

## Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas<sup>1</sup>

*Advances in physiology of reproduction in poultry*

**Fernando Rutz, Marcos Antonio Anciuti, Eduardo Gonçalves Xavier,  
Victor Fernando B. Roll, Patricia Rossi**

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil  
anciuti@brturbo.com.br

### Resumo

Na indústria avícola, a fertilidade em matrizes pesadas é um ponto crítico, uma vez que determina o máximo retorno econômico a partir do número e da qualidade dos pintos produzidos por ave alojada. A eficiência reprodutiva de matrizes é determinada pela carga genética e por fatores ambientais como instalações, programa de luz, nutrição e manejo, que influenciam a capacidade de atingir este potencial. Para alcançar o desempenho reprodutivo máximo é necessário o conhecimento de fatores que influenciam a maturidade sexual, ovulação, fertilização, formação do ovo e oviposição. Em reprodução de matrizes, a biotecnologia encontra aplicação na inseminação artificial. Além disso, avanços tem sido feitos na criopreservação do semen.

**Palavras-chave:** matrizes, ovos, semen, galos .

### Abstract

*Number and quality of chicks per hen housed are used as yardstick of reproductive performance in the poultry industry. Factors such as genetics, environment, housing, lighting program, nutrition and management are determinant in reaching that goal. Furthermore, the understanding of factors that influence sexual maturity, ovulation, fertility, egg formation and oviposition help to reach such a potential. In breeder reproduction, biotechnology is applied to artificial insemination and cryopreservation of semen.*

**Keywords:** breeder, eggs, semen, rooster.

### Introdução

Na indústria avícola, a fertilidade em matrizes pesadas é um ponto crítico, uma vez que determina o máximo retorno econômico a partir do número e da qualidade dos pintos produzidos por ave alojada. A eficiência reprodutiva de matrizes é determinada pela carga genética e por fatores ambientais como instalações, programa de luz, nutrição e manejo, que influenciam a capacidade de atingir este potencial. Para alcançar o desempenho reprodutivo máximo é necessário o conhecimento de fatores que influenciam a maturidade sexual, ovulação, fertilização, formação do ovo e oviposição.

Importante coadjuvante da reprodução animal tem sido a biotecnologia. Segundo Brillard (2006), esta pode ser aplicada desde a inseminação artificial até a manipulação de embrião, transferência de gens e sexagem. Entretanto, o rápido desenvolvimento destas tecnologias em mamíferos contrasta com aplicações relativamente limitadas em aves. Isto pode ser explicado pela dificuldade em acessar o oócito e o embrião de aves. Além disso, a transferência embrionária, comumente realizada em mamíferos, não pode ser considerada de interesse prático em aves devido a condições inerentes a sua própria fisiologia reprodutiva. Apesar das restrições supracitadas, o desenvolvimento de técnicas ligadas a inseminação artificial e de criopreservação de semen são uma realidade. Este trabalho visa abordar aspectos ligados a fisiologia reprodutiva, aplicações biotecnológicas e condições práticas de campo dentro da avicultura.

### Sistema reprodutivo da fêmea

O aparelho genital da galinha é composto por um ovário e um oviduto, que se localizam do lado esquerdo da cavidade abdominal da ave. Durante o período embrionário, o oviduto e o ovário do lado direito estão inicialmente presentes. Entretanto, a produção de substâncias inibidoras do ducto de Müller (origem do oviduto) pelo ovário resulta em regressão do ducto direito e do ovário direito, mas não do esquerdo. O ducto esquerdo é aparentemente protegido por apresentar maior número de receptores para estrogênio, sendo assim, mais sensível ao estrogênio que o ducto direito. Aparentemente o estrogênio impede a ação de substâncias inibidoras do ducto de Müller (Bahr e Johnson, 1991).

<sup>1</sup>Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

### *Ovário: desenvolvimento folicular e papel endocrinológico*

O ovário de mamíferos e de aves difere. Em mamíferos, diversos folículos podem ovular em um determinado momento dentro de um intervalo de vários dias ou semanas, enquanto que em aves um único folículo ovula e o óvulo (gema) é liberado, mas dentro de um intervalo mais curto (preferencialmente todos os dias). Além disso, tendo em vista que o embrião deve obter todos os nutrientes para o desenvolvimento embrionário, o óvulo maturo de aves é muito maior que o de mamíferos. Nas aves, os folículos grandes e amarelos, destinados a ovulação estão organizados dentro de uma hierarquia.

O controle da hierarquia folicular que permite a ovulação diária é estabelecido pelos folículos pequenos (6 a 8 mm). O folículo amarelo que ultrapassar 8 mm em diâmetro, entra em hierarquia, continua a desenvolver e ovula. Entretanto, eventos moleculares dentro de folículos menores (< 8 mm) fazem com que muitos folículos entrem em atresia (regridem), enquanto outros folículos são selecionados para entrar em hierarquia (Johnson, 1993).

Uma das principais funções dos ovários é a produção de hormônios esteróides, essenciais para o crescimento e função do trato reprodutivo. A progesterona atua na secreção de albúmen e indução do pico de LH. Os androgênios atuam em características sexuais secundárias (crista e barbela). Os estrogênios atuam na síntese da gema pelo fígado, mobilização de cálcio dos ossos medulares para a glândula da casca. Ao contrário de mamíferos, as células da granulosa são a principal fonte de progesterona e de pequenas quantidades de androgênios, enquanto que as células da teca produzem androgênios e estradiol. É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, porque não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, uma estrutura associada a prenhez (Bahr e Johnson, 1991).

### *O oviduto: suas secreções e implicações no desenvolvimento embrionário*

O desenvolvimento do oviduto é estimulado por vários hormônios gonadais, embora a ação da progesterona seja mais direcionada para células secretórias, tais como aquelas responsáveis pela produção de avidina. Estrogênio e androgênio promovem o desenvolvimento de uma variedade de tecido glandular, muscular e conjuntivo dentro do oviduto.

Resumidamente, o oviduto e as partes que o compõe podem ser descrito da seguinte forma. O oviduto é separado anatomicamente em cinco partes. A primeira parte é o infundíbulo, que capta o óvulo logo após a sua liberação pelo ovário e, caso ocorrer a presença de espermatozóide, ocorre a fertilização. Este é um processo eficiente, onde a fertilidade é uma característica atribuída ao galo, enquanto que o desenvolvimento embrionário é de responsabilidade da fêmea. O magno é a região responsável pela secreção de albúmen, sendo esta a parte mais longa do oviduto. O istmo é a região mais curta, onde se formam as membranas da casca. O útero, ou glândula da casca, é um órgão muscular e secretório, onde o fluido é adicionado ao ovo e ocorre a formação da casca do ovo e deposição da cutícula. A vagina serve de passagem do ovo do útero até a cloaca. Na região útero-vaginal estão localizadas as glândulas hospedeiras de espermatozóides. Os espermatozóides ali se armazenam após a inseminação artificial ou monta natural, quando então se deslocam em via ascendente em direção ao infundíbulo.

