

## AVALIAÇÃO IN VIVO DE DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS NA REPRODUÇÃO DE GALOS DA RAÇA ÍNDIO GIGANTE (*Gallus Gallus Domesticus*)

Michel Wender Lima<sup>1</sup>

Flavio Lopes Claudio<sup>1</sup>

Wagner Azis Garcia de Araújo<sup>2</sup>

Júlio César Oliveira Dias<sup>2</sup>

### RESUMO

Devido a uma crescente demanda de aves da raça Índio Gigante, seja para corte, postura e principalmente como ave ornamental, a reprodução da raça tem sido intensificada. Muitos produtores da raça Índio Gigante já utilizam a Inseminação Artificial (IA) com intuito de melhorar características desejáveis da raça. Porém, a IA realizada pela maioria dos produtores ainda é empírica e sem muito embasamento teórico. O uso do sêmen refrigerado de galos é uma alternativa para os criadores que buscam superar as distâncias do território brasileiro, aumentando o tempo de viabilidade e permitindo o transporte de material genético. Existem alguns diluentes específicos para aves, porém necessitam de formulação em laboratório ou de importação de outros países. Identificar um diluente comercial de outras espécies que permita a otimização do uso do sêmen de galos geneticamente superiores seria benéfico para a cadeia produtiva do galo Índio gigante. Para o experimento foram utilizados 10 galos da raça Índio Gigante para avaliação de diluentes de sêmen comerciais utilizados em outras espécies animais domésticas: Optidux®, Botudog Turbo®, BotuBov® e Botusêmen Special® e sêmen puro. Após a colheita, foi realizado um pool de sêmen, retirado uma alíquota para as análises das características seminais (Cor, volume, vigor, concentração, movimento de massa, motilidade espermática e defeitos celulares). Em seguida, a amostra foi fracionada em cinco tubos falcon de 15 mL e feita a diluição com os diferentes diluentes e refrigerado por 12h. As amostras foram mantidas em caixa específica para armazenamento de sêmen (Botuflex®) à 5 °C. Para a avaliação da taxa de fertilidade e eclodibilidade, foram utilizadas 70 galinhas de postura, linhagem Embrapa 051, divididas em 5 grupos com 14 animais cada. As galinhas foram inseminadas com uma única dose de sêmen refrigerado de cada tratamento. Os ovos foram coletados durante 14 dias subsequentes à inseminação artificial e incubados para avaliação de fertilidade e eclodibilidade. A taxa de fertilidade dos tratamentos avaliados foi de 32,61%; 7,79%; 2,04%; 0%; e 0%; para os diluentes Botusêmen Special®, Sêmen Puro, Botudog Turbo®, Optidux® e Botubov® respectivamente. Já a taxa de eclodibilidade foi de 85,27%; 59,26%; 22,22%; 0%; e 0%; para os diluentes Botusêmen Special®, Sêmen Puro, Botudog Turbo®, Optidux® e Botubov® respectivamente. O diluente Botusêmen Special® apresentou taxa de fertilidade e eclodibilidade de 32,61% e 85,27% respectivamente, superior aos demais diluentes testados neste estudo.

**Palavras-chave:** avicultura; biotecnologia; inseminação artificial; manejo reprodutivo.

<sup>1</sup> Instituto Federal Goiano. \*Correspondência: michel.lima@ifgoiano.edu.br

<sup>2</sup> Instituto Federal do Norte de Minas Gerais. wagner.araujo@ifnmg.edu.br

**IN VIVO EVALUATION OF DIFFERENT COMMERCIAL DILUENTS IN THE REPRODUCTION OF GIANT INDIAN GALES (*Gallus Gallus Domesticus*)****ABSTRACT**

