1.2	- Média e erro padrão da média (EP) das alterações morfológicas de espermatozóides de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre outubro de 2003 e abril de 2004 - Jaboticabal - SP – 2003 – 2004.....	41
Tabela 1.3	- Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) do volume (n=231), aspecto (n=231), motilidade (n=229), vigor (n=229), pH e concentração espermática (n=198) de ejaculados de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 - Jaboticabal - SP – 2004, 2005.....	42
Tabela 1.4	- Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) das alterações da morfologia espermática de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 (n=202) - Jaboticabal - SP – 2004, 2005.....	43
Tabela 1.5	- Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) das alterações da morfologia espermática de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, agrupadas pelo local da alteração, amostras (n=202) obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 - Jaboticabal - SP – 2004, 2005.....	44
Tabela 2.1	- Média e erro padrão da porcentagem média de caudas enroladas de espermatozóides de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, submetidos á soluções com 100; 125; 175 e 300mOsm, amostras obtidas em janeiro de 2004 - Jaboticabal - SP – 2004.....	57
Tabela 2.2	- Média e erro padrão da porcentagem média de caudas enroladas de espermatozóides de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, submetidos á soluções com 60; 100; 200 e 300mOsm, amostras obtidas em abril de 2004 - Jaboticabal - SP – 2004.....	58
Tabela 2.3	- Média e erro padrão da porcentagem média de caudas enroladas de espermatozóides de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, submetidos á soluções com 50; 75; 100; 125 e 300mOsm, amostras coletadas em agosto de 2004 - Jaboticabal - SP – 2004.....	58

Tabela 2.4	- Média, erro padrão da média, valores mínimos, máximos, variância e coeficiente de variação da porcentagem de membrana íntegra, motilidade e vigor de células espermáticas de ejaculados (n=81) de perdizes (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 - Jaboticabal - SP – 2004, 2005.....	59
Tabela 3.1	- Variação da motilidade e vigor espermático de amostras seminais de perdizes (n= 20) diluídas em extensor comercial para sêmen de peru em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004...	69
Tabela 3.2	- Teste de probabilidades para os efeitos principais de tempo de refrigeração (0, 24 e 48 horas), dos meios diluidores (solução fisiológica, TCM 199, diluidor de peru e TQC), e da interação entre ambos (tempo*meios) sobre a motilidade e o vigor espermáticos de amostras seminais de perdizes (n= 48) - Jaboticabal - SP – 2004.....	70
Tabela 3.3	- Variação da motilidade espermática de amostras seminais de perdizes (n= 48) diluídas em solução fisiológica (controle), extensor comercial para sêmen de peru e em meios de cultura celular TCM199 e TQC em função do tempo, durante três observações num período de 48h, Jaboticabal - SP – 2004.....	70
Tabela 3.4	- Variação do vigor espermático de amostras seminais de perdizes (n= 48) diluídas em solução fisiológica (controle), extensor comercial para sêmen de peru e meios de cultivo celular TCM199 e TQC em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004...	70
Tabela 4.1	- Produção de ovos de fêmeas de perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro e empregadas em monta natural e inseminação artificial com diferentes doses de sêmen. Médias $\pm$ erro padrão da media (ovos por fêmea) de ovos totais, viáveis, férteis e eclodidos - Jaboticabal - SP – 2004-2005.....	87
Tabela 4.2	- Médias $\pm$ erro padrão da media (ovos por fêmea) das taxas de postura, aproveitamento, fertilidade, eclodibilidade e eclosão de fêmeas de perdiz (<i>Rhynchotus rufescens</i>) criadas em cativeiro e empregadas em monta natural e inseminação artificial com diferentes doses de sêmen - Jaboticabal - SP – 2004-2005.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ	Micro
$\pm$	Mais ou menos
cm	Centímetros
DP	Desvio padrão
EP	Erro padrão
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
h	Horas
JUV	Junção útero vaginal
Kg	Quilo
l	Litro
LH	Hormônio luteinizante
ml	Mililitro
mOsm	Mili osmol
°C	Graus Celsius
rpm	Rotações por minutos
sptz	Espermatozóides

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	22
------------------------------	-----------

CAPITULO 1 – COLETA DE SÊMEN

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	ANATOMIA MASCULINA DE AVES.....	27
2.2	SISTEMA GENITAL MASCULINO DE PERDIZ.....	28
2.3	ESPERMATOGÊNESE.....	28
2.4	COLETA DE SÊMEN.....	30
2.5	AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	31
3	HIPÓTESE.....	32
4	OBJETIVOS.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1	ANIMAIS E ALOJAMENTO.....	34
5.2	MANEJO.....	35
5.3	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN...	35
5.4	COLETA DE SÊMEN E DESCRIÇÃO DO ESPERMOGRAMA.....	37
5.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	37
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

6.1	PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN...	40
6.2	COLETA DE SÊMEN E DESCRIÇÃO DO ESPERMOGRAMA.....	41

CAPÍTULO 2 – TESTE HIPO-OSMÓTICO

1	INTRODUÇÃO	46
2	REVISÃO DE LITERATURA	47
2.1	COLETA E AVALIAÇÃO DE SÊMEN.....	47
2.2	FISIOLOGIA ESPERMÁTICA E TESTE HIPOSMÓTICO.....	48
2.2.1	Teste hipo-osmótico e Fertilidade	48
2.2.2	Teste Hipo-osmótico em Aves	49
3	HIPÓTESE	51
4	OBJETIVOS	52
5	MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1	ANIMAIS E ALOJAMENTO.....	53
5.2	PADRONIZAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO.....	53
5.3	APLICAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO.....	55
5.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	55
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
6.1	PADRONIZAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO.....	57
6.2	APLICAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTIC.....	59

CAPÍTULO 3 – DILUIÇÃO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

1	INTRODUÇÃO	62
2	REVISÃO DE LITERATURA	63
2.1	DILUIÇÃO E REFRIGERAÇÃO.....	63
3	HIPÓTESE	64
4	OBJETIVOS	65
5	MATERIAL E MÉTODOS	66
5.1	ANIMAIS, ALOJAMENTO E COLETA DE SÊMEN.....	66
5.2	AVALIAÇÃO, DILUIÇÃO E REFRIGERAÇÃO SÊMEN.....	66
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	67
5.4	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	68
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1	AVALIAÇÃO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN.....	69

CAPÍTULO 4 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

1	INTRODUÇÃO	74
2	REVISÃO DE LITERATURA	75
2.1	COLETA DE SÊMEN.....	75
2.2	ANATOMIA FEMININA.....	76
2.3	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	77
3	HIPÓTESE	79

4	OBJETIVOS.....	80
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	81
5.1	ANIMAIS E ALOJAMENTO.....	81
5.2	COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN.....	82
5.3	INTERVALO ENTRE INSEMINAÇÕES.....	82
5.4	DOSE INSEMINANTE.....	82
5.5	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	83
5.6	MANEJO DOS ANIMAIS E DOS OVOS.....	83
5.7	ÍNDICES REPRODUTIVOS.....	84
5.8	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	85
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
6.1	EXPERIMENTO – INTERVALO DE INSEMINAÇÃO.....	86
6.2	EXPERIMENTO – COMPARAÇÃO DA I. A. COM A MONTA NATURAL.	87
7	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICES.....	95

INTRODUÇÃO GERAL

A perdiz - ave sul-americana da superordem *Paleognathe* (ratitas), família *Tinamidae*, gênero *Rhynchotus* e espécie *Rhynchotus rufescens* -, classificada em 1815 por Temminck (MARTÍNEZ et al., 2000), é a maior *Tinamidae* campestre da fauna brasileira. Tem aproximadamente 37,5cm de altura, e geralmente as fêmeas são maiores que os machos (SICK, 1997).

Os tinamídeos podem ter tido um ancestral comum com os ratitas, na época do continente meridional – *Gondwana*, pois guardam semelhanças esqueléticas e cromossômicas com esse grupo-irmão (SICK, 1997).

A distribuição geográfica da espécie imprime, nos indivíduos alocados em cada região, peculiaridades suficientes para caracterizar quatro subespécies, a saber: *Rhynchotus rufescens catingae* (Brasil); *Rhynchotus rufescens rufescens* (Brasil, Peru, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina); *Rhynchotus rufescens pallescens* (Argentina); *Rhynchotus rufescens maculicollis* (Bolívia e Argentina) (KING, MCLELLAND, 1984; JIMENEZ II, JIMÉNEZ, 2002).

Os exemplares do gênero *Rhynchotus* são campestres e dependem da altura da vegetação para garantir a sua sobrevivência. Em decorrência das queimadas na época da postura, da caça e do uso de inseticidas, a área de distribuição e o número de perdizes vêm diminuindo acentuadamente (SICK, 1997).

Para evitar o risco de extinção da perdiz e de diversos animais silvestres, a caça foi proibida no Brasil pela Lei dos Crimes Contra o Meio Ambiente, n. 9.605, seção 1, artigo 29, de 12/02/1998, e cuja pena é a detenção de seis meses a um ano, além de multa (IBAMA).

A perdiz possui amplos músculos peitorais que despertam interesses na culinária sofisticada, ocasionando elevação da demanda de carnes exóticas. A produção em larga escala é uma alternativa para suprir a necessidade do mercado de alimentos finos, principalmente dos restaurantes sofisticados que procuram carnes exóticas. Entretanto, na maioria das vezes a produção nacional não é suficiente para atender a demanda em decorrências dos efeitos deletérios da sazonalidade reprodutiva, da baixa produtividade em cativeiro e da ausência de técnicas reprodutivas específicas para esta ave.

Além dos fatores biológicos que dificultam a criação de perdizes, existem normas determinadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, que exige cadastro do criador, apresentação do projeto de criação e construção de instalações específicas para a criação dessa espécie em cativeiro.

O que se observa é que a falta de informações detalhadas acerca das características reprodutivas dessa espécie se opõe à otimização da produção em larga escala. Para avaliar diferentes formas de manejo reprodutivo em perdizes é necessário conhecer mais profundamente os mecanismos que regem a reprodução, e as possibilidades de utilização de ferramentas biotecnológicas que melhorem o desempenho produtivo e o aproveitamento do potencial genético das aves em geral.

Uma ferramenta que poderia incrementar a produtividade seria a inseminação artificial com sêmen refrigerado, biotécnica largamente utilizada na criação comercial de aves, que apresenta como vantagens o acasalamento direcionado para seleção genética e a diminuição nos custos de manutenção de machos no plantel por otimização de reprodutores e eliminação de machos inférteis e sub-férteis. Outra vantagem importante aparece em criações de espécies com comportamento monogâmico ou poliândrico, pois nesses casos o número de machos teria que ser igual ou maior do que o de fêmeas inviabilizando a criação.

Para a implantação de um programa de inseminação artificial se faz necessário determinar o método de coleta e realizar análise do sêmen. Desde que Burrows e Quinn (1935) propuseram o primeiro método de coleta de sêmen para galos (*Gallus gallus domesticus*), diversos pesquisadores vêm desenvolvendo e aperfeiçoando essa técnica para aves domésticas e não-domésticas. Em relação à perdiz, não foram encontrados relatos na literatura a cerca de métodos de coleta e avaliação de sêmen, portanto se faz necessário a padronização de um método de coleta e análise de sêmen.

Apesar de úteis e necessários, os testes usados na rotina da análise reprodutiva de aves apresentam algumas limitações, podendo não demonstrar a real fertilidade de determinadas amostras. Para complementá-las pode-se aplicar testes auxiliares que avaliem a função dos componentes da célula espermática. O teste de expansão hipo-osmótico é um deles, pois avalia a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, através do desafio das células em meios de baixa osmolaridade, esta técnica já foi padronizada em humanos, bovinos, caninos, felinos

e algumas aves de produção, sendo uma alternativa relevante na avaliação reprodutiva de espécies de importância genética e econômica.

Assim como o teste hipo-osmótico complementa e amplia a aplicação do exame andrológico, o estoque de sêmen também adiciona vantagens à coleta de sêmen, tanto na área de pesquisa quanto de produção. Esse procedimento pode ser realizado por períodos curtos e longos, pois se as amostras seminais são mantidas em geladeira, a durabilidade é mais curta do que quando congeladas em nitrogênio líquido. Apesar das vantagens, até o presente momento, essas técnicas ainda não foram descritas para perdizes em cativeiro, sendo, portanto o centro das análises realizadas neste estudo.

CAPÍTULO 1 – EXPERIMENTO COLETA DE SÊMEN

1 INTRODUÇÃO

A produção de animais de caça em larga escala é uma alternativa para suprir mercados de alimentos finos, entretanto, na maioria das vezes a demanda não é atendida devido à produção insuficiente, que no caso da perdiz (*Rhynchotus rufescens* Temminck, 1815), é afetada pela sazonalidade reprodutiva. Uma alternativa para o melhor aproveitamento produtivo e genético desta espécie seria a inseminação artificial, biotécnica largamente utilizada na criação comercial de aves. Porém, para isto, seria necessária a padronização da coleta de sêmen para a descrição das características físicas e químicas do sêmen.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As aves domésticas e não domésticas de interesse zootécnico estão sendo utilizadas por diversas agroindústrias brasileiras e estrangeiras cada vez mais intensamente. Nessa atividade, a otimização dos reprodutores é um dos pontos básicos para o sucesso do empreendimento, sendo a coleta de sêmen uma das ferramentas biotecnológicas para seleção de machos destinados à monta natural ou inseminação artificial.