### *Vagina e glândulas hospedeiras de espermatozóides*

As espécies avícolas apresentam semelhanças no trato reprodutivo com outras espécies animais (ex. répteis) devido a presença de sítios especializados no trato feminino, no qual os espermatozóides residem durante períodos prolongados após uma cópula. Existem dois sítios distintos nas espécies avícolas, um localizado na junção útero-vaginal e o outro na porção inferior do infundíbulo. Em ambos os sítios, os espermatozóides são armazenados nas glândulas hospedeiras, que se caracterizam por ser invaginações do epitélio do lúmen do túbulo (Bakst *et al.*, 1994). As glândulas localizadas na junção útero-vaginal são consideradas o principal sítio de armazenamento de espermatozóide no oviduto. Já no infundíbulo vai ocorrer a fertilização. Estas glândulas armazenam espermatozóides durante um período de 3 a 4 semanas em galinhas e 8 a 15 semanas em peruas (Brillard, 1993), embora a percentagem de ovos férteis começa a cair dentro de 5-7 dias na galinha e de 14-21 dias na peru.

Normalmente 50-200 células espermáticas entram nas glândulas e se orientam paralelamente ao longo da glândula. A aglutinação de cabeça com cabeça dos espermatozóides é a possível explicação para a manutenção prolongada *in vivo* dos espermatozóides nas glândulas (Tingari e Lake, 1973). O mecanismo que causa a liberação das células espermáticas das glândulas não é conhecido, mas isto possivelmente ocorra com uma redução progressiva na capacidade espermática em aglutinar.

Ao avançar a idade, a duração da fertilidade é reduzida após uma única inseminação ter sido realizada. No passado foi postulado que isto ocorria em função de uma redução na capacidade de armazenamento espermático nas glândulas hospedeiras (Van Krey *et al.*, 1967). Alternativamente, Brillard (1993) sugere que o

declínio na duração da fertilidade com a idade resulta de uma maior facilidade da liberação dos espermatozoides das glândulas hospedeiras.

#### *Seleção espermática*

A quantidade de espermatozoides depositados na vagina das aves excede (em bilhões) o número de células espermáticas necessárias para fertilizar de 1 a 15 oócitos. Pesquisas conduzidas em perus e galináceos demonstraram que somente de 1-2% da população inicial de espermatozoides alcançam as glândulas hospedeiras da junção útero-vaginal. Destes, aproximadamente 1% (ou 0,0001% da dose utilizada na inseminação artificial) alcançam o infundíbulo (Brillard e Bakst, 1990; Brillard, 1993; Bakst *et al.*, 1994). Na realidade, estudos iniciais demonstraram que a migração espermática aos sítios de armazenamento é um processo ativo onde a motilidade individual e progressiva é necessária. Assim, espermatozoides mortos ou que não apresentam motilidade não alcançam as glândulas hospedeiras de espermatozoides (Allen e Grigg, 1957).

Tendo em vista que muitos estudos tem consistentemente registrado a ausência de espermatozoides morfológicamente anormais (ex. peça intermediária dobrada, cabeça dupla e flagelo duplo) no lúmen das glândulas hospedeiras de espermatozoides, pode ser concluído que existe um mecanismo altamente eficiente na seleção espermática na vagina para eliminar grande parte da população espermática inicial, criando assim condições para a seleção de uma subpopulação limitada mas altamente selecionada de espermatozoides (<1% da dose inicial; Brillard, 1993).

#### *Neuroendocrinologia reprodutiva*

O sistema reprodutivo é basicamente regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal. A maturação do eixo hipotalâmico-hipofisiário-gonadal do embrião ocorre já aos 13 dias de incubação (Woods, 1987). Entretanto, ainda nos períodos iniciais do desenvolvimento embrionário, este é capaz de sintetizar uma variedade de hormônios esteróides (Guichard *et al.*, 1973). O cérebro concentra sinais neurais e hormonais de origem endógena e exógena. Esta informação é usada para controlar a pituitária, gônadas e outros órgãos direta ou indiretamente. Várias áreas do cérebro são utilizadas, mas o principal ponto de tradução de sinais neurais em controle hormonal ocorre no hipotálamo, localizado numa região na base do cérebro, próximo da pituitária. As células neurosecretoras do hipotálamo comunicam diretamente com a pituitária anterior através de um sistema porta. Este transporta hormônios do hipotálamo até a pituitária. Os neurônios que sintetizam o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) fazem parte de um sistema neural primário essencial para o desenvolvimento da reprodução. Existem pelo menos oito tipos indentificados de GnRH (Muske *et al.*, 1994). Em aves foram identificados dois tipos de GnRH, o GnRH I (King e Millar, 1982a, b) e o GnRH II (Miyamoto *et al.*, 1984). Aparentemente o GnRH I é a forma funcional (Proudman, 1993). A função do GnRH II não está definida em aves. Evidência indica que o GnRH II estimula o comportamento sexual em aves (Maney *et al.*, 1997). Estes hormônios determinam quando os gonadotrofos (secreção de LH e FSH) ou lactotrofos (secreção de prolactina) devem promover a sua secreção. Estudos com codorna indicaram que o LHRH estimula a liberação tanto do LH como do FSH (Hattori *et al.*, 1986). O LH é responsável por estimular a produção de progesterona no folículo maturo, além de provocar o rompimento do folículo e a ovulação. No macho, o LH age nos testículos e induz a produção de androgênios.

Em aves ocorre a presença de outro hormônio hipotalâmico importante, que é o peptídeo intestinal vasoativo (VIP). Este hormônio foi inicialmente descoberto no intestino. No cérebro de aves, o VIP atua na liberação de prolactina pela pituitária anterior. A imunização de peruas com VIP para neutralizar VIP endógeno resulta em redução nos níveis de prolactina e na incidência de choco e no aumento da produção de ovos (El Halawani e Noll, 1995; El Halawani *et al.*, 1995).