Because of the growing demand for Indio Gigante birds, whether for meat, laying and especially as ornamental birds, the breed's reproduction has been intensified. Many Indio Gigante producers are already using Artificial Insemination (AI) to improve the breed's desirable characteristics. However, the AI performed by most producers is still empirical and without much theoretical basis. The use of refrigerated semen from roosters is an alternative for breeders looking to overcome the distances in Brazilian territory, increasing viability time and allowing the transportation of genetic material. There are some specific diluents for poultry, but they need to be formulated in a laboratory or imported from other countries. Identifying a commercial diluent for other species that allows the use of semen from genetically superior roosters to be optimized would be beneficial for the production chain of the giant Indio rooster. For the experiment, 10 Indio Gigante roosters were used to evaluate commercial semen diluents used in other domestic animal species: Optidux®, Botudog Turbo®, BotuBov® and Botusêmen Special® and pure semen. After collection, a pool of semen was made and an aliquot was taken for analysis of seminal characteristics (color, volume, vigor, concentration, mass movement, sperm motility and cell defects). The sample was then split into five 15 mL falcon tubes and diluted with the different diluents and refrigerated for 12 hours. The samples were kept in a specific box for storing semen (Botuflex®) at 5 °C. To assess the fertility rate and hatchability, 70 laying hens of the Embrapa 051 strain were used, divided into 5 groups of 14 animals each. The hens were inseminated with a single dose of refrigerated semen from each treatment. The eggs were collected 14 days after artificial insemination and incubated to assess fertility and hatchability. The fertility rate of the treatments evaluated was 32.61%; 7.79%; 2.04%; 0%; and 0%; for the diluents Botusêmen Special®, Pure Semen, Botudog Turbo®, Optidux® and Botubov® respectively. The hatchability rate was 85.27%; 59.26%; 22.22%; 0%; and 0%; for the diluents Botusêmen Special®, Pure Semen, Botudog Turbo®, Optidux® and Botubov® respectively. The Botusêmen Special® diluent had a fertility and hatchability rate of 32.61% and 85.27% respectively, higher than the other diluents tested in this study.

**Keywords:** poultry production; biotechnology; artificial insemination; reproductive management.

**EVALUACIÓN IN VIVO DE DIFERENTES DILUYENTES COMERCIALES EN LA REPRODUCCIÓN DE GALLINAS GIGANTES (*Gallus Gallus Domesticus*)****RESUMEN**

Debido a la creciente demanda de aves de la raza Índio Gigante, ya sea para la producción de carne, la puesta de huevos y, principalmente como ave ornamental, la reproducción de la raza se ha intensificado. Muchos de los productores de la raza Índio Gigante ya utilizan la Inseminación Artificial (IA) con el objetivo de mejorar características deseables de la raza. Sin embargo, la Inseminación Artificial (IA) que llevan a cabo la mayoría de los productores sigue siendo empírica y con poca base teórica. El uso de semen refrigerado de gallo es una alternativa para creadores que buscan superar las distancias dentro del territorio brasileño, aumentando el tiempo de viabilidad y permitiendo el transporte del material genético. Hay algunos diluyentes

específicos para aves, pero requieren formulación en laboratorio o importación de otros países. Identificar un diluyente comercial de otras especies que permita la optimización del uso del semen de gallos genéticamente superiores sería beneficioso para la cadena productiva del gallo Índio Gigante. Para el experimento se utilizaron 10 gallos de la raza Índio Gigante para evaluar diluyentes comerciales de semen utilizados en otras especies de animales domésticos: Optidux®, Botudog Turbo®, BotuBov® y Botusêmen Special® y Semen Puro. Después de la cosecha se realizó un pool de semen, una alícuota tomada para los análisis de las características seminales (Color, volumen, vigor, concentración, movimiento de masa, motilidad espermática y defectos celulares). Luego, la muestra fue fraccionada en cinco tubos Falcon de 15 ml y fue hecha la dilución con diferentes diluyentes y refrigerado durante 12h. Las muestras fueron guardadas en una caja específica para el almacenamiento de semen (Botuflex®) a 5 oC. Para la evaluación de la tasa de fertilidad y incubabilidad, se utilizaron 70 gallinas ponedoras, linaje Embrapa 051, divididas en 5 grupos de 14 animales cada uno. Las gallinas fueron inseminadas con una única dosis de semen refrigerado para cada tratamiento. Los huevos fueron recolectados durante los 14 días siguientes a la inseminación artificial e incubados para evaluación de la fertilidad y incubabilidad. La tasa de fertilidad de los tratamientos evaluados fue de 32,61%; 7,79%; 2,04%; 0%; y 0%; para diluyentes Botusêmen Special®, Semen Puro, Botudog Turbo®, Optidux® y Botubov® respectivamente. Ya la tasa de incubabilidad fue del 85,27%; 59,26%; 22,22%; 0%; y 0%; para diluyentes de Botusêmen Special®, Semen Puro, Botudog Turbo®, Optidux® y Botubov® respectivamente. El diluyente Botusêmen Special® presentó una tasa de fertilidad y de incubabilidad del 32,61% y del 85,27%, respectivamente, superiores a las de los demás diluyentes probados en este estudio.