2.1 ANATOMIA MASCULINA DE AVES

O sistema genital masculino de aves é formado pelos testículos, via seminífera extratesticular (epidídimos e ductos deferentes) e aparelho copulatório. Os testículos são órgãos pares, localizados dorsalmente na cavidade abdominal, paralelos a linha média e aderidos a parede dorsal através do mesórquio (BULL, 1994; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As vias seminíferas extra testiculares de aves são pares e compostas pelo epidídimo e ducto deferente. O epidídimo é alongado e fusiforme, estando intimamente aderido ao testículo e, diferente dos mamíferos, é curto e não é dividido em cabeça corpo e cauda. O ducto deferente é altamente contorcido e repousa sobre a superfície do rim, começando no final do epidídimo e terminando, juntamente com o ureter, na cloaca na região dorsal do urodeo. O sêmen fica estocado na sua porção final denominada ampola do ducto deferente (BULL, 1994).

Hafez e Hafez (2004) dividem o aparelho copulatório dos galos em papilas do ducto deferente (pequena projeção do ducto deferente), corpo vascular paracloacal (fonte de linfa para intumescência durante a excitação sexual), pregas linfáticas ou tecido linfático tumescente que quando preenchido de linfa fica evertido e forma o falo não-penetrante.

2.2 SISTEMA GENITAL MASCULINO DE PERDIZ

Os testículos de perdizes sofrem alterações morfológicas sazonais, sendo que durante o ciclo reprodutivo ocorre o desenvolvimento dos testículos, acompanhado pelo surgimento dos espermatozóides e de toda a linhagem celular que precede a sua formação. Fora da fase de reprodução os testículos passam por um processo de degeneração com quiescência da espermatogênese (BOTINO et al., 2003).

Em perdizes, existem alterações morfológicas sazonais nos ductos deferentes e durante a fase de regressão pode haver redução de 112% do volume em relação à fase reprodutiva (MAHECHA et al., 2003).

Segundo Sick (1997), o órgão reprodutivo masculino das perdizes é denominado falo e, quando ereto, torna-se espiralado, semelhantemente ao dos Ratitae, dos patos e dos jacus, podendo ser visto na época da reprodução.

O falo das perdizes é do tipo intromitente, localiza-se no proctodeo e é dividido em duas porções: a esquerda é constituída por uma estrutura cilíndrica eversível e a direita é fixa. Quando esticado e em repouso pode atingir $8,17 \pm 2,48$ cm; durante a ereção, por ingurgitamento linfático, forma uma espiral cilíndrica de 3 a 4 cm de comprimento por 8 mm de diâmetro (BARALDI-ARTONI et al., 2001).

2.3 ESPERMATOGÊNESE

No galo doméstico (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758), a espermatogênese e a esteroidogênese ocorrem a aproximadamente 43°C, e o ciclo do epitélio seminífero tem uma duração de 13 a 15 dias. Diferentemente dos mamíferos, os espermatozóides de aves são armazenados no ducto deferente, não necessitam de maturação no epidídimo, nem sofrem capacitação (ETCHES, 1994).

Os hormônios envolvidos com a espermatogênese produzidos na hipófise são o hormônio luteinizante (LH), que estimula o desenvolvimento das células de Leydig; o hormônio folículo estimulante (FSH), que atua sobre as células de Sertoli e a prolactina, que inibe a liberação de LH desencadeando o início da incubação de

ovos ou comportamento de “choco” nas espécies cujo macho tem esse papel biológico (PROUDMAN, 1994), como a perdiz.

Os efeitos somáticos e ambientais têm grande influência sobre os neurônios hipotalâmicos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que, por sua vez, controla a liberação de FSH e LH, influenciando indiretamente a produção de espermatozoides, que fica modulada pelas alterações sazonais (BULL, 1994; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ciclo reprodutivo da perdiz sofre alterações sazonais. No Brasil, a estação reprodutiva da espécie ocorre no período compreendido entre os meses de agosto e fevereiro, quando os índices de luminosidade e temperatura ambientais são mais elevados (MORO et al., 2000; SICK, 1997).

De acordo com Cesário (1994), o espermatozóide de galo é composto de cabeça, acrossomo, peça intermediária e cauda. O acrossomo está localizado na cabeça, mas a sua diferenciação é freqüentemente difícil. A cabeça é curva e seguida de uma peça intermediária curta, que tem uma espiral com mitocôndrias irregularmente distribuídas. O espermatozóide termina numa fina cauda vibrátil.

Durante a espermiogênese, na fase de formação do acrossoma, surge uma organela denominada manchete. O número de microtúbulos circulares ao redor do núcleo aumenta quando a espermatíde começa a se alongar. À medida que eles se agrupam o núcleo passa da forma arredondada para alongada por meio de constrição das manchetes circulares que vão até o centríolo distal. Após o núcleo adquirir a forma final, os microtúbulos se reorganizam formando as manchetes longitudinais da mesma forma e sentido das circulares – da região acrossomal para a posterior, mantendo-se paralelas ao núcleo (MARETTA, 1995; OKAMURA; NISHIYAMA, 1976).

A manchete parece não ter mais função após a migração das mitocôndrias para a parte posterior da espermatíde. Os microtúbulos se desintegram deixando algum material eletrodenso que depois desaparece junto com os resquícios de protusões citoplasmáticas (MARETTA, 1995).

2.4 COLETA DE SÊMEN

A coleta de sêmen é uma ferramenta biotecnológica empregada em diversas espécies domésticas e selvagens, de interesse econômico ou não, utilizada para descrição e avaliação das características reprodutivas desses animais. Em decorrência disso, muitas pesquisas em andrologia de animais selvagens têm buscado a padronização de um método de coleta de sêmen eficiente, simples e que não necessite contenção química ou eutanásia.

De acordo com Malecki et al. (1996) o sêmen de aves pode ser coletado por massagem manual, eletroejaculação e vagina (cloaca) artificial. A escolha do método varia de acordo com a espécie a ser manipulada.

Em frangos (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758), perus (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758) e galinhas d'angolas (*Numida meleagris*, Linnaeus, 1758), a colheita de sêmen é realizada por meio de massagem abdominal no dorso e movimentos nas laterais da cloaca. Geralmente, três ou quatro sessões são suficientes para condicionar os machos (ETCHES, 1996).

Hemberger et al. (2001) colheram sêmen de avestruz (*Struthio camelus*, Linnaeus, 1766) introduzindo a mão na cloaca e expondo o falo. Em alguns animais, esse procedimento foi o suficiente para que o sêmen escorresse em tubo estéril, porém em outros animais foi necessária a manipulação das papilas seminais para obtenção das amostras. Durante os procedimentos, os animais encontravam-se com um capuz sobre a cabeça.

O emu (*Dromaius novaehollandiae*, Latham, 1790) pode direcionar seu interesse sexual para humanos. As fêmeas assumem a postura de cópula, agachando-se e elevando a cauda; os machos também podem seguir as pessoas, assumir a postura de cortejo e investir o corpo de encontro a elas. Esse comportamento facilita a coleta de sêmen pelo método da cloaca artificial, pois os animais condicionam-se rapidamente, diminuindo o tempo exigido para essa atividade (MALECKI et al., 1996).

Barnabe et al. (2001) observaram que o sêmen de emas (*Rhea americana*, Linnaeus, 1758) escorre pelo sulco fálico após massagem na base do pescoço e no falo.

2.5 AVALIAÇÃO DO SÊMEN

A morfologia de espermatozóides maduros é muito variável nas aves. De um modo geral, eles são menores que os de mamíferos (com média de $9,2\mu\text{m}^3$), o acrossomo é simples e encapsulado pela membrana citoplasmática, e a cabeça contém o núcleo. A cauda é dividida em colo, peça intermediária, peça principal e peça final (JOHNSON, 1986).

Algumas alterações morfológicas dos espermatozóides de galos foram descritas, entre elas estão as de acrossoma – intumescido e destacado (MAEDA et al., 1986); cabeça – enrolada (BAJPAI, 1963; CLARKE et al., 1984); peça intermediária – granular (BAJPAI, 1963) e dobrada (MAEDA et al., 1986) e de cauda – enrolada e dobrada (BAJPAI, 1963; CLARKE et al., 1984).

Segundo Celeghini (2000), no início da fase reprodutiva, as amostras seminais podem apresentar índices mais elevados para as alterações morfológicas e mais baixos para concentrações espermáticas.

Barnabe et al. (2001) citam que o sêmen de emas apresenta motilidade entre 40 e 60% e morfologia espermática similar à do galo.

3 HIPÓTESE

É possível obter amostras seminais de perdizes, criadas em cativeiro, por meio de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes.

As amostras obtidas podem ser descritas quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor, pH e morfologia espermática.

4 OBJETIVOS

O presente trabalho - realizado com perdizes criadas em cativeiro – tem como objetivo padronizar a técnica de coleta e avaliação de sêmen de perdiz através da obtenção do sêmen e descrição do volume, concentração, motilidade, vigor, pH e morfologia espermática durante dois ciclos reprodutivos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas em três ciclos de reprodução: 2002-2003, 2003-2004 e 2004-2005, denominados de nascimento, primeiro e segundo ciclo de coleta, respectivamente. No ciclo de nascimento selecionou-se os machos utilizados para descrição das técnicas de coleta de sêmen e do espermograma de perdizes criadas em cativeiro. No primeiro ciclo de coleta, as amostras seminais foram empregadas na padronização das técnicas e no segundo para a aplicação das mesmas.

5.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Os animais foram provenientes do rebanho científico alojado no Galpão de Recria de Perdizes da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Jaboticabal (FCAVJ/UNESP), localizado numa altitude média de 583m, na latitude de 21°15'20" S e longitude de 48°19'16" O, ficando distante da capital paulista cerca de 344Km (FUNDAÇÃO SEADE).

Alojou-se os animais em boxes de 2m de comprimento por 1m de largura, as laterais foram compostas por base de alvenaria de 10cm de altura, 20cm de lona azul sobre essa base e tela metálica de viveiro, com fio de metal tipo 22, até o teto. O piso foi confeccionado em alvenaria e forrado com cama de feno de gramínea, sendo trocada a cada dois meses.

Ao atingirem três meses de idade, as aves nascidas entre os meses de outubro e dezembro de 2002, foram classificadas em duas categorias: macho (presença de falo) e fêmea ou macho subdesenvolvido (ausência de falo).

Dos animais classificados como machos durante o ciclo de nascimento, 30 exemplares foram utilizados no primeiro ciclo (2003-2004) e 100 no segundo (2004-2005).

5.2 MANEJO

Os animais com falo evidente foram mantidos em boxes coletivos sem contato físico com as fêmeas desde o período de separação pelo sexo até o final do segundo ciclo.

As aves receberam água e ração peletizada *ad libitum*, desenvolvida por pesquisadores da FCAV, de acordo com o sugerido por Moro (1996).

Em dias com temperatura superior a 36°C, era feita aspersão de água nos corredores e laterais externas do galpão.

Diariamente era feita observação dos comedouros, dos bebedouros, da cama e dos indivíduos, garantindo o bom funcionamento dos equipamentos e bem estar dos animais.

Periodicamente as penas das asas, do dorso e das patas eram cortadas e as da região pericloacal eram removidas por suave tração.

5.3 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN

As amostras seminais empregadas para descrever o espermograma normal de perdizes criadas em cativeiro foram obtidas no primeiro ciclo de coletas, que teve início em outubro de 2003 e término em abril de 2004.

O sêmen foi coletado por meio de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes. As atividades realizadas nessa etapa estão descritas abaixo:

- ◆ Organização do material: ligar banho-maria, mesa aquecedora, platina aquecida e microscópio; arrumar lâminas, lamínulas, ponteiras, microtubos plásticos, capilar de hematócrito, mini-pera de silicone, tubos cônicos e luvas.
- ◆ Preparação do macho e coleta de sêmen: contenção do animal, remoção de penas, limpeza da região da cloaca e coleta de sêmen (Figuras 1 a 3).
- ◆ Análise imediata e processamento das amostras:

- Volume e aspecto - foram descritos por meio de observação direta em tubo capilar, sendo atribuído dois para o aspecto leitoso, um para o semi-leitoso e zero para o transparente.
- Descrição da motilidade (% de espermatozóides com movimento) e do vigor (movimento progressivo, de 0 a 5) – uma alíquota de 5µl da amostra diluída em solução fisiológica na proporção de 1:10, foi depositada entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio de luz num aumento de 400x (Taimin, modelo TN212B).
- Mensuração do pH – esta variável foi medida por meio de fitas indicadoras de pH¹ e o resultados foram obtidos por comparação das cores da fita teste com as da caixa.
- Descrição da concentração e da morfologia espermática – depois das análises imediatas, uma alíquota (A1) de 2µl de cada amostra foi diluída em 998µl da solução de formol salino² a 37°C e armazenada em microtubo plástico identificado com a data, número e box do animal que, por sua vez, foram estocados em geladeira a 5°C para análise posterior.
- ♦ Análise laboratorial: as lâminas e as alíquotas armazenadas foram analisadas na seqüência em que as amostras foram colhidas.
 - A concentração espermática foi determinada utilizando-se a câmara de Neubauer, sob microscopia de luz³ num aumento de 400 vezes. Preparou-se a câmara, aguardou-se dez minutos para que o líquido parasse de se movimentar e os espermatozóides se depositassem na parte inferior da câmara. O número encontrado na contagem dos espermatozóides foi empregado na fórmula de concentração para se estimar o número de células por ml:

$$[\text{sptz/ml}] = N \times 5 \times 500 \times 10 \times 1000$$

Onde:

N= número de espermatozóides contados

5= 25/número de quadrados contados

500= 1/diluição da amostra (1/500)

¹ Merck® Alemanha

² Apêndice

³ Olympus Optical Co. Ltd., modelo BX50F4

10= 1/altura (0,1mm)

1000= fator de correção de mm³ para ml

- A morfologia espermática foi descrita por meio da análise de 200 células em câmara úmida sob microscopia de interferência diferencial de fase, num aumento de 1000 vezes, segundo Barth e Oko (1989). As células foram categorizadas em normais ou anormais e as alterações foram descritas individualmente e também agrupadas em anormalidades de acrossomo, cabeça, peca intermediaria e cauda.