O outro hormônio produzido pela pituitária é o FSH. O FSH pode estimular a produção de hormônios esteróides pelas células do folículo em desenvolvimento, particularmente dos folículos menores (Johnson, 1993). O FSH também é produzido por gonadotrofos, mas pouco se sabe se o LH e o FSH são produzidos pelos mesmos ou diferentes gonadotrofos.

#### *Pituitária posterior*

De importância na reprodução de aves, nesta região é secretada a arginina vasotocina, envolvida com a contração uterina e a oviposição (Shimada e Saito, 1989). O hormônio ovariano progesterona produz um aumento da afinidade entre a arginina vasotocina e o receptor no útero, aumentando a contração uterínica e a expulsão do ovo (Takahashi *et al.*, 1994). O aumento da ligação de receptores para progesterona antes da oviposição é causado por ação do estrogênio ou testosterona, ou ambos, porque a secreção destes hormônios aumenta várias horas antes da oviposição (Kawashima *et al.*, 1989).

### *Ovulação e oviposição*

O ciclo ovulatório é regulado por dois sistemas independentes e sem sincronia (Fraps, 1965). Um destes sistemas é a maturação dos sistemas esteroidogênicos do folículo mais desenvolvido (F1) (Johnson, 1990). Os folículos pequenos (< 10 mm) são as principais fontes de estrogênio. Ao alcançar a puberdade, o estrogênio produz feedback negativo a nível da pituitária propiciando a redução na produção de LH. Uma via funcional está presente nos folículos maiores até 12 a 20 horas antes da ovulação. O folículo F1 perde a capacidade de converter progesterona em androstenediona e, conseqüentemente, a produção de progesterona pelos folículos aumenta devido a ação do LH. Na realidade, a progesterona estimula a síntese e secreção de LHRH pelo hipotálamo (Knight *et al.*, 1985). A concentração do LH plasmático apresenta um pico 4 a 6 horas antes da ovulação (Johnson e van Tienhoven, 1980). Este pico de LH é essencial para que ocorra a ovulação (Johnson, 1990).

A ovulação ocorre aproximadamente 6 horas após o pico de LH e de 15-45 minutos após a oviposição. Ao avaliar a parede celular do folículo, pode ser observada uma região estruturalmente diferente, caracterizada por ser avascular, que é denominada de estigma. Esta região é composta pelo epitélio, teca interna e externa e camada granulosa. A teca externa é composta principalmente por fibroblastos e matriz extracelular de colágeno. Antes da ovulação, a região do estigma aumenta em largura e torna-se transparente. O colágeno altera estruturalmente, tornando-se um tecido mais frágil. Estas alterações ficam restritas a região do estigma (Bahr e Johnson, 1991).

As alterações nas fibras do colágeno ocorrem por ação de enzimas, como collagenases e proteases, que atuam na dissociação do colágeno antes da ovulação. A atividade da collagenase aumenta com a maturação folicular. A dispersão das fibras de colágeno ocorre em função da alteração da matriz que mantém unida as fibras de colágeno. Com o rompimento do estigma ocorre a ovulação (Bahr e Johnson, 1991)

A arginina-vasotocina, um hormônio da neurohipófise está relacionado com a oviposição em galinhas (Proudman, 1993). A oviposição é um resultado de eventos sucessivos que ocorrem a nível do oviduto, incluindo contração do útero e peristaltismo da vagina. A contração do útero é causada pela ação da arginina-vasotocina, após se ligar a um receptor do miométrio do útero (Takahashi *et al.*, 1994). Durante este processo, atuam prostaglandinas.

A oviposição ocorre aproximadamente 24-26 horas após a ovulação e após o ovo ter sido formado no oviduto. As prostaglandinas e os hormônios da pituitária posterior são os mais importantes no processo da oviposição. Dentre as prostaglandinas se destacam a  $PGF_{2\alpha}$  e a  $PGE_2$ . A  $PGF_{2\alpha}$  atua na contração do útero da galinha, enquanto que a  $PGE_2$  atua na abertura útero-vaginal (Bahr e Johnson, 1991; Etches, 1996). Assim como nos mamíferos, ocorre um mecanismo de feedback entre a arginina-vasotocina e a prostaglandina na contração do útero e oviposição.

### *O ciclo ovulatório*

O ciclo ovulatório em galinhas é caracterizado por uma seqüência de ovos colocados. Esta consiste em um número de dias em que ocorre a oviposição, seguido por um dia de pausa. Assim, uma vez os mecanismos de feedback entre ovário, pituitária e hipotálamo alcançarem a maturidade de desenvolvimento, a matriz é capaz de produzir ovos. Incluído neste processo está o desenvolvimento do oviduto e a disponibilização de cálcio para a formação da casca do ovo, sob ação do estrogênio. Comparando a curva de produção de aves Leghorn com a de matrizes pesadas expostas a restrição alimentar, observa-se que as matrizes pesadas apresentam menor pico e persistência de postura (Robinson *et al.*, 1993).

### *Alterações no desempenho reprodutivo com a idade*

Matrizes pesadas geralmente começam a postura com 23 semanas de idade, alcançando 5% de postura (galinha-dia) a 24-25 semanas. Dentro de 6 semanas, alcançam o pico de postura (85-87%) e assim se mantém por 2-4 semanas. Após este período, ocorre um declínio gradual na produção de ovos, chegando a 55% de produção de ovos às 64 semanas de idade. O declínio na produção de ovos após o pico é mais rápido em matrizes pesadas do que em poedeiras, o que é comercialmente referido como falta de persistência. Em parte, este declínio no número de ovos ocorre devido a uma redução na seqüência, com uma maior proporção de dias onde não ocorre oviposição (Leeson e Summers, 2000).

Ao avançar o período de postura, o peso do ovo aumenta, a casca torna-se mais fina e piora a qualidade interna. Ocorre também uma alta incidência de ovos sem casca com o avançar da idade. Em um determinado momento, a galinha para de colocar ovos, o que geralmente é resultado do não engolfamento da gema pelo infundíbulo.

Com a idade, ocorre um maior intervalo entre ovulações e também um declínio na produção de ovos. Isto se deve a uma redução no recrutamento dos folículos para entrar em hierarquia e na atresia de folículos

pequenos. A redução na produção de ovos é indicativo de que está ocorrendo uma redução na taxa de ovulação. Folículos pré-ovulatórios de aves com idade mais avançada maturam mais vagarosamente e ovulam quando alcançam maior tamanho, comparativamente a folículos pré-ovulatórios de aves mais jovens.