**Palabras-clave:** avicultura; biotecnología; inseminación artificial; gestión reproductiva.

## INTRODUÇÃO

A fertilidade e a eclodibilidade estão entre os principais índices da avicultura, seja de corte ou postura, o número de pintos nascidos ao final do processo de incubação determina a lucratividade da produção. O reprodutor contribui com metade do material genético da prole, e por esse motivo, a escolha de um bom gallo tem influência direta nos resultados econômicos. A seleção excessiva em favor do ganho muscular, especialmente em aves de corte, dificulta o processo natural de acasalamento. Assim sendo, a Inseminação Artificial (IA) se tornou uma ferramenta fundamental para a produção avícola (1).

A aplicação da IA, quando comparada à monta natural, apresenta várias vantagens: eliminação de acasalamento preferencial, reprodução de linhagens comerciais de monta difícil (devido ao tamanho do macho em relação a fêmea), diminuição do número de machos em relação ao número de fêmeas (redução de 1:10 para 1:30), garantia de que todas as fêmeas sejam inseminadas, maior descendência dos machos de alto mérito genético levando a um maior progresso de seleção. Além disso, a implementação da IA reduzirá os custos de produção ao diminuir o número de reprodutores, economizando assim despesas com manutenção, alimentação e operação (2,1).

Um gallo pode fertilizar de 6 a 10 galinhas em um plantel sob acasalamento natural. Mas no caso de inseminação artificial, o sêmen colhido de 6 a 8 machos pode ser usado para inseminar 150-170 galinhas (3). No entanto, é importante lembrar que a fertilidade em galinhas que foram inseminadas artificialmente pode ser afetada por uma série de fatores como intervalo de inseminação, dose inseminante, qualidade do sêmen e momento da inseminação (4).

Já se sabe que o sêmen de aves recém-colhido e puro, armazenado *in vitro*, perde muito rapidamente a sua viabilidade e motilidade e, como consequência, a capacidade de fertilização (5). O armazenamento do sêmen induz alguns danos bioquímicos e estruturais nos

espermatozoides, sendo necessário o uso de diluentes de sêmen que resultem em um meio ambiente ótimo para manter a viabilidade durante o armazenamento no frio. Esses diluentes possuem a capacidade de exercer efeitos benéficos como crioprotetores, e controlando o pH e osmolaridade do meio, dando substrato energético para o espermatozoide (6).

Os parâmetros tradicionais de avaliação de sêmen, como a motilidade dos espermatozoides, atividade mitocondrial e defeitos morfológicos podem não fornecer informações exatas sobre a duração da fertilidade em matrizes de postura (7). Para avaliar a qualidade do sêmen é muito importante o teste *in vivo* pois este fornece informações relevantes sobre a qualidade dos reprodutores e a capacidade de fecundação dos oócitos após o acesso dos espermatozoides ao trato reprodutor feminino (8).

Existem alguns diluentes de sêmen de aves que estão disponíveis comercialmente ou que podem ser produzidos em laboratório, porém de difícil acesso ao pequeno produtor à campo, seja por questões financeiras ou estruturais. Os diluentes mais populares utilizados para o sêmen de aves são: Lake, Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) e diluente de tampão fosfato. Os diluentes comerciais disponíveis são: Canadyl®, Extendyl®, NeXcell®, Raptac® ou Turkey® (9).

Com a dificuldade do pequeno produtor em ter acesso aos diluentes de sêmen importados ou os produzidos em laboratório, objetivou-se com esse estudo identificar um diluente de sêmen comercial interespécífico que mantenha a viabilidade do sêmen de galos da raça Índio Gigante quando refrigerado a 5°C por 12h, pela da avaliação da taxa de fertilidade e eclodibilidade de ovos produzidos a partir de inseminação artificial em galinhas de linhagem comercial.