As análises imediatas (volume, aspecto, motilidade, vigor e pH) das amostras seminais foram realizadas no Galpão de Recria da FCAVJ/UNESP, enquanto que as laboratoriais (concentração e morfologia espermática) foram realizadas no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LA/FMVZ-USP).

5.4 COLETA DE SÊMEN E DESCRIÇÃO DO ESPERMOGRAMA

No segundo ciclo de coletas (agosto de 2004 e abril de 2005), amostras seminais foram obtidas de 100 machos, pelo método de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes (CAVALCANTE et al., 2004) e empregadas para descrever o espermograma normal de perdizes criadas em cativeiro. As atividades realizadas nessa etapa seguiram o protocolo descrito na fase de padronização.

5.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados obtidos nos dois ciclos de reprodução foram analisados através do programa SAS System for Windows V.8 (SAS, 2000).

Para descrição dos resultados, foram descritos os valores mínimos, máximos, médias, erros padrões das medias (média $\pm$ erro padrão), variância e coeficiente de variação das amostras analisadas.

As variáveis resposta foram submetidas à análise de correlação através do PROC CORR, sendo os resultados descritos através do coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman para dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente, e seu respectivo nível de significância.

Os valores mínimos e máximos encontrados foram descritos por se tratar de estudo inédito, podendo ser útil para pesquisas similares, além de explicar os valores elevados de algumas variâncias e coeficientes de variação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ciclo reprodutivo de 2003-2004 iniciou-se mais tardiamente em comparação aos ciclos anteriores. Pode-se explicar esse fato pelo atraso das chuvas (SICK, 1997) e pelo prolongamento do ciclo de 2002-2003, que terminou durante a segunda quinzena de julho, quando o esperado era que isso ocorresse entre março e abril, de acordo com os registro do galpão em ciclos anteriores (comunicação pessoal).

Durante a etapa de seleção e alojamento dos machos, verificou-se que o falo dos animais apresentava-se ainda, pequeno e infantil, condizente com a idade dos animais. Nessa oportunidade, foram realizadas tentativas de coleta de sêmen dos animais adultos e mais uma vez, não se obteve amostras seminais. De acordo com Mies Filho (1987), os galos em regime de coleta de sêmen devem ser separados das fêmeas e não podem sofrer estresse durante a manipulação.

Neste experimento, a remoção das penas da região da cloaca, a cada 20 dias, foi indispensável para a coleta do sêmen (Figuras 1 a 3), sendo que sem esse procedimento, o período de manipulação prolongava-se ainda mais, elevando, por sua vez, o estresse do animal pela contenção.

Entre os meses de outubro de 2003 e abril de 2004, a maioria dos machos do experimento apresentou o falo desenvolvido. Em acordo com Baraldi-Artori et al. (2001) as porções fixa e eversível (Figuras 4 e 5) podiam ser vistas durante o dia ou após a manipulação da cloaca, que também apresentou aumento de volume, sendo facilmente diferenciada da dos animais impúberes e das fêmeas.

A observação da anatomia interna dos machos demonstrou que ocorrem alterações macroscópicas sazonais no sistema genital interno. Os testículos e ductos deferentes passam por modificações de forma e tamanho, ficando maiores durante a fase reprodutiva. De acordo com o observado por Mahecha et al. (2003) os testículos se apresentam intumescidos sendo possível visualizar os vasos sangüíneos periféricos. Os ductos deferentes tornam-se evidentes e repletos de circunvoluções preenchidas de espermatozóides.

Hafez e Hafez (2004) citaram que os ductos deferentes de galos possuem uma pequena projeção denominada de papilas dos ductos deferentes, sendo que, as

perdizes também apresentam essa estrutura anatômica que faz parte do aparelho copulatório (figuras 4 e 5).

6.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN

Foi possível obter amostras seminais após a compressão das ampolas dos ductos deferentes e da base do falo de perdizes criadas em cativeiro. O líquido fluía da parte superior da porção fixa do falo após 4 a 5 movimentos de compressão.

Nem sempre esse procedimento apresentava sucesso, sendo assim, optava-se por devolver o animal ao box sem coletar a amostra, evitando manipular a cloaca em excesso, para não causar lesões locais.

Os resultados das análises das amostras seminais obtidas no primeiro ciclo de coleta, 2003-2004, foram organizados e encontram-se nas tabelas 1.1 e 1.2.

Tabela 1.1 – Média e erro padrão da média (EP) do volume, motilidade, vigor, pH e concentração espermática de ejaculados de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre outubro de 2003 e abril de 2004 - Jaboticabal - SP – 2003 – 2004

Variável	Média	EP
Volume (µl)	14,13	2,33
Motilidade (%)	66,00	4,79
Vigor (1-5)	2,30	0,23
pH (1-14)	8,00	0,32
Concentração ($\times 10^9$ sptz/ml)	0,93	0,14

Durante essa fase encontrou-se valores para o volume e a concentração abaixo do que os descritos por Etches (1994) para algumas aves. Como não existiam relatos sobre os valores médios para a espécie e as coletas foram feitas sob um certo grau de estresse, não foi possível afirmar se esses valores estão distantes dos valores normais para a espécie.

Tabela 1.2 – Média e erro padrão da média (EP) das alterações morfológicas de espermatozoides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre outubro de 2003 e abril de 2004 - Jaboticabal - SP – 2003 – 2004

Variável	Média	EP
Acrossomo intumescido	0,53	0,30
Acrossomo destacado	2,27	1,02
Cabeça solta	0	0
Cabeça dobrada	0,73	0,31
Cabeça dobrada c/ gota	0,13	0,09
Peça intermediária dobrada	7,80	1,65
Peça intermediária c/ gota	0,87	0,53
Peça intermediária dobrada c/ gota	4,20	1,82
Cauda dobrada/enrolada	20,25	3,00
Cauda fortemente enrolada	5,27	1,86
Jovem	0,40	0,20
Defeitos totais	42,66	4,33

Após as análises dos resultados, pode-se observar que as alterações morfológicas foram mais freqüentes na região da cauda. As atividades realizadas no primeiro ciclo de coletas serviram para padronizar a técnica de coleta de sêmen por meio de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes.

6.2 COLETA DE SÊMEN E DESCRIÇÃO DO ESPERMOGRAMA

Os machos emitiram o som característico da fase reprodutiva do fim do mês de julho de 2004 até o início do mês de abril de 2005. As amostras coletadas entre agosto de 2004 e abril de 2005 foram consideradas como segundo ciclo de coletas e o resultado das análises dos dados estão dispostos nas tabelas 1.3 a 1.5.

Tabela 1.3 – Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) do volume (n=231), aspecto (n=231), motilidade (n=229), vigor (n=229), pH e concentração espermática (n=198) de ejaculados de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 - Jaboticabal - SP – 2004, 2005

Variável	Média	EP	Mín	Máx	Var	CV
Volume (µl)	0	1,30	23,59	150	394,06	81,69
Aspecto (0-2)	0	0,03	1,81	2	0,17	22,70
Motilidade (%)	0	1,41	73,06	90	455,53	29,21
Vigor (1-5)	0	0,08	3,06	5	1,42	38,98
Concentração ($\times 10^9$ sptz/ml)	0,05	0,74	5,25	8,16	114,32	203,74

Apesar do valor médio do volume ter sido maior no segundo ciclo do que no primeiro, ambos foram aquém do esperado para aves domésticas de porte físico similar, porém não há relatos na literatura científica que possam ser comparados.

A morfologia das células espermáticas de perdizes foi observada segundo a metodologia predeterminada no item Materiais e métodos deste trabalho. As formas anormais encontradas estavam em acordo com os tipos descritos por Alkan et al. (2002), Bajpai (1963), Clarke et al. (1984) e Maeda et al. (1986). Elas foram computadas, fotografadas, tabuladas e encontram-se descrita nas tabelas 1.4 e 1.5 (figuras 6 a 8).

Tabela 1.4 – Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) das alterações da morfologia espermática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 (n=202) - Jaboticabal - SP – 2004, 2005

Variável (%)	Média	EP	Mín	Máx	Var	CV
Acrossomo intumescido	0,29	0,07	0	6	0,88	321,93
Acrossomo destacado	0,50	0,12	0	14	2,91	345,16
Cabeça solta	1,89	0,48	0	65	46,06	359,54
Cabeça dobrada	2,66	0,59	0	48	68,29	310,28
Cabeça com gota	0,15	0,07	0	9	0,83	594,40
Cabeça dobrada c/ gota	5,74	0,60	0	46	69,90	145,67
P. I. dobrada	0,79	0,20	0	26	7,52	346,83
P. I. c/ gota	9,50	1,03	0	86	209,15	152,31
P. I. dobrada c/ gota	5,78	0,60	0	54	69,18	143,82
Cauda dobrada/enrolada	14,55	0,98	0	75	189,00	94,48
Cauda fortemente enrolada	0,44	0,19	0	34	6,76	589,11
Jovem	0,40	0,09	0	8	1,46	300,02
Teratológico	0,88	0,13	0	8	3,04	198,73
Defeitos totais	43,47	1,53	0	100	459,48	49,31

(P. I.: peça intermediária)

Algumas alterações morfológicas encontradas nos espermatozóides de perdizes já foram descritas para galo doméstico, entre elas estão as de acrossoma – intumescido e destacado (MAEDA et al., 1986); cabeça – enrolada (BAJPAI, 1963; CLARKE et al., 1984); peça intermediária – com gota (BAJPAI, 1963) e dobrada (MAEDA et al., 1986) e de cauda – enrolada e dobrada (BAJPAI, 1963; CLARKE et al., 1984).

A gota citoplástica pode ser vista nas células espermáticas desde a região do epidídimo, como descrito por Baraldi-Artoni (2002), sendo mais freqüentes na região da peça intermediária. Maretta (1995) sugere que a gota citoplasmática pode ser resquício de protusões citoplasmáticas originadas da desintegração das manchetes longitudinais e que não se destacaram da célula durante a espermatogênese.

A motilidade foi correlacionada positivamente com a porcentagem média de células normais ($r=0,40$; $p<0,0001$). Do mesmo modo, correlações negativas entre

os defeitos totais ($r=-0,40$; $p<0,0001$), formas jovens ($r=-0,43$; $p<0,0001$) e alterações de cabeça ($r=-0,43$; $p<0,0001$) dentre elas a de cabeça solta ($r=-0,42$; $p<0,0001$), foram encontradas com a motilidade. Esse resultado sugere que ejaculados com menores porcentagens de alterações morfológicas tendem a ter elevada motilidade, pois provavelmente toda a célula contribui pra motilidade espermática, desde a cabeça, P.I. e cauda.

Tabela 1.5 – Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) das alterações da morfologia espermática de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, agrupadas pelo local da alteração, amostras (n=202) obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 - Jaboticabal - SP – 2004, 2005

Variável (%)	Média	EP	Mín	Máx	Var	Cv
Acrossomo	0,79	0,13	0	14	3,52	238,80
Cabeça	10,45	0,83	0	67	135,73	111,50
P. I.	16,06	1,11	0	86	241,59	96,73
Cauda	14,99	0,99	0	75	190,85	92,15
Outros	1,28	0,18	0	16	6,30	195,92
Defeitos totais	43,47	1,53	0	100	459,48	49,31
Normais	56,53	1,53	0	100	459,48	49,31

Na tabela 1.5, as alterações morfológicas foram agrupadas de acordo com o local de ocorrência na célula, para facilitar as análises e discussões. Os resultados de alterações morfológicas totais apresentaram valores mais elevados do que os encontrados para peru (ALKAN et al., 2002).

Segura-Correa e Aguayo-Arceo (1995) sugerem que animais com testículos imaturos apresentam valores mais elevados de anomalias espermáticas do que os que já tem testículos maduros. Como as aves estavam no primeiro ciclo de produção, pode ser que esse fato tenha elevado os valores médios das alterações morfológicas descritas nessa fase do experimento.