#### *Fertilidade em fêmeas*

Dados obtidos da indústria avícola americana durante três anos demonstraram que dentre as causas responsáveis por perdas na eclosão, a principal é a infertilidade (40%), seguida por mortalidade embrionária precoce (27%), intermediária (6%), tardia (20%), descarte e refugos (7%) (McDaniel, 2002). Vários fatores contribuem para tal, sendo que a seleção para aumento de ganho de peso e de rendimento de cortes tem afetado adversamente o desempenho reprodutivo de matrizes pesadas (Reddy, 1994).

Leeson e Summers (2000) afirmam que após a ovulação, caso espermatozóides estiverem presentes no infundíbulo, vai ocorrer a fertilização. A galinha pode armazenar espermatozóides nas glândulas hospedeiras utero-vaginais e do infundíbulo durante um longo período após a inseminação artificial ou monta natural, resultando em produção de ovos férteis durante vários dias ou semanas (Bakst *et al.*, 1994). A duração da sobrevivência espermática é afetada por fatores intrínsecos do macho ou da fêmea. Ocorrem variações individuais ou de linhagens, na fertilidade, indicando diferenças na capacidade de armazenar e liberar espermatozóides. O efeito da fêmea sobre a fertilidade tem sido atribuído a diferenças na produção de ovos (Beaumont *et al.*, 1992) ou na composição corporal (Goerzen *et al.*, 1996). Além disso, fêmeas com pior qualidade de ovo a incubar geralmente apresentam pior fertilidade (Kirby *et al.*, 1998). Embora tenham observado diferenças na fertilidade, Kirby *et al.* (1998) não registraram diferenças na duração da fertilidade, ou seja, no número de dias em que a fêmea permanece fértil depois da inseminação. Ressalte-se que o efeito sobre a duração da fertilidade ocorre devido a uma interação entre a capacidade absoluta da célula espermática sobreviver no oviduto e do número de espermatozóides utilizados na inseminação (Bakst *et al.*, 1994).

#### *Fotoperíodo*

O fotoperíodo é um aspecto fundamental no desempenho reprodutivo das aves. Ao alterar a intensidade e duração do fotoperíodo, o hipotálamo altera a produção de fatores liberadores de gonadotrofinas (GnRH). Etches (1996) postulou três teorias para explicar o efeito da luz sobre a atividade reprodutiva: a) através do olho, b) através da glândula pineal ou c) diretamente sobre o hipotálamo. Destas teorias, a mais aceita atualmente é a da ação da luz diretamente sobre fotoreceptores hipotalâmicos, após atravessar a cavidade craniana (Etches, 1996).

As aves iniciam a fase reprodutiva após terem alcançado determinada idade e/ou peso corporal. Até aproximadamente 12 semanas de idade, as aves são insensíveis a luz. Aves submetidas a curtos fotoperíodos durante a recria alcançam a maturidade sexual a uma idade mais precoce e o início da produção de ovos após transferência para um longo fotoperíodo será rápida e de forma sincronizada. A idade e o peso da ave no início do fotoestímulo são fatores importantes na otimização da produção de ovos e na duração do ciclo reprodutivo. Em geral, pode ser recomendado que as matrizes tenham 2,2 kg de peso às 22 semanas de idade para serem fotoestimuladas (Leeson e Summers, 2000). Matrizes de corte muito pesadas ao alcançar a maturidade sexual apresentam hierarquia folicular anormal, onde ocorre uma alta incidência de ovos de gemas duplas, má produção de ovos e má qualidade da casca. Por isso, é prática comum na indústria não permitir o desenvolvimento corporal das aves antes da fotoestimulação. Após o início da produção, ainda é prática continuar com a restrição alimentar, impedindo o ganho de peso excessivo das matrizes. Esta prática requer bom manejo, porque uma dieta com nível muito baixo de cálcio, de energia ou de proteína iniciam eventos que prejudicam a produção de ovos. É importante salientar que matrizes são fotossensíveis, mas também podem se tornar fotorrefratárias. Nestas condições, a postura cai apesar de um longo fotoperíodo de exposição.

Dentre as alterações de manejo empregadas ultimamente, uma das mais importantes foi retardar o início da fotoestimulação de 21 para 23 semanas de idade. Parte dos efeitos em retardar a fotoestimulação foram estudados (Yuan *et al.*, 1994; Robinson *et al.* 1996). Este retardo na fotoestimulação tem sido considerado um ponto positivo, uma vez que as aves que estão aptas a iniciar a postura são forçadas a esperar por aquelas que ainda não alcançaram a maturidade sexual. Este retardo no crescimento resulta em melhora na uniformidade do peso corporal do lote.

### **Macho**

#### *Sistema reprodutivo do galo*

Os testículos de galos, em número de dois, correspondem a 1% do peso vivo das aves (Sturkie e Opel, 1976) e apresentam algumas particularidades que os diferem dos mamíferos. Eles estão localizados dentro da

cavidade abdominal. Esta apresenta uma temperatura de 41-43°C e mesmo assim ocorre a espermatogênese. A hipótese que explica a formação espermatogênica nestas condições é a de que poderia haver um resfriamento dos testículos através dos sacos aéreos abdominais.

Diferente da disposição em mamíferos, os túbulos seminíferos não estão agrupados em lóbulos bem delineados circundados por tecido conjuntivo, mas sim ramificam-se e anastomosam-se livremente dentro da túnica albugínea. No galo adulto, extensões da túnica penetram entre os túbulos para agirem como estrutura de suporte. O tecido intersticial é desprezível, porém contém as células de Leydig, que são secretoras de androgênios. Os túbulos seminíferos de galos imaturos são alinhados por uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias. Já os machos maduros possuem túbulos de forma irregular alinhados por um epitélio germinativo de múltiplas camadas. As espermatogônias dão origem aos espermátócitos primários, secundários e espermátides. Estas últimas progressivamente se transformam em espermatozóides, por um processo denominado espermiogênese (Bask e Bahr, 1995).

Os galos não possuem os epidídimos caracteristicamente enrolados e subdivididos como a maioria dos mamíferos. Os espermatozóides passam dos túbulos seminíferos, através dos túbulos retos, para os ductos eferentes. A partir dos dutos eferentes, os espermatozóides atravessam uma série de dutos conectados e são então transportados para o lúmen dos epidídimos. Em conjunto, estes dutos são denominados de região epididimária.