## REVISÃO DA LITERATURA

### ANATOMOFISIOLOGIA REPRODUTIVA DAS AVES

Os órgãos reprodutores dos machos das aves são constituídos bilateralmente por testículos, epidídimos e ductos deferentes, localizados no interior da cavidade celomática. A espermatogênese que ocorre em temperatura de 41-43°C nos galos, patos e perus e possui duração de aproximadamente 14 dias o que garante ao macho potencial para produzir grandes quantidades de gametas num curto período (10-12).

A maturação espermática ocorre no epidídimo na maioria das espécies de mamíferos. No entanto, em galos e provavelmente em outras espécies de aves, a maturação final acontece nos ductos deferentes, uma vez que as aves apresentam um epidídimo curto. Dentro dos ductos deferentes, os espermatozoides passam algumas horas ou até alguns dias, dependendo da espécie e das condições de vida da ave, para a maturação (13).

A forma filiforme da cabeça do espermatozoide de aves é semelhante em diâmetro à cauda. Devido a isso, as cabeças dos espermatozoides têm volume citoplasmático relativamente baixo e assim, um volume relativamente baixo de crioprotetores pode ser acumulado. Por essa razão, o sêmen de aves é mais suscetível a danos por criopreservação. Nos mamíferos, a reação do acrossoma é necessária para que ocorra a fertilização do oóbito, mas até o momento não se sabe se este processo seja necessário nas aves. Os sistemas de fertilização aviária são bastante diferentes daqueles das espécies de mamíferos pela presença de sistemas únicos, como a polispermia (13).

O pH do sêmen de galo é elevado, variando entre 7,2 e 7,6. O volume médio do ejaculado de um galo varia de 0,5 a 1,0 mL. Galos da mesma raça produzem volumes diferentes de sêmen. O número total de espermatozoides no sêmen das aves está em torno de  $2-10 \times 10^9$  (14) e a qualidade espermática das aves é afetada negativamente pela diluição excessiva, conhecida como efeito de diluição. Neste caso, a capacidade de fertilização do sêmen é drasticamente reduzida se submetida a uma alta taxa de diluição (1:10 ou 1:20) (13). Pimprasert *et al.* (15), avaliaram a frequência de colheita de sêmen em galos nativos tailandeses durante um ano e

concluíram que a colheita pode ser feita até três vezes por semana sem perda de qualidade seminal.

As fêmeas das aves possuem somente um ovário e um oviduto, ambos situados do lado esquerdo da cavidade celomática e não possuem ciclo estral para a sincronização da cópula e ovulação. Elas utilizam de um sistema de armazenamento de espermatozoides no oviduto que permite que produzam uma série de ovos férteis após um único evento de cópula ou inseminação artificial.

Em aves domésticas e não domésticas, o epitélio que reveste a superfície anterior a dois centímetros da vagina, atribuída a junção uterovaginal (JUV), é modificado para formar numerosas invaginações tubulares, referidas coletivamente como túbulos de armazenamento de espermatozoides (TAE) (ver figura 1). Durante a produção de ovos, os espermatozoides, após a liberação nos TAE, ascenderão ao oviduto para o local de fertilização no infundíbulo. Neste lugar, os espermatozoides interagem com uma sucessão quase diária de óócitos durante dias, até várias semanas, dependendo da espécie (16).