CAPÍTULO 2 – PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que os testes usados na rotina da análise reprodutiva apresentam algumas limitações, podendo não demonstrar a real fertilidade de determinadas amostras. Sendo assim, é de extrema importância a aplicação de técnicas complementares que avaliem as diferentes funções e componentes da célula.

O teste de expansão hipo-osmótico complementa o espermograma por avaliar a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, através do desafio das células em meios de baixa osmolaridade. Esta técnica, já padronizada para humanos (JEYENDRAN et al., 1984) bovinos e algumas aves de produção, pode ser uma alternativa relevante na avaliação reprodutiva de espécies com importância genética e econômica.

A perdiz (*Rhynchotus rufescens*, Temminck – 1815), espécie cuja criação apresenta considerável potencial econômico devido a grande procura e pequena oferta, tem seus aspectos reprodutivos pouco estudados, sendo de extrema importância o estudo de testes que permitam avaliar a funcionalidade da célula espermática, visando incrementar a reprodução e conseqüentemente a produção em cativeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A avaliação do sêmen é uma das ações empregadas em criações com intuito de otimizar os reprodutores. Desta forma é possível fazer uma seleção mais intensa, baseada não só nas características produtivas, mas também, nas reprodutivas, valorizando os animais que apresentam maior capacidade fecundante.

Os testes físicos são os primeiros critérios dessa seleção, mas podem ser mais eficazes quando complementados por testes funcionais, isto é, testes que visam avaliar a funcionalidade das diversas estruturas da célula espermática, tais como acrossomo, DNA, mitocôndrias e membrana plasmática, sendo esta última extremamente importante, pois ao sofrer uma injúria, todas as outras estruturas podem ser afetadas.

Dentre estes, o teste de expansão hipo-osmótico se caracteriza por ter elevada correlação com a atividade de membrana, além de ser simples, barato e de fácil aplicação (JEYENDRAN et al., 1984).

2.1 COLETA E AVALIAÇÃO DE SÊMEN

A morfologia de espermatozóides maduros é muito variável nas aves. De um modo geral, eles são menores que os de mamíferos (com média de $9,2\mu\text{m}^3$), o acrossomo é encapsulado pela membrana citoplasmática, e a cabeça contém o núcleo. A cauda é dividida em colo, peça intermediária, peça principal e peça final (JOHNSON, 1986).

As características físicas avaliadas no sêmen são: aspecto, volume, motilidade vigor, pH e concentração. Hafez e Hafez (2004) sugerem que a motilidade e o vigor possuem baixa correlação com a habilidade fecundante real.

2.2 FISILOGIA ESPERMÁTICA E TESTE HIPO-OSMÓTICO

Quando uma célula íntegra é submetida a uma osmolaridade diferente da encontrada em seu interior, existe uma tentativa de se igualar essas osmolaridades, permitindo a passagem de solvente através de sua membrana. Dessa forma, uma célula submetida a osmolaridade extracelulares mais baixas irá permitir a entrada de água em seu meio intracelular, ocorrendo, então, sua expansão e, no caso da célula espermática, o enrolamento de cauda. Este processo é denominado de princípio da permeabilidade seletiva. Porém, isso só ocorre em células que apresentam a membrana citoplasmática funcionalmente íntegra. Sendo assim, células com membranas íntegras submetidas à baixa osmolaridade apresentariam turgidez, enquanto que as lesadas permanecem na forma em que estavam anteriormente (ALBERTS et al., 2004).

Jeyendran et al. (1984) observaram que, assim como outras células, os espermatozóides humanos com membrana íntegra também apresentavam-se túrgido quando submetido a soluções hipo-osmóticas em relação ao meio intracelular, em decorrência do influxo de água. Estes pesquisadores verificaram que, quando há o influxo de água pela membrana de espermatozóides, as células apresentavam enrolamento de cauda característico. Sendo assim, padronizaram um teste simples, capaz de avaliar a integridade funcional da membrana do espermatozóide, denominado teste de expansão hipo-osmótico.

Em 2002, Ducci et al. citaram que o transporte de componentes através da membrana espermática é um processo bioquímico essencial para a viabilidade e capacidade fertilizante do espermatozóide.

2.2.1 Teste Hipo-osmótico e Fertilidade

O teste hipo-osmótico pode ser empregado na rotina da análise de sêmen para avaliar a capacidade fecundante do espermatozóide, por ter apresentado correlação positiva elevada ($r=0,90$) entre as porcentagens de espermatozóides túrgidos (com a

cauda enrolada) e os capazes de penetrar em oócios *zona free* de hamster (JEYENDRAN et al., 1984).

A aplicação do teste hipo-osmótico em amostras seminais humanas demonstrou que homens com parâmetros seminais anormais apresentaram porcentagens mais baixas de edema de cauda quando comparado com indivíduos normais. Foi observada uma correlação positiva de $r=0,32$; $p<0,05$ entre morfologia espermática e cauda enrolada após a aplicação do teste hipo-osmótico (CHAN et al., 1985).

Fuse et al. (1991) aplicaram o teste hipo-osmótico em amostras de sêmen humano e encontraram correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides com a cauda enrolada pelo teste hipo-osmótico e a concentração espermática ($r=0,5$; $p<0,05$) e entre a porcentagem de espermatozóides móveis ($r=0,6$; $p<0,01$).

Tartagni et al. (2004) avaliaram o emprego do teste hipo-osmótico como ferramenta na capacidade fecundante do espermatozóide. O teste hipo-osmótico foi aplicado em amostras seminais de 100 casais, em seguida estes foram divididos em dois grupos: um com maior porcentagem de célula espermáticas com membrana íntegra (grupo 1) e outro com menor (grupo 2). O grupo 1 apresentou maiores taxas de gestação por casal e por ciclo estral: 28,55 e 9,5%; contra 10,9% e 3,6% do grupo 2.

O teste de expansão hipo-osmótico (*hypoosmotic swelling test* – HOS) pode ser empregado como indicador da atividade da membrana na avaliação espermática em homens e animais, por ser de simples realização e alta associação com a funcionalidade da membrana espermática (TARTAGNI et al., 2004). Sendo assim, a aplicação de testes para estimar a porcentagem da integridade de membrana em amostras seminais, pode ser usada na rotina de exames andrológicos, elevando a acurácia do resultado (DUCCI et al., 2002).

2.2.2 Teste Hipo-osmótico em Aves

Donoghue et al. (1996) testaram a integridade da membrana de espermatozóides de peru combinando três técnicas: o teste de expansão hipo-

osmótico (HOS), a coloração fluorescente e a citometria de fluxo. Os autores concluíram que a osmolaridade crítica para perus é de 19mOsm/kgH₂O, e que o uso da citometria de fluxo combinada ao teste HOS aumenta o número de espermatozóides avaliados em relação à integridade de membrana.

3 HIPÓTESE

A célula espermática da perdiz responde a meios hipo-osmóticos através do enrolamento de cauda, sendo este enrolamento, proporcional à diminuição da osmolaridade do meio, o que possibilitaria a padronização do teste hipo-osmótico como indicador da integridade da membrana espermática nesta espécie.

4 OBJETIVOS

Padronizar o teste hipo-osmótico em perdizes, através do desafio de amostras espermáticas dessa espécie em soluções hipo-osmóticas de 0mOsm, 50mOsm, 60mOsm, 75mOsm, 100mOsm, 125mOsm, 175mOsm e 200mOsm, comparando os resultados de porcentagem de células com caudas enroladas entre si e com a solução iso-osmótica de 300mOsm, a fim de verificar qual o meio hipo-osmótico ideal para esta espécie.

Uma vez padronizado, correlacionar os resultados do teste hipo-osmótico com a análise espermática empregada na rotina de espécies domésticas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas durante dois os ciclos de produção: 2002-2003 e 2003-2004, neste período identificou-se e alojou-se os machos empregados na padronização do teste de expansão hipo-osmótico.

5.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Os animais empregados neste experimento foram originados e submetidos às mesmas condições de alojamento e manejo descritos no experimento de Coleta de Sêmen.

Dos animais classificados como machos durante o ciclo de nascimento, 30 exemplares foram utilizados no experimento de Padronização do Teste Hipo-Osmótico (outubro de 2003 a abril de 2004) e no experimento de Aplicação do Teste Hipo-Osmótico (agosto a dezembro de 2004).

5.2 PADRONIZAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO

A padronização do teste foi realizada por meio da observação das porcentagens médias de caudas enroladas em soluções com osmolaridades decrescentes. Para evitar que células previamente enroladas influenciassem os resultados, foi utilizado concomitantemente, um meio de osmolaridade semelhante à do sêmen (300mOsm), que foi então denominada solução iso-osmótica. O resultado deste meio foi então utilizado como controle. À medida que a osmolaridade do meio diminui mais células tendem a enrolar a cauda, até se estabilizar. A solução mais indicada para aplicação do teste é aquela que, a partir da ordem decrescente de osmolaridade, não apresentar aumento na porcentagem de células enroladas. O

sêmen, empregado na padronização do teste hipo-osmótico, foi coletado por meio de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes.

Parte das amostras seminais obtidas entre janeiro e agosto de 2004 foi destinada à padronização do teste hipo-osmótico. Foram feitas três séries de análises para determinação da melhor solução hipo-osmótica¹, mensurando a porcentagem de caudas enroladas.

As análises imediatas das amostras seminais e a preparação das alíquotas submetidas ao estresse osmótico foram feitas no Galpão de Recria da FCAV/UNESP, enquanto que as laboratoriais (% de caudas enroladas, concentração e morfologia espermática) foram realizadas no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. As atividades desenvolvidas nessa etapa foram:

- ◆ Determinação da osmolaridade normal do plasma seminal de perdizes criadas em cativeiro: centrifugou-se o sêmen por 10 minutos. O sobrenadante foi pipetado e levado para o osmômetro. Registrou-se o valor identificado pelo aparelho e confeccionou-se soluções com osmolaridade igual (iso-osmótica) e inferior (hipo-osmótica).
- ◆ Tubos plásticos identificados com rótulo contendo o valor da osmolaridade da solução, número e box do animal, foram colocados em banho-maria a 37°C. Cada tubo continha 300µl da respectiva solução que se diferenciava também pela cor do tubo. Em cada série avaliou-se soluções iso e hipo-osmóticas.
- ◆ Para o teste foram adicionados 2µl de sêmen em cada série de tubos plásticos, essas amostras ficaram em banho-maria por 30 minutos e em seguida adicionou-se 50µl de formol salino, para interromper a atividade da membrana do espermatozóide. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 5°C até o momento das análises laboratoriais.
- ◆ No laboratório, as amostras foram homogeneizadas em agitador magnético e uma alíquota de 5µl, colocada entre lâmina e lamínula, foi levada ao microscópio de luz num aumento de 400x², para contagem de 200 células, categorizadas em caudas enroladas e não enroladas.

¹ Apêndice

5.3 APLICAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO

Após a padronização do teste hipo-osmótico, este foi empregado em 81 amostras, obtidas entre os meses de agosto e dezembro de 2004, usando os meios de 300mOsm e 100mOsm, em acordo com a metodologia adotada no experimento de Padronização do Teste Hipo-Osmótico, sendo os resultados correlacionados com testes rotineiros de análise espermática.

Para obtenção da porcentagem de células espermáticas com membranas íntegras, subtraiu-se o total de caudas enroladas encontradas em cada solução hipo-osmótica pelo total da solução iso-osmótica e em seguida dividindo o resultado por 2, segundo a fórmula:

$$CMI = \frac{(CEHO - CEIO) \times 100}{200}$$

Onde: CMI – Porcentagem de células com membrana íntegra

CEHO – Número de caudas enroladas na solução hipo-osmótica

CEIO – Número de caudas enroladas na solução iso-osmótica

5.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram analisados através do aplicativo Guided Data Analysis e Analyst do programa SAS System for Windows V.8 (SAS, 2000).

No experimento de padronização do teste hipo-osmótico, empregou-se o aplicativo Guided Data Analysis para testar a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias da variável **porcentagem de espermatozóides com cauda enrolada**, nos diferentes meios hipo-osmóticos. Como não obedeceu à normalidade dos resíduos e não foi possível qualquer transformação, esta variável foi submetida à análise de variância não paramétrica NPAR1WAY, utilizando-se o

² Olympus Optical Co. Ltd., modelo BX50F4

teste de Kruskall Wallis para verificar o efeito dos tratamentos e o teste de Wilcoxon para comparar os tratamentos dois a dois.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os erros padrões das medias (média $\pm$ erro padrão). O nível de significância (p) utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05; considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (soluções hipo-osmóticas) para a variável resposta (cauda enrolada).

No experimento Aplicação do Teste Hipo-Osmótico, testou-se as possíveis correlações entre a variável resposta **porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra no meio de melhor resultado** e as demais variáveis descritas no espermograma através da correlação de Spearman. A descrição foi feita por meio do coeficiente de correlação (r) e do nível de significância (p).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do teste hipo-osmótico não atrapalhou a rotina da análise espermática, por ter uma metodologia simples e rápida.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO

Após a análise estatística dos dados de caudas espermáticas enroladas e não enroladas, encontrados nas soluções hipo-osmóticas e iso-osmótica de cada série, confeccionou-se as tabelas 2.1, 2.2 e 2.3.