Assim, a região epididimária compreende os túbulos retos, dutos eferentes distais e proximais (dutos eferentes), um túbulo curto de conexão e o ducto do epidídimo (Hess *et al.*, 1976). Em aves, ductos compõe mais do que 70% da região epididimária, sugerindo que os ductos eferentes representam um componente mais importante da região epididimária que o túbulo reto ou ducto epididimário (Clulow e Jones, 1988). O epitélio dos dutos eferentes apresenta convulsões para aumentar a área de superfície do lúmen do ducto e consiste de células ciliadas e não ciliadas (Etches, 1996). As principais funções dos dutos eferentes em todas as espécies incluem reabsorção de fluido, transporte, concentração espermática e secreção protéica (Ilio e Hess, 1994).

O ducto do epidídimo abre-se dentro do ducto deferente o qual é o primeiro local de armazenamento de espermatozóides no galo. O ducto deferente é um tubo bastante enrolado, o qual na sua extremidade distal, torna-se reto e dilata-se levemente, passa através da parede da cloaca e termina como extensão semelhante a uma papila que se projeta dentro da cloaca.

Não existem órgãos acessórios tais como vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral associados ao ducto deferente. No galo que não tenha ejaculado, os espermatozóides atravessam o ducto deferente em cerca de 84 horas, ao passo que em machos que já ejacularam, os espermatozóides requerem 24 a 48 horas para atravessar (Etches, 1996).

O macho não tem um órgão penetrador (ex. pênis), porém um falo que faz contato com a vagina em eversão durante a cópula. A ereção do falo resulta em engurgitamento com um fluido semelhante a linfa derivado do corpo vascular paracloucal, uma extensão do falo localizado na parede da cloaca (Etches, 1996), 1995).

### *Endocrinologia reprodutiva*

A espermatogênese e a esteroidogênese a nível testicular é dependente de FSH, LH e androgênios (Kirby e Froman, 2000). Os testículos aumentam a taxa de espermatogênese no momento da puberdade e também produzem níveis mais elevados de androgênios nas células de Leydig. Este aumento é causado pela liberação do GnRH do hipotálamo, o que faz com que a pituitária libere FSH e LH. Estas glicoproteínas se ligam a receptores, particularmente nas células de Sertoli e de Leydig. A sua ação ocorre através de quinases dependentes de AMPc, que regulam os eventos intracelulares. O FSH regula o número e a atividade das células de Sertoli, promove genes para a síntese de proteínas vitais, tal como proteínas carreadoras de tiamina e transferrina e regula a produção de androgênios. A inibina e a activina são produzidas nos testículos e regulam a atividade do FSH através de feedback e ação parácrina. A inibina controla a produção de androgênios e inibe a secreção de FSH. A activina estimula a secreção de FSH e pode regular outra atividade. A folistatina pode modular os efeitos da activina e a folistatina pode estar envolvida no desenvolvimento folicular.

Um hormônio que tem chamado a atenção é a melatonina, hormônio produzido pela pineal. A melatonina reduz a atividade gonadal ao inibir a secreção de LH. Isto sugere que a melatonina apresenta uma ação a nível de hipotálamo, hipófise, ou em ambas (Rozenboim *et al.*, 2002). Em poedeiras Leghorn, este hormônio induz a hipotermia (Rozenboim *et al.*, 1997), sustentando a hipótese de que o hipotálamo é um órgão onde a melatonina age.

### *Princípios fundamentais, avaliação seminal e proteção antioxidante do sêmen de aves*

Os espermatozóides devem apresentar motilidade e sobreviver no ambiente vaginal para alcançar as glândulas hospedeiras de espermatozóides (criptas que armazenam espermatozóides na galinha durante longos períodos). Este armazenamento assegura a disponibilidade espermática e a probabilidade de fertilização. Após

ser liberado das glândulas hospedeiras de espermatozoides e transportado para o infundíbulo (local de fertilização) os espermatozoides devem ser capazes de se ligar e penetrar na membrana perivitelínica (camada simples não celular que envolve o óvulo) e fertilizar o óvulo. É importante que cada etapa seja bem sucedida para que ocorra o sucesso da fertilização.

Na avaliação dos espermatozoides algumas características devem ser identificadas: 1) Os espermatozoides devem apresentar motilidade para atravessar a vagina e alcançar as glândulas hospedeiras de espermatozoides; 2) O armazenamento de espermatozoides nas glândulas hospedeiras pode ser quantitativamente avaliado; 3) A capacidade do espermatozoide se ligar à membrana perivitelínica pode ser avaliada *in vitro*. Esta capacidade pode ser avaliada usando um extrato solubilizado da camada perivitelínica da gema para determinar a ligação espermática *in vitro* (Barbato *et al.*, 1998); 4) O número de espermatozoides presentes no local da fertilização no momento da ovulação pode ser estimado.

O número de perfurações espermáticas está correlacionado ao número de espermatozoides ligados na membrana perivitelínica externa e o número de espermatozoides armazenados nas glândulas hospedeiras de espermatozoides permitindo uma avaliação indireta da capacidade das glândulas hospedeiras de espermatozoides (Wishart, 1995).

Os espermatozoides são células altamente especializadas consistindo de várias estruturas de membrana. Suas propriedades físicas e integridade funcional determinam funções fisiológicas importantes, incluindo motilidade e capacidade fertilizante. Assim, a composição lipídica do sêmen de aves é um fator determinante na sua qualidade (Cerolini *et al.*, 1997). Espermatozoides de galos apresentam um alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (Surai, 2002). Estudo (Bongalhardo *et al.*, 2002) avaliou a estrutura, composição das membranas da cabeça e do corpo espermático de galos. A membrana plasmática da cabeça apresentou menos ácidos graxos poliinsaturados que o corpo espermático. A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide contém maior nível de esfingomielina e fosfatidilserina e menos fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina que a membrana do corpo espermático. A presença de tais ácidos graxos representa um risco para a ocorrência de peroxidação lipídica nas membranas espermáticas e é considerado causa de redução de fertilidade em machos (Wishart, 1984; Aitken, 1994).

Um sistema antioxidante é crucial para a manutenção da integridade da membrana espermática e para as propriedades fisiológicas, incluindo fluidez de membrana, flexibilidade e permeabilidade necessária para o processo de fertilização. Assim, um sistema antioxidante eficiente é necessário para proteger as membranas espermáticas da ação peroxidativa. Surai (2002) sugeriu um sistema antioxidante para espermatozoides que inclui três níveis de defesa, responsáveis para manter as funções espermáticas em várias condições de estresse. A superóxido dismutase juntamente com a glutatona peroxidase e proteínas carreadoras de metais, compreende a primeira linha de defesa antioxidante, responsável por impedir a formação de radicais livres. Antioxidantes naturais, juntamente com a glutatona peroxidase perfazem a segunda linha de defesa antioxidante que atua na prevenção e neutralização da formação da cadeia e sua propagação. O terceiro nível de defesa é em um sistema enzimático responsável pela reparação e remoção de moléculas lesadas na célula. Em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutatona, glutatona peroxidase e a superóxido dismutase. A mitocôndria é responsável pela produção de energia para manter a motilidade espermática. Durante este processo ocorre a formação de radicais livres. Assim, a presença de glutatona peroxidase nesta região auxilia na neutralização de radicais livres, impedindo a peroxidação lipídica e mantendo a qualidade espermática.