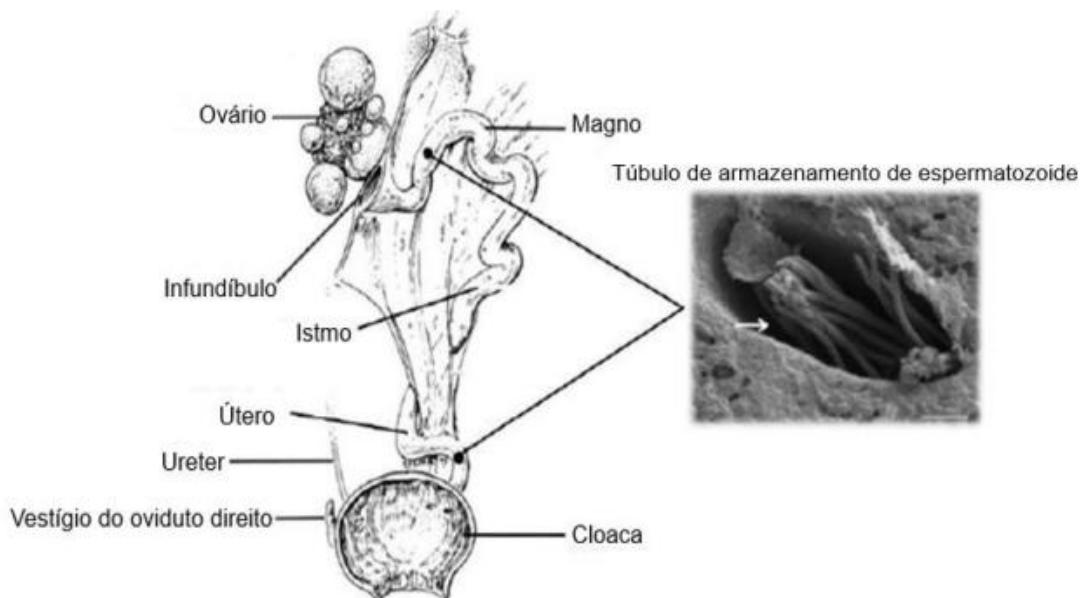


Figura 1 - Sistema Reprodutivo da Galinha. Fonte: (17)

Sabe-se que o armazenamento prolongado de sêmen pelas fêmeas após o acasalamento ocorre em diversas espécies, com durações médias de armazenamento de sêmen variando de cerca de 6 dias a 45 dias. Apenas 1% dos espermatozoides depositados passam pelo processo de seleção na vagina para chegar à JUV (4).

A baixa fertilidade observada após estocagem *in vitro* do sêmen, contrasta com a habilidade do espermatozoide em manter sua capacidade de fertilização após várias semanas armazenado *in vivo*, dentro dos TAE da fêmea. Quando estocado *in vivo*, a célula espermática é capaz de manter sua capacidade fertilizante por várias semanas (18).

Mecanismos para estabilização das membranas e inibição da motilidade e da atividade enzimática provavelmente auxiliem na preservação do gameta masculino dentro dessas glândulas. A sobrevivência do espermatozoide nas glândulas hospedeiras também podem ser dependente da modulação lipídica de sua membrana; é possível que vesículas membranosas, semelhantes a lipossomas, liberadas das microvilosidades das células epiteliais glandulares, contribuam para a manutenção da membrana plasmática do espermatozoide (19).

## DILUENTES DE SÊMEN

A diluição do sêmen é uma prática de rotina nos estabelecimentos que utilizam a inseminação artificial, visto que maximiza o uso do ejaculado, reduz o custo da IA e permite manter a qualidade do sêmen por algumas horas ou dias, desde que mantido refrigerado (5°C). A temperatura é reduzida para induzir a inatividade ou diminuição do metabolismo dos espermatozoides durante o armazenamento em forma líquida (8).

Os diluentes de sêmen podem também manter e preservar os processos metabólicos dos espermatozoides, controlar o pH do meio durante e após o descongelamento, controlar a contaminação bacteriana e reduzir o estresse oxidativo e danos criogênicos (8).

Dentre os diluentes comerciais disponíveis no mercado nacional para diferentes espécies, destacam-se Botudog Turbo®, indicado para uso em sêmen de cão, composto por caseína, açúcares, conservantes, pentoxifilina e excipientes; o Botubov®, indicado para uso em sêmen de bovinos, caprinos e ovinos possui em sua composição: açúcares, antioxidantes, aminoácidos, gema de ovo e glicerol; o Botusêmen Special®, indicado para uso em sêmen de equinos, composto por leite em pó, açúcares, conservantes e excipientes, com adição de colesterol para manter a estabilidade da membrana plasmática do espermatozoide durante o processo de arrefecimento; e o Optidux®, indicado para uso em sêmen de bovinos e pequenos ruminantes, composto por fosfolípidos, oriundos da gema de ovo, organizados em conjunto com lipossomas que asseguram a proteção das células durante a refrigeração e a congelação e sem adição de proteína animal.