Tabela 2.1 – Média e erro padrão da porcentagem média de caudas enroladas de espermatozóides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, submetidos á soluções com 100; 125; 175 e 300mOsm, amostras obtidas em janeiro de 2004 - Jaboticabal - SP – 2004

Osmolaridade (mOsm)	Células com cauda enrolada (%)
100	83,60 ± 3,39 ^a
125	79,00 ± 4,29 ^a
175	76,10 ± 4,23 ^a
300	14,86 ± 4,3 ^b

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

Tabela 2.2 – Média e erro padrão da porcentagem média de caudas enroladas de espermatozóides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, submetidos á soluções com 60; 100; 200 e 300mOsm, amostras obtidas em abril de 2004 - Jaboticabal - SP – 2004

Osmolaridade (mOsm)	Células com cauda enrolada (%)
60	75,66.± 3,11 ^a
100	84,52 ± 2,21 ^a
200	73,25 ± 3,32 ^a
300	20,85 ± 4,85 ^b

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

Tabela 2.3 – Média e erro padrão da porcentagem média de caudas enroladas de espermatozóides de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, submetidos á soluções com 50; 75; 100; 125 e 300mOsm, amostras coletadas em agosto de 2004 - Jaboticabal - SP – 2004

Osmolaridade (mOsm)	Células com cauda enrolada (%)
50	87,82 ± 1,46 ^b
75	92,60 ± 0,69 ^a
100	92,10 ± 0,98 ^{a, b}
125	90,42 ± 2,18 ^{a, b}
300	9,32 ± 2,07 ^c

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

As análises dos resultados indicam que soluções com 60 a 200mOsm apresentaram porcentagens variadas de enrolamento de cauda. Dentre as soluções de 200 e 100mOsm, houve um acréscimo da porcentagem ao passo que a osmolaridade diminuía. Porém nas soluções de 50 e 60mOsm ocorreu uma diminuição da porcentagem de células com a cauda enrolada. Isso poderia ser explicado por um tempo excessivo de contato das células com meios de osmolaridade extremamente baixa o que causaria um influxo de água tal que ocasionaria a ruptura da membrana plasmática, o extravasamento do conteúdo celular e desintegração do espermatozóide.

Porém, mais estudos seriam necessários, comparando-se os 30 minutos utilizados no presente experimento, com períodos mais curtos. Se tal hipótese fosse

comprovada, e um tempo menor apresentasse resultados adequados, a metodologia do teste hipo-osmótico poderia ser simplificada com um ganho de tempo considerável, principalmente no que se refere aos animais de produção. Pode-se dizer que nas condições deste experimento, a solução de 100mOsm pareceu ser a mais indicada pela facilidade da confecção e por ser utilizada em outras espécies (figuras 11 e 12).

Os dados de caudas enroladas dos espermatozoides das alíquotas incubadas no meio de 0mOsm não foram considerados nas análises estatísticas por apresentaram porcentagem elevada de alterações na cabeça e no acrossomo e não apresentaram o mesmo padrão de enrolamento de cauda das outras soluções, estando em acordo com Donoghue et al. (1996) os quais postularam que o valor crítico para perus é 19mOsm.

6.2 APLICAÇÃO DO TESTE HIPO-OSMÓTICO

O resultado da análise estatística das porcentagens de células espermáticas com membrana íntegra está descrito na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Média, erro padrão da média (EP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx), variância (Var) e coeficiente de variação (CV) da porcentagem de membrana íntegra, motilidade e vigor de células espermáticas de ejaculados (n=81) de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro, amostras obtidas entre agosto de 2004 e abril de 2005 - Jaboticabal - SP – 2004, 2005

Variável	Média	EP	Mín	Máx	Var	CV
Membrana íntegra	82,00	1,38	35	100	154,11	15,14
Motilidade (%)	77,16	2,02	0	90	330,59	23,56
Vigor (1-5)	3,03	0,11	0	5	1,04	33,87

Encontrou-se correlação positiva da porcentagem de membranas íntegras com a motilidade ($r=0,40$; $p=0,0002$) e com o vigor espermático ($r=0,34$; $p=0,0021$). Pode-se dizer que quanto maior a porcentagem de células com membrana íntegra, maior a

motilidade e o vigor, e vice-versa. Esse resultado já era esperado e está de acordo com Chan et al. (1985); Fuse et al. (1991) e Jeyendran et al. (1984). Essas correlações sugerem a validação biológica do teste para amostras seminais de perdizes de cativeiro.

A determinação da porcentagem de membrana espermática íntegra não necessita de equipamentos sofisticados e demonstrou ser uma atividade rápida, simples e fácil (DUCCI et al., 2002; JEYENDRAN et al., 1984; TARTAGNI et al., 2004) podendo ser empregada na rotina da avaliação seminal de perdizes e de outras aves selvagens.

Faz-se necessário estudo *in vivo* para demonstrar a capacidade fecundante das amostras avaliadas pelo teste hipo-osmótico, como os realizados por Tartagni et al. (2004).

CAPÍTULO 3 – DILUIÇÃO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

1 INTRODUÇÃO

A coleta de sêmen é uma biotécnica de aplicabilidade tanto na área de pesquisa quanto de produção sendo complementada pela possibilidade de estoque das amostras obtidas. O estoque pode ser por um tempo curto ou longo, dependendo da técnica empregada. Se as amostras são mantidas em refrigerador, a viabilidade é mais curta, porém quando criopreservadas em nitrogênio líquido, tem sua durabilidade indeterminada. Até o presente momento, as duas técnicas ainda não foram descritas para perdizes em cativeiro, sendo que no presente trabalho, serão descritos a metodologia e os achados de motilidade e vigor espermático de amostras preservadas por até 48h.

A inseminação artificial (I.A.) é uma biotecnologia, empregada em empreendimentos agroindustriais, cujo objetivo é incrementar a produtividade. Na avicultura industrial esta ferramenta tem se mostrado de grande utilidade, sendo algumas vezes indispensável para obtenção de ovos férteis, como no caso de linhagens pesadas de peru.

O intervalo entre as inseminações, a dose inseminante ideal, assim como a comparação entre os índices reprodutivos de animais inseminados e acasalados são as etapas iniciais na implantação de um programa de I.A.

A possibilidade de estoque das amostras seminais obtidas complementa os estudos e ampliar a aplicação da I.A. O estoque pode ser por um tempo curto ou longo, dependendo da técnica empregada. Se as amostras são mantidas em refrigerador, a viabilidade é mais curta porém quando criopreservadas em nitrogênio líquido, tem sua durabilidade indeterminada.

Até o presente momento, as duas técnicas ainda não foram descritas para perdizes em cativeiro, sendo que no presente trabalho serão descritas algumas etapas para implantação de um programa de I.A., além dos achados de motilidade e vigor espermático de amostras preservadas por até 48h.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A I.A. viabiliza o sucesso de criações de aves silvestres de interesse zootécnico, conservacionista ou ornamental, pois pode minimizar os efeitos deletérios que a estratégia reprodutiva de espécies monogâmica ou poliândrica causa sobre a produção de ovos férteis. A possibilidade de estocar o sêmen potencializa as vantagens da I.A. e viabiliza o desenvolvimento de pesquisas na área de andrologia, ginecologia, genética, biologia celular e molecular, entre outras.

2.1 DILUIÇÃO E REFRIGERAÇÃO

A diluição e estocagem de sêmen requer um diluente apropriado. Para estocar por curtos períodos é preciso fazer a diluição na proporção adequada e manter em temperatura controlada. Não existe um diluente universal para aves, devido às variações entre as diferentes espécies na composição do plasma seminal, nos sistemas enzimáticos e requerimentos metabólicos dos espermatozóides (LAKE; CHERMS; WISHART, 1984).

A temperatura ideal de estoque do sêmen de galo varia entre 5-15°C, durante o estoque os espermatozóides utilizam carboidratos (glicose ou frutose) do diluidor como fonte de energia para manter a motilidade (SEXTON; FEWLASS, 1978).

A composição iônica do diluente geralmente é baseada na composição do plasma seminal (LAKE; CHERMS; WISHART, 1984). Porém, dependendo da temperatura de estoque, a concentração de íons ou de cátions pode variar (CHAUDHURI; LAKE, 1988) e meios completamente diferentes podem ser usados com os mesmos resultados.

3 HIPÓTESE

As células espermáticas de perdizes podem ser estocadas e se manter viáveis em curto prazo, sendo tal viabilidade, dependente do tipo de meio diluidor utilizado.

4 OBJETIVOS

Diluir amostras seminais de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) em quatro extensores diferentes, descrevendo a variação da motilidade e do vigor imediatamente após a diluição e com 24 e 48h mantidas a 5°C.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades deste experimento foram realizadas no ciclo de postura de 2004-2005 e as amostras empregadas para descrição da motilidade e do vigor espermático após diluição e refrigeração foram oriundas do excedente do experimento de coleta de sêmen.

5.1 ANIMAIS, ALOJAMENTO E COLETA DE SÊMEN

Os animais, as condições de alojamento, manejo e coleta de sêmen empregados neste experimento foram os mesmos descritos no experimento de Coleta de Sêmen.

5.2 AVALIAÇÃO, DILUIÇÃO E REFRIGERAÇÃO SÊMEN

Um pré-experimento com 20 amostras diluídas no meio para sêmen de peru¹ foi empregado para descrever a motilidade e vigor espermático. As variáveis foram aferidas logo após a adição do diluidor, bem como 24 e 48h sob refrigeração, obedecendo-se os seguintes passos:

- ◆ Preparação do material: Antes da coleta, colocou-se no banho-maria a 37°C alguns microtubos plásticos vazios identificados na tampa com o número e box do animal e o diluidor comercial para sêmen de peru.
- ◆ Diluição: Depositou-se em microtubos plásticos o conteúdo restante das amostras do experimento de coleta de sêmen. Determinou-se a concentração espermática e em seguida adicionou-se a quantidade de diluidor necessária para obter-se a proporção de 20×10^6 spz/ml.

¹ Ovodyl – 016549; IMV, 10, Rue Clémenceau – BP 81 – 61302 L'Aigle Cedex, France

- ◆ Análise imediata: Após a diluição, uma alíquota de 5µl da amostra era depositada entre lâmina e lamínula e levada ao microscópio de luz para descrição da motilidade e do vigor espermático (CAVALCANTE et al., 2004), esse instante foi denominado de tempo zero (T 0).

- ◆ Refrigeração: Os tubos contendo as amostras eram levados a geladeira em um recipiente de vidro contendo água a 37°C. 24 e 48h depois efetuava-se nova análise de motilidade e vigor. Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente.

Após esse ensaio, utilizou-se concomitantemente ao diluidor de peru, dois meios de cultivo celular: TCM 199² e TQC⁸. Para realização das análises foram empregadas 48 amostras e seguiu-se metodologia descrita acima, com algumas alterações:

- ◆ Empregou-se a solução fisiológica a 0,9% (SF) como solução controle.
- ◆ Para diminuir o tempo de exposição das amostras ao meio ambiente e viabilizar as atividades, adotou-se o valor de 2µl de sêmen em 198µl de diluidor como padrão de diluição, ao invés de calcular a concentração espermática.
- ◆ Antes da coleta, tubos plásticos eram preenchidos com as soluções e levados para o banho-maria a 37°C e cada solução diluidora tinha uma cor pré-determinada de tubo, para facilitar a anotação dos achados durante as observações de 24 e 48h.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente experimento obedeceu a um arranjo fatorial 4x3, sendo os fatores respectivamente Meio (SF, Peru, TCM, TQC) e Tempo (0, 24 e 48 horas). A variáveis observadas em cada tempo foram motilidade e vigor.

² Nutricell, campinas-SP

5.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Através do aplicativo Guided Data Analysis e Analyst, do programa SAS System for Windows V.8 (SAS, 2000), os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Como não obedeceram a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) quando a normalidade não foi obtida, empregava-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias Meio (SF, Peru, TCM, TQC) e Tempo (0, 24 e 48 horas), assim como da interação entre os dois fatores. Caso fosse observada a interação entre os fatores, utilizou-se o teste Tukey de médias para comparação entre os 12 tratamentos da interação. Caso contrário, apenas os efeitos principais de cada um dos fatores foram analisados.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os erros padrões das medias (média $\pm$ erro padrão). O nível de significância (p) utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05; considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis independentes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises das três etapas do experimento de diluição estão descritos a seguir, dentro de cada tópico. Como as amostras foram o excedente das obtidas no experimento de coleta de sêmen, os resultados das análises imediatas e laboratoriais já foram citados e discutidos anteriormente.

6.1 AVALIAÇÃO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

Os resultados de motilidade e vigor obtidos das 20 amostras diluídas com o extensor seminal de peru foram tabulados e analisados, encontrando-se dispostos na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Variação da motilidade e vigor espermático de amostras seminais de perdizes (n= 20) diluídas em extensor comercial para sêmen de peru em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004

TEMPO	MOTILIDADE (%)	VIGOR (0-5)
0	68,8 ± 27,8 ^a	2,6 ± 1,0 ^a
24	37,1 ± 23,7 ^b	1,0 ± 0,8 ^b
48	24,7 ± 18,8 ^b	0,7 ± 0,8 ^b

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

Esse ensaio revelou que os valores de vigor e motilidade diferiram estatisticamente entre o tempo zero e os demais. Como essas análises foram feitas ainda no início do ciclo e não havia outro meio sendo testado concomitantemente, não foi possível identificar a causa exata dessa diferença entre as variáveis antes e depois da refrigeração.