#### *Determinação da fertilidade verdadeira*

A simples presença de galos e galinhas juntos não assegura a fertilidade. Caso ocorrer a fertilização, o ovo quando é colocado recentemente e submetido a ovoscopia, não indica se o ovo está ou não fértil. Entretanto, isto é possível. Após ocorrer a fertilização a nível do oviduto, o ovo em formação permanece aproximadamente 24 horas dentro da galinha a uma temperatura de 42°C. Tal condição permite o início do desenvolvimento embrionário, de forma que quando ocorrer a oviposição, o embrião em desenvolvimento possui de 30000 a 60000 células já formadas (Etches, 1996). Estas podem ser identificadas a olho nu. No caso de ovos não fertilizados, a cicatrícula se encontra em uma forma de ponto branco solidificado, denominado de blastodisco. Já no ovo fertilizado, a cicatrícula é de cor acinzentada e com aspecto desuniforme, recebendo o nome de blastoderma.

A fertilidade verdadeira é então calculada através da relação entre ovos férteis e ovos examinados. Para qualquer lote, no mínimo 60 ovos deveriam ser examinados (Leeson e Summers, 2000). Recentemente, Bakst *et al.* (2002) registraram que a determinação da fertilidade verdadeira pelo exame do disco germinativo pode ser feito a partir de ovos trincados, mas não de casca mole. Da mesma forma, o disco germinativo e a camada perivitelínica cobrindo o disco germinativo foram passíveis de exames laboratoriais para verificar a perfuração na membrana perivitelínica. Os autores observaram ainda que o estágio de desenvolvimento embrionário estava correlacionado positivamente com a espessura da casca.

A determinação da fertilidade pelo exame da cicatrícula pode ser feito antes de incubar ovos ou mesmo

após 5 a 10 dias de incubação. Não é conveniente esperar 21 dias de incubação para proceder o exame, pois haverá dificuldade em reconhecer o desenvolvimento embrionário inicial.

#### *Seleção de galos jovens de linhagens de corte através da qualidade espermática*

Na indústria avícola, tradicionalmente a seleção dos galos não é feita através de características reprodutivas dos machos. A seleção dos galos é feita através da avaliação do tamanho da crista e da barbela, da cor, do peso corporal e do comprimento e aspecto das patas (Wilson *et al.*, 1979). Machos com peso muito baixo apresentam patas deformadas e são descartados. Entretanto, é importante enfatizar que as características físicas não apresentam uma correlação exata com a fertilidade do macho.

Antes ou durante o alojamento das aves no aviário de produção, as características seminais dos galos de matrizes pesadas podem ser avaliadas. De acordo com Donoghue (1999), os procedimentos de avaliação seminal podem ser uma técnica interessante no manejo dos galos (Hammerstedt, 1996). Entretanto, Donoghue (1999) afirmou que as avaliações da qualidade seminal para aves são laboriosas e de estimativa não confiável para fertilidade. Entretanto, um método de análise seminal rápido e que correlaciona com a concentração espermática, viabilidade e motilidade espermática em galos é o índice de qualidade espermática. Este teste é realizado por um analisador da qualidade espermática “OptiBreed”. O analisador tem uma fotocélula que monitora o número de vezes que o movimento espermático altera a direção da luz. Parker *et al.* (2000) selecionaram galos baseados no índice de qualidade espermática. Eles demonstraram que ao descartar galos com qualidade de sêmen inferior a 22%, a fertilidade do lote aumentava em 4% em relação a uma população não selecionada. Parker *et al.* (2001) registraram que sêmen de galos classificados como os 25% piores de um lote pelo índice de qualidade espermática fertilizaram 20% a menos ovos quando comparados com o sêmen de galos classificados dentre os 75% melhores.

Parker e McDaniel (2002) selecionaram 80% dos melhores galos de linhagens pesadas pelo teste de índice de qualidade espermática e compararam com galos selecionados unicamente por aparência física. A eclodibilidade foi aumentada em 1,1% em favor dos galos selecionados pelo índice de qualidade espermática. Os autores concluíram que o índice de qualidade espermática é um excelente método para avaliar a capacidade reprodutiva durante todo o período de postura das matrizes.

#### *Biotechnologia aplicada a reprodução de aves*

Brillard (2006) examinou recentemente a aplicação de técnicas ligadas a biotecnologia na reprodução de aves. Dentre as técnicas a serem consideradas estão aquelas envolvidas com o armazenamento de sêmen e com a transferência de gens em aves.

A utilização da inseminação artificial em perus resulta em taxas de fertilidade iguais ou superiores a 93%. Em matrizes pesadas, a utilização de inseminação artificial depende da disponibilidade de mão-de-obra e do custo de produção. Assim, apesar de tentativas bem sucedidas de utilização de inseminação artificial em matrizes pesadas anos nos anos 80, Estados Unidos e Europa, com algumas exceções, não desenvolveram programas de inseminação artificial devido ao alto custo de mão-de-obra e de instalações. Por outro lado, outros países (ex. Indonésia, Filipinas, Índia e China) têm usado regularmente a inseminação artificial em matrizes pesadas (Brillard, 2006).

O transporte e o manuseio de sêmen de um lote de machos para onde se encontram as fêmeas permitiu uma certa flexibilidade ao pessoal que trabalha com inseminação e propiciou o desenvolvimento de procedimentos eficientes para preservar o sêmen de aves em condições *in vitro* por algumas horas. Durante a década de 80 foram desenvolvidas várias técnicas de preservação de sêmen em aves (Sexton, 1982, Van Wambeke e Huyghebaert, 1989, Surai e Wishart, 1996), mas somente recentemente estas têm sido empregadas em operações comerciais. Estas técnicas permitem preservar o sêmen de galos e perus até por 12 horas. É importante salientar um declínio progressivo na viabilidade espermática durante o armazenamento *in vitro*. Neste particular, um melhor entendimento do metabolismo espermático e da proteção de membrana contra a peroxidação, conforme supramencionado, são fundamentais (Brillard, 2006).