## METODOLOGIA

Todos os procedimentos realizados foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano protocolado sob o CEUA nº 9883060122. O experimento foi realizado na Fazenda Escola do Instituto Federal Goiano - Campus Iporá, na cidade de Iporá-GO.

Dez galos da raça Índio Gigante com 70 semanas de idade, peso médio de 5.652 Kg, foram alojados em baias individuais (1 x 3m) no Setor de Avicultura do Instituto Federal Goiano campus Iporá. O fornecimento de água foi feito por bebedouros do tipo pendular (*ad libitum*), enquanto o arraçoamento foi realizado uma vez ao dia, respeitando as exigências nutricionais da categoria. Os galos foram mantidos com estímulo luminoso apenas da luz solar que no galpão do experimento era equivalente a 12h. As colheitas de sêmen nos animais foram realizadas duas vezes por semana durante um mês antes do começo do experimento, para condicionamento dos animais ao método de colheita por massagem dorsoabdominal conforme a técnica descrita por Burrows e Quinn (20). Para facilitar a colheita do sêmen, realizou-se o corte das penas ao redor da cloaca com tesoura (toalete) para evitar perdas de ejaculado e minimizar risco de contaminação da amostra. No dia anterior à colheita experimental, os galos foram deixados de jejum alimentar de 12h para diminuição do risco de contaminação da amostra de sêmen com excreta.

Para a realização do experimento as amostras individuais de sêmen foram colhidas dos 10 galos e colocadas em um tubo graduado de plástico (tubo tipo Falcon® – 15 mL), mantido aquecido em banho-maria à 37°C, formando uma amostra heterospermica. Em seguida, foram realizadas avaliações de cor, volume, motilidade, concentração, vigor, movimento de massa e anormalidades espermáticas do *pool* de sêmen antes da diluição e resfriamento (15). As amostras foram divididas em cinco tubos graduados de plástico (tubo tipo Falcon® – 15 mL) e adicionado o diluente pré-aquecido a 37°C (tratamento) na proporção de 1:1 (diluente: sêmen). Imediatamente após a diluição as amostras foram refrigeradas a 5°C, por 12 horas, em caixa térmica para armazenamento de sêmen resfriado, Botuflex® (21). A curva de resfriamento

à 5°C foi obtida segundo as recomendações do fabricante, colocando-se duas barras de gelo reciclável dentro da caixa no momento do armazenamento das amostras (-0,66°C/min). Assim, ao atingir os 5°C, as amostras de sêmen passaram por um tempo de equilíbrio de 7 horas. Após o período de resfriamento, as amostras diluídas foram aquecidas a 37º C em banho-maria por 30 segundos e realizado a IA.

Para inseminação artificial foram utilizadas 70 galinhas da linhagem Embrapa 051, sendo 14 galinhas por tratamento em delineamento inteiramente casualizado, com idade de 55 semanas, peso médio 2.183 Kg, com média de postura em 78,5%, mantidas em gaiolas individuais (450 cm<sup>2</sup>) com bebedouros tipo *nipple* e ração balanceada para a fase de produção. As galinhas eram mantidas com programa de luz totalizando 16h de luz. As aves foram inseminadas com sêmen diluído em quatro tratamentos em parceria com grupo controle (Tabela 1):

Tabela 1. Tratamentos e respectivos diluentes

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5
Diluentes	Optidux®	Botudog Turbo®	Botubov®	Bonusêmen Special®	Sêmen puro

Fonte: dados da pesquisa

Para a inseminação artificial, após as 12h de resfriamento (21), utilizou-se um volume de 0,1 mL de sêmen resfriado em seringa estéril com capacidade de 1 mL. O sêmen foi depositado a 2 cm de profundidade dentro do oviduto. Todas as gaiolas foram numeradas de forma que era possível identificar os ovos de cada galinha individualmente.

A dose inseminante utilizada em cada IA foi de  $\cong 115$  milhões de células espermáticas em inseminação única (22). Os ovos foram coletados e identificados (entrada na incubadora, tratamento, número da galinha e sequência de coleta) por 14 dias após a IA. Sendo que no primeiro dia após a IA os ovos não foram incubados pois estes certamente não estariam embrionados.