A metodologia empregada nesse ensaio apresentava algumas limitações de aplicação quando testados mais de um meio, portanto, as alterações no protocolo se mostraram úteis tornando as atividades mais simples de serem executadas nas condições do experimento. Os resultados das análises estatísticas dos dados encontram-se nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4.

Tabela 3.2 – Teste de probabilidades para os efeitos principais de tempo de refrigeração (0, 24 e 48 horas), dos meios diluidores (SF, TCM 199, diluidor de peru e TQC), e da interação entre ambos (tempo*meios) sobre a motilidade e o vigor espermáticos de amostras seminais de perdizes (n= 48) - Jaboticabal - SP – 2004

	Tempo (P)	Meio (P)	Tempo * Meio (P)
Motilidade	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Vigor	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Na tabela 3.2 podemos verificar que houve efeito da interação entre tempo de refrigeração e meio de diluição tanto sobre a motilidade como sobre o vigor espermáticos. Sendo assim, não foi possível verificar o efeito de cada fator separadamente, sendo a análise realizada levando-se em conta os 12 tratamentos da interação previamente citada.

Tabela 3.3 – Variação da motilidade espermática de amostras seminais de perdizes (n= 48) diluídas em solução fisiológica (controle), extensor comercial para sêmen de peru e em meios de cultura celular TCM199 e TQC em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004

MEIO	0h	24h	48h
SF	79,0 ± 2,2 ^{a,E}	0,00 ^{dG}	0,00 ^{dG}
PERU	79,0 ± 2,2 ^{a,E}	55,8 ± 2,7 ^{bF}	31,5 ± 2,8 ^{bG}
TCM199	79,0 ± 2,2 ^{a,E}	63,8 ± 2,5 ^{aF}	47,9 ± 3,2 ^{aG}
TQC	79,0 ± 2,2 ^{a,E}	21,3 ± 1,9 ^{cF}	12,0 ± 1,7 ^{cG}

^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferença estatística entre meios, num mesmo momento (p<0,05).

^{E, F, G} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tempos, num mesmo meio (p<0,05).

Tabela 3.4 – Variação do vigor espermático de amostras seminais de perdizes (n= 48) diluídas em solução fisiológica (controle), extensor comercial para sêmen de peru e meios de cultivo celular TCM199 e TQC em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004

MEIO	0h	24h	48h
SF	3,2 ± 0,1 ^{a,E}	0,00 ^{dG}	0,00 ^{dG}
PERU	3,2 ± 0,1 ^{a,E}	1,9 ± 0,1 ^{bF}	0,9 ± 0,1 ^{bG}
TCM199	3,2 ± 0,1 ^{a,E}	2,1 ± 0,1 ^{aF}	1,3 ± 0,1 ^{aG}
TQC	3,2 ± 0,1 ^{a,E}	0,5 ± 0,2 ^{cG}	0,3 ± 0,1 ^{cG}

^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferença estatística entre meios, num mesmo momento (p<0,05).

^{E, F, G} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tempos, num mesmo meio (p<0,05).

Os valores da motilidade e do vigor no tempo zero foram os mesmos para as soluções, isso indica que é possível utilizar qualquer uma delas para descrição da motilidade e do vigor em análises imediatas. Para facilitar a visualização das diferenças, elaborou-se os gráficos 3.1 e 3.2.

a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística entre meios, num mesmo momento ($p < 0,05$).
E, F, G Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tempos, num mesmo meio ($p < 0,05$).

Gráfico 3.1 – Variação da motilidade espermática de amostras seminais de perdizes (n= 48) diluídas em extensor comercial para sêmen de peru em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004

a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística entre meios, num mesmo momento ($p < 0,05$).
E, F, G Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tempos, num mesmo meio ($p < 0,05$).

Gráfico 3.2 – Variação do vigor espermático de amostras seminais de perdizes (n= 48) diluídas em extensor comercial para sêmen de peru em função do tempo, durante três observações num período de 48h - Jaboticabal - SP – 2004

Quando comparou-se os valores de motilidade e vigor de cada meio, observou-se diferenças estatísticas entre o tempo zero e o demais, apesar de não haver diferenças entre os tempos 24 e 48h.

Analisando os dados de acordo com os meios, o TCM 199 apresentou os melhores resultados após o estoque em refrigerador, diferindo estatisticamente dos demais meios testados.

Sabendo-se que a motilidade e o vigor estão interligados com o sucesso da fecundação, pode-se sugerir que dentre os meios analisados, o TCM 199 apresentou os melhores resultados, demonstrando-se ideal para a preservação das amostras refrigeradas, causando uma diminuição na queda da motilidade e vigor quando comparado com o meio TQC e o diluidor para sêmen de peru. O sêmen de perdiz pode ser estocado por um prazo curto, porém considerável, sendo que este prazo depende do meio utilizado na diluição e estocagem.

CAPÍTULO 4 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (I.A.) é uma biotecnologia, empregada em empreendimentos agroindustriais, cujo objetivo é incrementar a produtividade. Na avicultura industrial esta ferramenta tem se mostrado de grande utilidade, sendo algumas vezes indispensável para obtenção de ovos férteis, como no caso de linhagens pesadas de peru.

O intervalo entre as inseminações, a dose inseminante ideal, assim como a comparação entre os índices reprodutivos de animais inseminados e acasalados são as etapas iniciais na implantação de um programa de I.A., sendo estes tópicos portanto, o objeto de estudo do presente experimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A I.A. viabiliza o sucesso de criações de aves silvestres de interesse zootécnico, conservacionista ou ornamental, pois pode minimizar os efeitos deletérios das espécies com estratégia reprodutiva monogâmica ou poliândrica, sobre a produção de ovos férteis.

2.1 COLETA DE SÊMEN

De acordo com Malecki et al. (1996), o sêmen de aves pode ser coletado por massagem manual, eletroejaculação e vagina (cloaca) artificial. A escolha do método varia de acordo com a espécie a ser manipulada.

Em frangos (*Gallus gallus domesticus*, Linnaeus, 1758), perus (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758) e galinhas d'angolas (*Numida meleagridis*, Linnaeus, 1758), a coleta de sêmen é realizada por meio de massagem abdominal no dorso e movimentos nas laterais da cloaca. Geralmente, três ou quatro sessões são suficientes para condicionar os machos, postula (ETCHES, 1996).

Hemberger et al. (2001) coletaram sêmen de avestruz (*Struthio camelus*, Linnaeus, 1766) introduzindo a mão na cloaca e expondo o falo. Em alguns animais, esse procedimento foi o suficiente para que o sêmen escorresse em tubo estéril, porém em outros animais foi necessária a manipulação das papilas seminais para obtenção das amostras. Durante os procedimentos, os animais encontravam-se com um capuz sobre a cabeça.

Utilizando a mesma metodologia, Góes et al. (2004) também conseguiam coletar amostras seminais de ema (*Rhea americana*) por manipulação digital.

O emu (*Dromaius novaehollandiae*, Latham, 1790) pode direcionar seu interesse sexual para humanos. As fêmeas assumem a postura de cópula, agachando-se e elevando a cauda; os machos também podem seguir as pessoas, assumir a postura de cortejo e investir o corpo de encontro a elas. Tal comportamento facilita a coleta de sêmen pelo método da cloaca artificial, pois os

animais são rapidamente condicionados, diminuindo o tempo exigido para essa atividade (MALECKI et al., 1996).

Barnabe et al. (2001) observaram que o sêmen de emas (*Rhea americana*, Linnaeus, 1758) escorre pelo sulco fálico após massagem na base do pescoço e no falo.

2.2 ANATOMIA FEMININA

O sistema genital feminino de aves é formado por ovário, oviduto, glândula da casca (útero), vagina e cloaca, porém, o ovário e o oviduto esquerdos são atrofiados. O oócito, após a ovulação, é captado pelas fímbrias do infundíbulo, que o direciona ao sítio de fecundação. A partir deste momento, o oócito (não fecundado) ou ovo (fecundado) se desloca em direção ao magno e ao ístimo, onde se formam o albúmem e a membrana interna da casca do ovo, respectivamente. Em seguida, ele é deslocado para o útero, para formação da casca e deposição de pigmentos. Nesse momento o ovo encontra-se pronto e passa rapidamente pela vagina e cloaca chegando ao meio externo ao animal (ETCHES, 1994).

A região de conexão entre o útero e a vagina é denominada junção útero vaginal (JUV) ou zona hospedeira de espermatozóides. Após a cópula ou inseminação artificial, os espermatozóides são estocados em invaginações do epitélio de revestimento. A viabilidade espermática nesses sítios varia com a espécie e a qualidade do sêmen utilizado (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Bakst et al. (1994) sugerem que todas as aves são capazes de armazenar espermatozóides em sítios de estocagem, por dias ou semanas, durante a estação reprodutiva. Esses sítios estão localizados na junção útero-vaginal, e têm importante papel na seleção e na estocagem espermáticas.

2.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

O emprego da técnica de I.A. na indústria avícola envolve o desenvolvimento de técnicas de coleta de sêmen, sistemas de manutenção de machos para elevada produção de sêmen, tecnologia para preservação de sêmen e I. A e sistemas de manutenção de fêmeas com elevada produção de ovos férteis. Nas agroindústrias produtoras de peru, frango, pato, ganso e galinha d'angola utiliza amplamente I.A. (LAKE; STEWART, 1978).

A utilização da inseminação artificial tem apresentado bons resultados em criações de diferentes aves silvestres, principalmente no grupo de espécies com comportamento poliândrico – do qual a perdiz faz parte –, e monogâmico ou cujos machos se restringem a pequenos grupos de fêmeas.

A dose de sêmen deve ser depositada entre 2 a 4cm dentro do orifício da vagina de galinhas e peruas, evertido com o auxílio de pressão no abdômen, preconizam Donoghue e Wishart (2000). A inseminação artificial pode ser feita com o auxílio de seringa ou tubos plásticos. Em larga escala, são utilizados equipamentos automáticos que liberam doses em valores fixos, previamente regulados.

Em patos e gansos, a inseminação é, em parte, dificultada pela anatomia da vagina, que não permite a eversão e visualização da abertura da mesma (COOPERS, 1977).

Após a inseminação, os espermatozóides passam para zonas especializadas preenchidas por glândulas hospedeiras de espermatozóides, localizadas na junção útero-vaginal (JUV). Tais glândulas podem armazenar de 50 a 200 células, orientadas em grupos, com os eixos paralelos ao comprimento da glândula. Estudos anteriores sugerem que uma única inseminação, com aproximadamente 100×10^6 de espermatozóides, faz com que fêmeas de peru e galinhas produzam ovos férteis por até 10 e 3 semanas, respectivamente (ETCHES, 1994).

Investigando a quantidade de espermatozóides estocada na fêmea após inseminações com concentrações variáveis (25, 50 e 100×10^6 spz/dose), Brillard e McDaniel (1986) constataram que, quanto maior a concentração espermática maior o número de espermatozóides estocados nas glândulas hospedeiras de

espermatozóides da JUV. Entretanto, em concentrações superiores a 100×10^6 spz/dose, o número de espermatozóides estocados não aumentou.

O número de fêmeas que pode ser inseminado com um único ejaculado depende do número de espermatozóides requeridos por dose e a frequência das inseminações. Os galiformes geralmente são inseminados semanalmente, quanto maior for o intervalo entre as inseminações, menores serão as taxas de fertilidade (BAKST et al., 1994). Apesar do crescente interesse pela fisiologia e biotecnologia da reprodução em aves silvestres, empregadas na produção de carnes nobres, a literatura científica referente à perdis ainda é muito escassa, não sendo encontrados relatos sobre inseminação artificial.

3 HIPÓTESE

É possível desenvolver uma técnica de inseminação artificial para perdizes criadas em cativeiro e aplicá-la como ferramenta biotecnológica para descrever as diferenças significativas entre as taxas de fertilidade de perdizes acasaladas e inseminadas, quando criadas em cativeiro, sendo tal diferença dose-dependente.

4 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

- ◆ Padronizar a técnica de inseminação artificial para a espécie.
- ◆ Estimar a duração em dias da produção de ovos férteis após a inseminação.
- ◆ Comparar o desempenho reprodutivo de perdizes acasaladas e inseminadas com quatro doses inseminantes diferentes, por meio da observação dos índices reprodutivos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades tiveram início em julho de 2004 e terminaram em janeiro de 2006. Neste período, utilizou-se 32 machos e 128 fêmeas de acordo com o delineamento experimental.

5.1 ANIMAIS E ALOJAMENTO

Os animais empregados nos experimentos para padronizar a técnica de inseminação, estimar a duração em dias da produção de ovos férteis após a inseminação (intervalo entre inseminações), e comparar os índices de animais acasalados e inseminados foram provenientes do Galpão de Reprodução de Perdizes localizado ao lado do Galpão de Recria descrito anteriormente.