Em avicultura, a criopreservação do sêmen é a única técnica acessível para preservar o germoplasma de aves durante um período prolongado de tempo (Tselutin *et al.*, 1999; Chalah *et al.*, 1999). Condições de congelamento e de descongelamento ideais ainda não foram completamente elucidadas (Surai e Wishart, 1996). O acesso a criopreservação do sêmen de aves pode propiciar um banco de gens e facilitar enormemente a transferência de gens específicos, promovendo, por exemplo, a resistência natural a certas doenças e infecções e também auxiliando na adaptação de linhagens pré-selecionadas em determinados ambientes.

A possibilidade de transferência de gens exógenos em tecidos embrionários gerou uma série de investigações desde cultura de embrião *in vitro* até a produção de quimeras e de transferência de núcleo (clonagem) até o transplante de células germinativas em testículos. Na realidade, o desafio em acessar e modificar o genoma de aves tem gerado interesse devido ao potencial ilimitado de aplicações destas técnicas em

uma variedade de áreas como a produção de aves por si mesma (ex. resistência a infecções, aumento da taxa de ganho de peso...), saúde animal e humana (ex. produção de alguma proteína de interesse) e determinação de sexo (ex. produção controlada de machos e fêmeas). Vários pesquisadores (Sang, 1995, Pettite *et al.*, 1997, Etches, 1999) têm se dedicado a esta área. Interessante revisão sobre cultura *in vitro* de embrião de aves, manipulação de embrião de aves, transferência de núcleo (clonagem) em aves, transplante de células tronco entre testículos e sexagem em aves foi publicada recentemente (Brillard, 2006).

### Referências

- Aitken RJ.** A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.19-24, 1994.
- Allen TE, Grigg GW.** Sperm transport in the fowl. *Aust J Agron Res*, v.8, p.788-789, 1957.
- Bahr JM, Johnson PA.** 1991. Reproduction in poultry. In: Cupps PT (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Academic Press, 1991. p. 555-575.
- Bakst MR, McGary S, Estevez I, Knapp T.** Use of nonsettable eggs to evaluate turkey hen fertility. *J Appl Poult Res*, v.11, p.402-405, 2002.
- Bakst MR, Wisahrt G, Brillard JP.** Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult Sci Rev*, v.5, p.117-143, 1994.
- Barbato GF, Cramer PG, Hammerstedt RH.** A practical *in vitro* sperm-egg binding assay, which detects subfertile males. *Biol Reprod*, v.58, p.686-699, 1998.
- Beaumont C, Brillard JP, Millet N, De Reviere M.** Comparison of various characteristics of duration of fertility in hens. *Br Poult Sci*, v.33, p.649-661, 1992.
- Bongalhardo DC, Somnapan-Kakuda N, Buhr MM.** Isolation and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. *Poult Sci*, v.81, p.1877-1883, 2002.
- Brillard JP.** Biotechnologies of reproduction in poultry: dreams and reality. In: WPSA Scientific Day, 2006, Pretoria, South Africa. *Proceedings ...* Pretoria: WPSA, 2006. In press.
- Brillard JP.** Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult Sci*, v.72, p.923-928, 1993.
- Brillard JP, Bakst MR.** Qualification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. *Biol Reprod*, v.43, p.271-275, 1990.
- Cerolini S, Kelso KA, Noble RC, Speake BK, Pizzi F, Cavalchini LG.** Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol Reprod*, v.57, p.976-980, 1997.
- Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP.** *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology*, v.39, p.185-191, 1999.
- Clulow J, Jones RC.** Studies of fluid and spermatozoa transport in the extratesticular genital ducts of the Japanese quail. *J Anat*, v.157, p.1-11, 1988.
- Donoghue AM.** Prospective approaches to avoid flock fertility: predictive assessment of sperm function traits in poultry. *Poult Sci*, v.78, p.437-443, 1999.
- El Halawani ME, Noll SL.** Managing turkeys for maximum egg production. In: International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, 1, 1995, Savoy, IL. *Proceedings ...* Edited by MR Bakst and G J Wishart. Savoy, IL: Poultry Science Association, 1995. p.184-196.
- El Halawani ME, Silsby JL, Rozenboim I, Pitts GR.** Increased egg production by active immunization against vasoactive intestinal peptide in the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Biol Reprod*. v.52, p.179-183, 1995.
- Etches RJ.** Manipulating the avian genome. In: International Congress on Bird Reproduction, 1999, Tours, France. *Proceedings ...* Tours: INRA, 1999. p.169-173.
- Etches RJ.** *Reproduction in poultry*. Wallingford, UK: CAB International, 1996.
- Fraps RM.** Twenty-four hour periodicity in the mechanism of pituitary gonadotropin release for follicular maturation and ovulation in the chicken. *Endocrinology*, v.77, p.5-18, 1965.
- Goerzen PR, Julsrud WL, Robinson FE.** Duration of fertility in ad libitum and feed-restricted caged broiler breeder. *Poult Sci*, v.75, p.962-965, 1996.
- Guichard A, Cedard L, Haffen K.** Aspect comparatif de la synthèse de stéroïdes sexuels par les gonades embryonnaires de Poulet à différents stades du développement. *Gen Comp Endocrinol*, v.20, p.16-28, 1973.
- Hammerstedt RH.** Evaluation os sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.77-87, 1996.
- Hattori A, Ishii S, Wada M.** Effects of two kinds of chicken Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH), mammalian LH-RH and its analogs on the release of LH and FSH in Japanese quail and chicken. *Gen Comp Endocrinol*, v.64, p.446-455, 1996.
- Hess RA, Thurston RJ, Biellier HV.** Morphology of the epididymal region and ductus deferents of the turkey. *J Anat*, v.122, p.241-252, 1976.
- Ilio KY, Hess RA.** Structure and function of the ductuli efferents: a review. *Microsc Res Tech*, v.29, p.432-467,

1994.

**Johnson AL.** Regulation of follicle differentiation by gonadotropins and growth factors. *Poult Sci*, v.72, p.867-873, 1993.

**Johnson AL.** Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. *CRC Crit Rev Poult Biol*, 2p, p.319-346, 1990.

**Johnson AL, van Tienhoven A.** Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod*, v.23, p.386-393, 1980.

**Kawashima M, Kamiyoshi M, Tanaka K.** Presence of androgen receptors in the hen hypothalamus and pituitary. *Acta Endocrinol*, v.120, p.217-224, 1989.