Foram coletados um total de 725 ovos e estes foram armazenados em cartelas plásticas a temperatura média de 25 °C. Ao final do quinto dia de coleta os ovos foram incubados em três lotes, sendo descartados ovos fora do padrão de incubação (trincados, sujos, pequenos). Os ovos foram colocados de forma aleatória dentro das bandejas e incubados em duas chocadeiras da marca Brood Modelo GM- 2 que tem capacidade para 384 ovos cada, viragem automática dos ovos a cada hora, temperatura de 37,5° C e umidade de 66%. Após 10 dias de incubação, os ovos foram submetidos a ovoscopia para retirada dos não embrionados. No 20º dia de incubação os ovos foram retirados das bandejas e passados para o nascedouro para a eclosão.

O percentual de fertilidade e de ecldibilidade foi calculado utilizando as seguintes fórmulas (23):

$$\text{Taxa de fertilidade} = (\text{ovos férteis}/\text{total de ovos incubados}) \times 100$$

$$\text{Taxa de ecldibilidade} = (\text{Pintos nascidos}/\text{ovos férteis}) \times 100$$

Os dados coletados relativos aos parâmetros de fertilidade e ecldibilidade foram submetidos ao teste de ANOVA para avaliação de normalidade no SAS (24). Quando o teste F foi significativo, as médias foram comparadas utilizando o Teste Duncan. O valor de p menor que 0,05 foi considerado para determinar uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram comparados quatro diluentes comerciais das espécies bovina (Optidux® e Botubov®), equina (Botusêmen Special®) e canina (Botudog Turbo®) na avaliação da fertilidade *in vivo* do sêmen de galo Índio Gigante após 12 horas de refrigeração à 5 °C.

Na Tabela 1, podem ser observados os valores de referência das características seminais do sêmen fresco de aves (14,19) e os valores médios encontrados nas colheitas dos animais após a formação do pool espermático.

Tabela 2. Valores de referência e médias das características encontradas no ejaculado de galos após a formação do pool espermático.

Características	Valores de referência	Valores médios
<b>Volume</b>	0,5 – 1 mL*	0,52 mL
<b>Cor</b>	Branca	Branca
<b>Movimento de massa</b>	Presente*	Presente
<b>Motilidade espermática</b>	≥ 80%*	80%
<b>Vigor</b>	≥ 3*	4
<b>Concentração</b>	1 a 5 x 10 <sup>9</sup> /mL**	2,3 x 10 <sup>9</sup> /mL
<b>Nº total de espermatozoides</b>	2 -10 x 10 <sup>9</sup> *	1,2 x 10 <sup>9</sup>
<b>Espermatozoides normais</b>	≥ 90%*	92%

Fonte: \*(14); \*\*(19) e dados da pesquisa.

Os parâmetros do sêmen fresco estão dentro dos valores de referência preconizados para galos. Os valores encontrados para volume e concentração espermática foram próximos ao limite inferior, o que pode ser explicado pela época do ano que foi realizado a colheita e avaliação do sêmen, uma vez que o fotoperíodo positivo tem forte influência no ciclo reprodutivo dessas aves (25). O experimento foi desenvolvido nos períodos de final de outono e início de inverno no hemisfério sul, onde ocorre uma menor intensidade luminosa natural.

A cor encontrada no pool dos ejaculados foi, como encontrada geralmente, branca e de aspecto leitoso. Esta avaliação é importante, pois a cor do ejaculado pode servir como indicador de contaminação, principalmente por excretas e uratos (23).

A diluição do sêmen imediatamente após a colheita é necessária para manter a viabilidade celular. A taxa de diluição do sêmen utilizada neste experimento foi de 1:1 e, segundo Yunhe Zong *et al.*(26), diluições de 1:1 a 1:4 não afetam a fertilidade do galo.

A capacidade de fertilização do sêmen diluído e resfriado foi estimada a partir dos resultados da inseminação artificial de galinhas e foi expressa como taxa de fertilidade e taxa de eclodibilidade. Os resultados da ovoscopia e da incubação estão descritos na Tabela 3.