No início do experimento, 32 machos e 128 fêmeas com mais de três anos, ou seja, que já passaram por no mínimo dois ciclos de postura, foram alojados na proporção de um macho para quatro fêmeas.

Quando todos os boxes do experimento já haviam iniciado a reprodução, 16 quintetos foram desfeitos, os machos foram retirados do contato com as fêmeas e alojados em grupos de quatro aves por box, e as fêmeas que ficaram sem os machos permaneceram nos boxes de origem formando o grupo inseminado (GI, n= 64). Os outros 16 quintetos não foram remanejados para servirem de controle (GC, n= 80).

O GI foi subdividido e alojado em 16 boxes, em seguida sorteou-se o grupo de machos e a dose inseminante de cada box de GI. Cada grupo de machos sempre doava sêmen para os mesmos quatro GI, mudando apenas a concentração da dose inseminante.

5.2 COLETA E ANÁLISE DE SÊMEN

Cada macho doador de semen à coleta e análise de sêmen segundo o método descrito no experimento de Coleta de Sêmen. Os ejaculados obtidos com no mínimo 80% de motilidade e vigor 3 foram acondicionados num único tubo plástico por grupo, formando um *pool* de sêmen por box.

5.3 INTERVALO ENTRE INSEMINAÇÕES

Para estimar o período entre inseminações, utilizou-se os dados dos ovos postos no período de julho a setembro de 16 boxes. Anotou-se o dia em que as fêmeas desses boxes foram separadas dos machos e a partir daí observou-se quando foram postos os primeiros ovos inférteis de cada box. Os resultados foram tabulados por box e a média de dias foi considerada como intervalo entre inseminações.

5.4 DOSE INSEMINANTE

Aguardou-se até duas semanas após o último ovo fértil para proceder inseminação do GI. O *pool* de cada box de doadores foi empregado em quatro GI nas doses: 10; 20; 30 e 40x10⁹sptz/dose inseminante. Para fracionar o sêmen nestas concentrações, imediatamente após a análise, uma alíquota de 1µl de sêmen foi adicionada em 499µl de formol salino¹, homogeneizada e a concentração estimada pelo método da Câmara de Neubauer (CAVALCANTE et al., 2004).

Após a determinação da concentração da amostra, empregava-se a operação matemática de regra de três, para conhecer o volume de sêmen de cada dose

¹ Apêndice

inseminante. Sabendo-se o volume de sêmen, calibrava-se uma pipeta automática de precisão, pipetava-se o volume desejado e procedia a inseminação.

5.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

As inseminações foram realizadas sempre no período do dia oposto ao da oviposição, ou seja, as fêmeas que botavam ovos pela manhã eram inseminadas a tarde e vice-versa.

As penas da região pericloacal eram removidas para facilitar a visualização da cloaca. O auxiliar segurava a fêmea com a região posterior mais elevada que a anterior, enquanto o inseminador introduzia a ponteira da pipeta aproximadamente 1cm no interior da cloaca em direção a vagina, onde o sêmen era depositado.

Após a inseminação, aguardava-se alguns minutos e cuidadosamente devolvia-se a fêmea para o boxe de origem.

5.6 MANEJO DOS ANIMAIS E DOS OVOS

Os animais empregados neste experimento foram submetidos às mesmas instalações e manejo descritos no experimento anterior.

Durante os ciclos de postura de 2004-2005 e 2005-2006, os ovos provenientes das fêmeas do experimento de inseminação artificial foram coletados diariamente e identificados com etiquetas adesivas contendo o número do ovo. Após a coleta e identificação, os ovos foram incubados no Departamento de Morfologia da FCAVJ/UNESP.

Antes de ligar a incubadora, limpava-se cada uma com bucha sintética embebida em detergente líquido e água, em seguida acoplava-se uma garrafa com água no local específico do aparelho e colocava-se no interior um béquer de vidro com formol a 10%. Após 5h, retirava-se o béquer, colocava-se os cilindros plásticos responsáveis pelo giro dos ovos e calibrava-se a temperatura e umidade do interior do aparelho, que eram de 36°C e 60% respectivamente. As incubadoras foram

mantidas numa sala com temperatura ambiente entre 14-16°C, para evitar os efeitos deletérios da grande amplitude térmica da região.

Ao chegar do galpão, os ovos eram borrifados com solução desinfetante de amônia quaternária e levados para incubadora². Após o 7º dia de incubação, os ovos eram submetidos à ovoscopia e classificados em férteis (presença de embrião e vasos sanguíneos) ou claros (ausência de embrião e vasos sanguíneos).

Após 14 dias de incubação, nova ovoscopia era realizada e os ovos eram classificados como *vivos* (embrião móvel e desenvolvido e vasos sanguíneos rubros) ou *mortos* (embrião imóvel e pequeno e vasos sanguíneos enegrecidos).

No 17º dia de incubação os ovos eram pesados, colocados em sacos individuais de nylon tecido com abertura de 2,0mm, e levados para o nascedouro⁴ até a eclosão.

Os ovos férteis e vivos retornavam para incubadora e os claros, mortos ou com mais de 28 dias de incubação eram submetidos ao embriodiagnóstico para confirmação do resultado da ovoscopia pelo aspecto da gema (ovos claros) ou do embrião (ovos fecundados).

5.7 ÍNDICES REPRODUTIVOS

Os índices reprodutivos observados durante o experimento foram:

- ◆ Ovos totais= todos os ovos que foram postos
- ◆ Ovos viáveis= só os que foram incubados
- ◆ Ovos férteis= com presença de embrião em qualquer estágio
- ◆ Ovos eclodidos= apenas os ovos que eclodiram
- ◆ Taxa de aproveitamento= ovos totais/ovos viáveis
- ◆ Taxa de postura= ovos totais/número de fêmeas
- ◆ Taxa de fertilidade= ovos férteis/ovos viáveis
- ◆ Taxa de eclodibilidade= ovos eclodidos/ovos férteis
- ◆ Taxa de eclosão= ovos eclodidos/ovos férteis+brancos

² Premiun Ecológica

5.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram analisados através do aplicativo Guided Data Analysis e Analyst do programa SAS System for Windows V.8 (SAS, 2000).

A unidade experimental empregada no presente experimento foi o valor médio de cada box, isto é, os valores totais dos índices reprodutivos de cada box, divididos pelo número de fêmeas do mesmo. Portanto, os resultados finais representam a média dos índices reprodutivos por fêmea por box.

Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Para a taxa de aproveitamento, um dos boxes comportou-se como outlier (7,7%) sendo então, removido da análise para esta variável. Os valores das variáveis **ovos totais**, **taxa de postura** e **ovos viáveis** foram transformados para raiz quadrada, sendo então, conjuntamente com a taxa de aproveitamento, analisados pela análise de variância paramétrica (Teste de Tukey). As variáveis **ovos férteis**, **ovos eclodidos**, **taxa de fertilidade**, **taxa de eclodibilidade** e **taxa de eclosão** não obedeceram às premissas, sendo então analisadas através da análise de variância não paramétrica NPAR1WAY, utilizando-se o teste de Kruskal Wallis para verificar o efeito dos tratamentos e o teste de Wilcoxon para comparar os tratamentos dois a dois.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e os erros padrões das médias (média $\pm$ erro padrão). O nível de significância (p) utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05; considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o experimento algumas fêmeas morreram por retenção de ovos ou por outras causas, sendo o depósito de urato no pericárdio e sacos aéreos, achados freqüentes na necropsia dessas aves.

6.1 EXPERIMENTO – INTERVALO DE INSEMINAÇÃO

Como observado em anos anteriores, as fêmeas não iniciam o ciclo reprodutivo no mesmo período. Os primeiros ovos de algumas fêmeas foram observados no mês de agosto, enquanto que outras só iniciaram a reprodução em janeiro ou fevereiro.

Para viabilizar os experimentos que dependiam do resultado obtido nessa fase, determinou-se uma data limite para retirada dos machos dos boxes, mesmo que as fêmeas destes ainda não tivessem iniciado a postura.

Em 12 de outubro 2004, dos 16 quintetos destinados ao experimento para estimar o intervalo entre as inseminações, quatro ainda não haviam iniciado a reprodução, então estes foram excluídos das análises realizadas nessa etapa e os machos retirados dos boxes para serem empregados em outro experimento.

As demais fêmeas entraram em postura antes dessa data e os resultados indicam que, como a maioria das aves, as fêmeas de perdiz podem estocar espermatozóides, pois estas foram separadas dos machos e continuaram a produzir ovos férteis por até $31 \pm 1,5$ dias (média $\pm$ desvio padrão), sendo que os primeiros ovos inférteis foram postos $17,92 \pm 1,1$ dias. A média encontrada para galinhas e peruas é de 10 e 3 semanas, respectivamente (BAKST et al. 1994; DONOGHUE; WISHART, 2000; ETCHES, 1994).

6.2 EXPERIMENTO COMPARAÇÃO DA I. A. COM A MONTA NATURAL

A análise estatística dos dados forneceu os resultados que estão demonstrados nas tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 – Produção de ovos de fêmeas de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e empregadas em monta natural e inseminação artificial com diferentes doses de sêmen. Médias $\pm$ erro padrão da média (ovos por fêmea) de ovos totais, viáveis, férteis e eclodidos - Jaboticabal - SP – 2004-2005

Ovos	Monta natural	Inseminação artificial (Dose - 10^6 sptz/ml)			
		10	20	30	40
Totais	7,67 $\pm$ 1,09 ^{ab}	4,54 $\pm$ 1,27 ^a	10,38 $\pm$ 1,75 ^{ab}	9,31 $\pm$ 3,68 ^{ab}	15,50 $\pm$ 4,73 ^b
Viáveis	4,91 $\pm$ 0,83 ^{ab}	3,33 $\pm$ 1,64 ^a	7,00 $\pm$ 1,47 ^{ab}	7,94 $\pm$ 3,16 ^{ab}	10,77 $\pm$ 3,91 ^b
Férteis	2,22 $\pm$ 0,29 ^{ab}	0,83 $\pm$ 0,51 ^a	2,71 $\pm$ 0,99 ^{ab}	4,44 $\pm$ 1,81 ^b	3,65 $\pm$ 1,66 ^{ab}
Eclodidos	0,33 $\pm$ 0,13	0,15 $\pm$ 0,09	0,17 $\pm$ 0,17	0,75 $\pm$ 0,42	0,21 $\pm$ 0,12

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

A análise da tabela 4.1 demonstra que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores de ovos férteis de fêmeas inseminadas nas diversas doses quando comparado com a monta natural, apesar de ter ocorrido entre as doses 30 e 10×10^6 sptz/ml. Esperava-se que houvesse um incremento de ovos férteis, proporcional ao aumento da dose inseminante, mas não foi observada diferença estatística entre as doses de 30 e 40×10^6 sptz/ml (BRILLARD; MCDANIEL, 1986). A dose inseminante de 30×10^6 sptz/ml apresentou o dobro de ovos eclodidos que a monta natural, sugerindo que esta dose poderia ser empregada em substituição à monta natural, sem que haja desvantagem para a produção de ovos férteis, podendo ocorrer um ganho numérico em relação ao valores de ovos férteis e eclodidos. Porém mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

Tabela 4.2 – Médias $\pm$ erro padrão da média (ovos por fêmea) das taxas de postura, aproveitamento, fertilidade, eclodibilidade e eclosão de fêmeas de perdiz (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro e empregadas em monta natural e inseminação artificial com diferentes doses de sêmen - Jaboticabal - SP – 2004-2005

Taxas (%)	Monta Natural	Inseminação artificial (Dose x 10 ⁶ sptz/ml)			
		10	20	30	40
Postura	7,7 $\pm$ 1,09 ^{ab}	4,5 $\pm$ 1,27 ^a	10,3 $\pm$ 1,75 ^{ab}	9,3 $\pm$ 3,68 ^{ab}	15,5 $\pm$ 4,73 ^b
Aproveitamento	61,2 $\pm$ 3,55 ^a	82,6 $\pm$ 8,81 ^b	69,7 $\pm$ 11,92 ^{ab}	87,4 $\pm$ 4,51 ^b	67,2 $\pm$ 5,54 ^{ab}
Fertilidade	42,7 $\pm$ 7,93	25,1 $\pm$ 12,96	34,5 $\pm$ 7,05	56,6 $\pm$ 4,11	30,6 $\pm$ 4,8
Eclodibilidade	19,9 $\pm$ 8,23	16,1 $\pm$ 11,80	3,9 $\pm$ 3,85	22,9 $\pm$ 9,89	4,6 $\pm$ 3,38
Eclosão	8,8 $\pm$ 3,40	6,9 $\pm$ 4,72	1,9 $\pm$ 1,85	13,9 $\pm$ 6,88	1,5 $\pm$ 0,99

^{a, b} Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Nas condições deste experimento, apenas as taxas de postura (número de ovos totais / número de fêmeas x 100) e a de aproveitamento (número de ovos viáveis / número de fêmeas x 100), apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

A taxa de postura variou com o aumento da dose inseminante, porém não foram encontrados relatos científicos que explicassem esse resultado. Por outro lado, impossibilidade de verificar diferença estatística entre os animais acasalados e inseminados é um dado importante quando o objetivo é implantar o sistema de inseminação artificial, pois indica que a fêmea não precisa de estímulos do macho para manter a postura.