**King JA, Millar RP.** Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. 1. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem*, v.257, p.10722-10728, 1982.

**King JA, Millar RP.** Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. 2. Isolation and characterization. *J Biol Chem*, v.257, p.10729-10732, 1982.

**Kirby JD, Froman DP.** Reproduction in male birds. In: Whittow GC (Ed.). *Sturkie's avian physiology*. 5<sup>th</sup> ed. New York, NY: Academic Press, 2000. p.597-616.

**Kirby JD, Tressler CJ, Kirby YK.** Evaluation of the duration of sperm fertilization ability in wife lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poult Sci*, v.77, p.1688-1694, 1998

**Knight PC, Gladwell RT, Cunningham FJ.** Release of LHRH in vitro and anterior pituitary responsiveness to LHRH in vivo during sexual maturation in pullets (*Gallus domesticus*) *J Reprod Fertil*, v.74, p.145-151, 1985.

**Leeson S, Summers JD.** *Broiler breeder production*. Guelph: University Books, 2000.

**Maney DL, Richardson RD, Wingfield JC.** Central administration of chicken gonadotrophin-releasing hormone-2 enhances courtship behaviour in a female sparrow. *Horm Behav*, v.32, p.11-18, 1997.

**McDaniel GR.** Manejando los reproductores broilers para obtener máxima fertilidad. *Avicult Prof*, v.20, p.16-17, 2002.

**Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H.** Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Nat Acad Sci USA*, v.81, p.3874-3878, 1984.

**Muske LE, King JA, Moore FL, Millar RP.** Gonadotropin-releasing hormones in microdissected brain regions of an amphibian: concentrations and anatomical distribution of immunoreactive mammalian GnRH and Chicken GnRH II. *Regul Pept*, v.54, p.373-384, 1994.

**Parker HM, Karaca AG, Yeatman JB, McDaniel CD.** Fertility following selection for the OptiBreed<sup>®</sup> sperm quality index when hens are inseminated with a constant number of sperm. *Poult Sci*, v.80, suppl. 1, p.45, 2001. (Abstract).

**Parker HM, McDaniel CD.** Selection of young broiler breeders for semen quality improves hatchability in an industry field trial. *J Appl Poult Res*, v.11, p.250-259, 2002.

**Parker HM, Yeatman JB, Schultz CD, Zumwalt CD, McDaniel CD.** Use of a sperm analyzer for evaluating broiler breeder males. 2. selection of young broiler breeder roosters for the sperm quality index increases fertile egg production. *Poult Sci*, v.79, p.771-777, 2000.

**Pettite JN, Karagenc L, Ginsburg M.** The origin of avian germ line and transgenesis in birds. *Poult Sci*, 76: 1084-1092, 1997.

**Proudman JA.** Hormônios reprodutivos das aves. In: Curso de Fisiologia da Reprodução de Aves, 1993, Hotel Mendes Plaza, Santos, SP. Campinas. Facta, 1993. p30-42

**Reddy RP.** Artificial insemination of broilers: economic and management implication. In: International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry, 1, 1994, *Proceedings ...* Savoy, IL: The Poultry Science Association, 1995. p.73-89.

**Robinson FE, Wilson JL, Yu MW, Fasenko GM, Hardin RT.** The relationship between body weight and reproductive efficiency in meat-type chickens. *Poult Sci*, 72:912-922, 1993.

**Robinson FE, Wautier TA, Hardin RT, Robinson NA, Wilson JL, Newcombe M, McKay RI.** Effects of age at photostimulation on reproductive efficiency and carcass characteristics. 1. Broiler breeder hens. *Can J Anim Sci*, v.76, p.275-282, 1996.

**Rozenboim I, Aharony T, Yahav S.** The effect of melatonin administration on circulating plasma luteinizing hormone concentration in castrated White Leghorn roosters. *Poult Sci*, v.81, p.1354-1359, 2002.

**Rozenboim I, Miara L, Wolfenson D.** Melatonin involvement in the thermoregulation of White Leghorn laying hens. *Am J Physiol Reg Integrat Comp Physiol*, v.43, p.R232-R236, 1997.

**Sang H.** Methods of gene transfer in poultry. *Arch Geflugel*, n.S1, p.46-48, 1995.

**Sexton T.** Beltsville poultry semen extender. 6. Holding turkey semen for six hours at 15C. *Poult Sci*, v.61, p.1202-1208, 1982.

**Shimada K, Saito N.** Control of oviposition in poultry. *Crit Ver Poult Biol*, v.2, p.235-253, 1989.

**Sturkie PD, Opel H.** Reproduction in the male, fertilization and early embryonic development. In: Sturkie PD

(Ed.). *Avian physiology*. 3<sup>rd</sup>.ed. New York: Springer-Verlag, 1976. Chapter 17.

**Surai PF.** *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2002.

**Surai P, Wishart GJ.** Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World's Poult Sci J*, v.52, p.27-43, 1996.

**Takahashi T, Kawashima M, Kamiyoshi M, Tanaka K.** Arginine vasotocin receptor binding in the hen uterus (shell gland) before and after oviposition. *Eur J Endocrinol*, v.130, p.366-372, 1994.

**Tingari MD, Lake PE.** Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm host glands of the domestic hen, *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil*, v.34, p.423-431, 1973.

**Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E.** Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation in fowl spermatozoa. *Poult Sci*, v.78, p.586-590, 1999.

**Van Krey HP.** *Storage and transport of spermatozoa within the oviduct of the domestic fowl*. Davies: University of California. 1967.

**Van Wanbeke EF, Huyghebaert G.** Current role of semen storage and artificial insemination in the turkey industry. *Br Poult Sci*, v.30, p.461-469, 1989.

**Wilson HR, Piesco NP, Miller ER, Nesbeth WG.** Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. *World's Poult Sci J*, v.35, p.95-118, 1979.

**Wishart GJ.** Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilising ability. *J Reprod Fertil*, v.71, p.113-118, 1984.

**Wishart GJ.** New approaches to evaluating male and female fertility. *In: International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*, 1, 1995, *Proceedings ...* Savoy, IL: The Poultry Science Association, 1995. p.207-223.

**Woods JE.** 1987. Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal gonadal axis (HAG) in the chick embryo. *J Exp Zoo Suppl*, n.1, p.265-271, 1987.

**Yuan T, Lien RJ, McDaniel GR.** Effects of increased rearing period body weights and early photostimulation on broiler breeder egg production. *Poult Sci*, v.73, p.792-800, 1994.

---