De acordo com o exposto anteriormente, a taxa de aproveitamento foi maior nos tratamentos com dose inseminante de 10 e 30 x 10⁶sptz/ml quando comparados com a monta natural. Sabendo-se que na espécie *Rhynchotus rufescens*, o macho é o responsável pela incubação dos ovos, esperava-se que no GC (monta natural), essa taxa fosse maior, pois os machos iriam proteger os ovos das bicadas das fêmeas. Uma explicação para esse fato é que animais mantidos em cativeiros nem sempre se comportam como em vida livre (SICK, 1997).

Esses achados demonstram que as taxas de fertilidade, eclodibilidade e eclosão de animais acasalados e inseminados não são diferentes estatisticamente, porém são necessários mais estudos na área de inseminação artificial de perdizes, principalmente para descrever o mecanismo de estocagem espermática no sistema genital da fêmea.

7 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados e das informações científicas disponíveis concluiu-se que, nas condições do presente experimento:

Foi possível colher sêmen de perdiz por meio de pressão digital na base do falo e nas ampolas dos ductos deferentes e descrever o espermograma baseando-se nas técnicas empregadas para aves domésticas.

A célula espermática da perdiz responde a meios iso-osmóticos através do enrolamento de cauda, sendo este enrolamento, proporcional à diminuição da osmolaridade do meio até um limite de 100mOsm, sendo este o meio ideal para o emprego do teste hipo-osmótico como indicador da integridade da membrana espermática nesta espécie.

Os resultados da variação da motilidade e do vigor espermático imediatamente após a diluição e com 24 e 48h sob refrigeração demonstraram que as quatro soluções testadas são aptas para diluição e extensão de amostras seminais utilizadas a fresco. Porém, após a refrigeração, o TCM 199 demonstrou menor interferência na motilidade e vigor espermáticos, comparativamente aos demais extensores estudados.

Os índices reprodutivos de animais acasalados e inseminados não diferiram entre si, demonstrando que a inseminação artificial é uma ferramenta biotecnológica de valor relevante no manejo reprodutivo de perdizes criadas em cativeiro.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artemed, 2004. 1584 p.
- ALKAN, S.; BARAN, A.; ÖZDAŞ, Ö. B.; EVECEN, M. Morphological defects in turkey semen. **Turkey Journal Veterinary Animal Science**, v. 26, p. 1087-1092, 2002.
- BAJPAI, P. K. The effect of photoperiodicity on semen characteristics of poultry. **Poultry Science**, v. 42, n. 1, p. 462-465, 1963.
- BAKST, M. R.; WHISHART, G.; BRILLARD, J.P. Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry. **Poultry Science Review**, v. 5, p. 117-143, 1994.
- BARALDI-ARTONI, S. M. **Características morfológicas do sistema genital de perdiz (*Rhynchotus rufescens*)**. 2002. 100 f. Tese (Livre Docência em Morfologia e Fisiologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- BARALDI-ARTONI, S. M.; ORSI, A. M.; PACHECO, M. R.; ARAUJO, M. L.; CRUZ, C.; SIMÕES, K.; MORO, E. G. Anatomia macroscópica da porção fixa e eversível do falo da perdiz *Rhynchotus rufescens*. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2001, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2001. p. 228.
- BARNABE, V. H.; GÓES, P. A. A.; ZÜGE, R. M.; CELEGHINI, E. C. C.; ROMITTO, G. C.; PAZ, R. C. R.; CAVALCANTE, A. K. S.; BARNABE, R. C.; NICHI, M.; GIANNONI, M. L. Reproductive parameters evaluation in Rhea (*Rhea americana*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001, Salvador. **Anais...** Salvador: Impressora Rocha, 2001. p. 249.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BOTINO, F.; BARALDI-ARTONI, S. M.; CRUZ, C.; SIMÕES, K.; OLIVEIRA, D.; ORSI, A. M.; CARVALHO, A. C. F.; ROQUE, A.; FRANZO, V. S. Estudo morfométrico do testículo de perdiz no decorrer do ano. In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2003. 203 p.

BRILLARD, J. P.; MCDANIEL, G. R. Influence of spermatozoa number and insemination frequency on fertility in dwarf broiler breeder hens. **Poultry Science**, v. 65, p. 2330-2334, 1986.

BULL, M. L. Anatomia do aparelho reprodutor do macho e da fêmea. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1994, Campinas, **Anais...** Campinas: FACTA, 1994. p. 1-10.

BURROWS, W. H.; QUINN, J. P. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. **Poultry Science**, v. 14, n. 4, p. 251-254, 1935.

CAVALCANTE, A. K. S.; GÓES, P. A. A.; NICHI, M.; HATAMOTO, L. K.; MANTOVANI, A. P.; BERTOLA, R. P.; LILLA, M. P.; THOLON, P.; BRUNELI, F. A. T.; TAVIAN, A. F.; GABRIEL, J. M.; QUEIROZ, S. A.; TONHATI, H.; BARNABE, V. H. Evaluation of seminal characteristics in captive male partridges (*Rhynchotus rufescens*) raised in São Paulo state - preliminary results. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. v. 1, p. 225.

CELEGHINI, E. C. C. Avaliação do método de seleção de galos (*Gallus gallus domesticus*) para a reprodução pelo desenvolvimento da crista com relação a idade a puberdade, características seminais e testiculares. 2000. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

CESÁRIO, M. D. Gametogênese e histologia dos aparelhos reprodutores. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS (Campinas). **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: APINCO, 1994. p. 13-30.

CHAN, S. Y.; FOX, E. J.; CHAN, M. M.; TSOI, W.; WANG, C.; TANG, L. C.; TANG, G. W.; HO, P. The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. **Fertility Sterility**, v. 44, p. 668-672, 1985.

CHAUDHURI, D.; LAKE, P. E. A new diluent and methods of holding fowl semen for up to 17h at high temperature. In: WORLD POULTRY CONGRESS, 18., 1988, Nagoya, Japan. **Proceeding...** Nagoya: Japan **Poultry Science** Association, p. 591-596.

CLARKE, R. N.; BAKST, M. R.; OTTINGER, M. A. Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. **Poultry Science**, v. 63, n. 4, p. 801-805, 1984.

DONOGHUE, A. M.; GARNER, D. I.; DONOGHUE, D. J.; JOHNSON, L. A. Assessment of the membrane integrity of fresh and stored turkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress, fluorescent staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 46, p. 153-163, 1996.

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

DUCCI, M.;GAZZANO, A.;VILLANI, C.; CELA, V. ; ARTINI, P. G.; MARTELLI, F.; GENAZZANI, A. R. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 102,n. 1, p. 53-56, 2002.

ETCHES, R. J. Inseminação artificial. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: APINCO, 1994. p. 117-127.

ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. Cambridge: University Press, 1996. 318 p.

FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS (Fundação SEADE). Disponível em: <<http://www.guiacultural.sp.gov.br/>>. Acesso em: 06 nov. 2004.

FUSE, H.; KAZAMA, T.; KATAYAMA T. Relationship between hypoosmotic swelling test, semen analysis, and zona-free hamster ovum test. **Archive Andrology**, v. 27, n. 2, p. 73-78, 1991.

GÓES, P. A. A.; Características reprodutivas de emas machos (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no estado de São Paulo. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 237-257.

HEMBERGER, M. Y.; HOSPES, R.; BOSTEDT, H. Semen collection, examination and spermiogram in ostriches. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 241-243, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/>>. Acesso em: 06 nov. 2004.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JIMENEZ II, M.; JIMÉNEZ, M. G. La martineta colorada, *Rhynchotus rufescens*. **El Zoológico Electrónico**. Disponível em: <http://www.damisela.com/zoo/ave/ratities/tinam/rufescens/taxa.htm>. Acesso em: 11 ago. 2002.

JOHNSON, A. L. Reproduction in the male. In: STURKIE, P. D. (Ed.). **Avian physiology**. 4. ed. New York: Springer-Verlag, 1986. p. 432-451.

KING, A. S.; McLELLAND, J. **Birds: their structure and function**. 2. ed. Baillière Tindall: London, 1984. 334 p.

LAKE, P. E. Fowl semen as collected by the massage method. **Journal of Agricultural Science**, v. 49, p. 120-126, 1957.

LAKE, P. E.; CHERMS, F. L.; WISHART, G. J. Effect of aeration on the fertilizing ability of turkey semen stored for 48h at 5 and 15°C: A study from the 33rd to the 47th week of age. **Reproduction Nutrition Development**, v. 24, p. 147-153, 1984.

MAEDA, T.; TERADA, T.; TSUTSUMI, Y. Studies of the factors causing abnormal acrosomes and crooked-necks in fowl spermatozoa during freezing and thawing. **British Poultry Science**, v. 27, n. 4, p. 695-702, 1986.

MAHECHA, G. A. B.; CÂMARA, B. G. O.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, C. A. Variação sazonal dos ductos eferentes da perdiz *Rhynchotus rufescens* In: CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 2003, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2003. RAS16. 2003. 1 CD-ROM.

MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B.; LINDSAY, D. R. Semen production by the emu (*Dromaius novaehollandiae*). 1. Methods for collection of semen. **Poultry Science**, v. 76, p. 615-621, 1996.

MARETTA, M. Formation and role of the manchette microtubules in the poultry spermatids. **Acta Veterinaria Brno**, v. 64, n. 1, p. 23-29, 1995.

MARTÍNEZ, F. A.; GAUNA AÑASCO, L.; TROIANO, J. C.; NUÑEZ, S.; RIGONATTO, T.; DUCHENE, A.; JUEGA SICARDI, J.; STANCATO, J. M. Tinamiformes del

nordeste argentino: estado actual. In: Universidad nacional del nordeste, **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, 2000. Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/4_veterinarias/v_pdf/v_039.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2006.

MIES FILHO, A. **Inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1987. p. 396-397.

MORO, M. E. G. **Desempenho e características de carcaças de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas com diferentes programas de alimentação**. 1996. 75 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista/Jaboticabal, 1996.

MORO, M. E. G.; TAVARES, F. A.; LIMA, C. G. Desempenho reprodutivo da perdiz (*Rhynchotus rufescens*) submetida a diferentes níveis energéticos na ração. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 1, p. 13-18, 2000.

OKAMURA, F.; NISHIYAMA, H. The early development of the tail and the transformation of the shape of the nucleos of the spermatid of the domestic fowl, *Gallus gallus*. **Cell and Tissue Research**, v. 169, n. 3, p. 345-359, 1976.

PROUDMAN, J. A. Hormônios reprodutivos das aves. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS (Campinas). **Fisiologia da reprodução de aves**. Campinas: APINCO, 1994. p. 31-48.

SAS. THE STATISTICAL ANALYZE SYSTEMS FOR WINDOWS Versão 8. Cary: SAS. 1999-2001.

SEGURA-CORREA, J. C.; AGUAYO-ARCEO, A. M. Edad a la pubertad y características seminales de gallos Rhode Island y Criollos Cuello Desnudos bajo condiciones tropicales. **Veterinária México**, v. 26, n. 4, p. 375-379, 1995.

SEXTON, T. J.; FEWLASS, T. A. A new poultry semen extender. 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C. **Poultry Science**, v. 57, p. 277-284, 1978.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 912.

TARTAGNI, M.; CICINELLI, E.; SCHONAUER, M. M.; CAUSIO, F.; PETRUZZELLI, F.; LOVERRO, G. Males with subnormal hypo-osmotic swelling test scores have lower pregnancy rates than those with normal scores when ovulation induction and timed intercourse is used as a treatment for mild problems with sperm count, motility, or morphology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 5, p. 498-502, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A

FÓRMULA DA SOLUÇÃO DE FORMOL SALINO

Ingredientes para 500ml:

Solução de “BUFFER” estoque – 100ml

- a. Na_2PO_4 – 3,2523g e H_2O destilada – 70ml
- b. KH_2PO_4 – 1,33524g e H_2O destilada – 30ml

Solução estoque de NaCl – 150ml

- c. NaCl – 2,703g
- d. H_2O destilada – 150ml

Formalina comercial (formol a 37 ou 40%) – 62,5ml

H_2O destilada q.s.p.

FÓRMULA DA SOLUÇÃO ISO-OSMÓTICA (300mOsm)

Ingredientes para 500ml:

- 7,35g citrato de sódio di-hidratado
- 13,51g de frutose
- 500ml de água bi-destilada

Verificar a osmolaridade após o preparo

APÊNDICE B

Figura 1 – Início da coleta de sêmen.

Figura 2 – Coleta de sêmen.

Figura 3 – Término da coleta de sêmen.

Figuras 4 e 5 – Falo, porção fixa e eversível, respectivamente.

APÊNDICE C

Figuras 6 e 7 – Sistema genital masculino de perdiz durante o período reprodutivo, detalhe das papilas dos ductos deferentes.

Figuras 8; 9 e 10 – Fotomicrografia de espermatozóide com cabeça dobrada, cauda dobrada e peça intermediária com debris celulares (1000x).

Figuras 11 e 12 – Fotomicrografia do padrão de enrolamento de cauda segundo a osmolaridade da solução, 300 e 100, respectivamente (400x).