O percentual de fertilidade foi de 34,15% no tratamento 4 (Botusêmen Special®), seguido do tratamento 5 (Sêmen puro) que apresentou percentual de 8,5% e do tratamento 2 (Botudog Turbo®) com percentual de 2,16%. Os tratamentos T1 (Optidux®) e T3 (Botubov®) mostraram baixa efetividade, não produzindo nenhum ovo embrionado.

Os resultados de fertilidade diferem dos encontrados por Chankitisakul *et al.* (21) e Ola, Faleye, Adeyemi e Adeyosoye (27) que encontraram fertilidades média de 90,5% e 60% respectivamente, utilizando sêmen refrigerado a 5° C e com diluente específico para galos em um período de 0 a 14 dias após a IA.

Tabela 3. Números absolutos de ovos incubados, ovos férteis e pintos nascidos, taxa de fertilidade e eclodibilidade por tratamento.

Tratamento	T1 - Optidux®	T2 - Botudog Turbo®	T3 - Botubov®	T4 - Botusemen Special®	T5 - Sêmen puro
<b>Ovos incubados</b>	159	139	151	123	153
<b>Ovos férteis</b>	0	3	0	42	13
<b>Pintos nascidos</b>	0	2	0	39	11
<b>Taxa fertilidade</b>	0%	2,16%	0%	34,15%	8,5%
<b>Taxa eclodibilidade</b>	0%	66,67%	0%	92,86%	84,62%

Fonte: dados da pesquisa

O percentual de eclodibilidade (Tabela 4) foi de 92,86% no tratamento 4 (Botusêmen Special®), seguido por 84,62% no tratamento 5 (Sêmen Puro) e 66,67% no tratamento 2 (Botudog Turbo®). Os tratamentos T1 (Optidux®) e T3 (Botubov®) não produziram nenhum ovo embrionado.

Tabela 4. Taxa de fertilidade e eclodibilidade por tratamento

Tratamento	T1 - Optidux®	T2 - Botudog turbo®	T3 - Botubov®	T4 - Botusemen Special®	T5 - Sêmen puro
<b>Tx fertilidade</b>	0 c	0,01918 c	0 c	0,2686 a	0,08313 b
<b>Tx eclodibilidade</b>	0 c	0,01279 c	0 c	0,2494 a	0,07034 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo Teste de Duncan a 5%.

Fonte: dados da pesquisa

A comparação dos resultados de fertilidade e eclodibilidade pelo teste de Duncan mostrou que houve diferença estatística significativa ( $P<0,01$ ) entre os diluentes interespecíficos utilizados no experimento (Tabela 3).

A composição exata dos diluentes comerciais de sêmen não está disponível aos consumidores. No entanto, nos websites das empresas encontra-se alguns dos principais constituintes dos diluentes avaliados neste estudo, são eles: lipossomas (Optidux®), leite (Botudog Turbo® e Botusêmen Special®) e gema de ovo (Botubov®).

Nos tratamentos 1 e 3, não houve a produção de nenhum ovo embrionado. Este resultado pode ser explicado devido a composição de gema de ovo dos diluentes que resulta em boas condições de sobrevivência para o sêmen do gallo *in vitro*, porém exerce um efeito contraceptivo no oviduto da galinha (28).

Ainda não está claro se a redução na capacidade de fertilização causada pela adição de gema de ovo é consequência de algum efeito prejudicial direto sobre o espermatozoide ou se por alguma resposta imunológica no oviduto da galinha. Um ponto a ser considerado é a diminuição da qualidade do sêmen diluído com gema de ovo devido à mudança na osmolaridade do diluente (29). Abouelezz *et al.* (30) registraram redução da fertilidade apenas em diluentes com concentração superior a 15% de gema de ovo.

O tratamento 2 apresentou fertilidade de 2,16%, relativamente baixa, considerando que o diluente a base de leite promove boa motilidade e viabilidade dos espermatozoides em outras espécies animais. Caseína é a principal proteína do leite que protege os espermatozoides contra

a criopreservação (31). Porém no presente estudo, o tratamento 2 obteve resultados de eclodibilidade inferiores até ao sêmen não diluído.

O tratamento 4 apresentou o melhor resultado de fertilidade (34,15%). A composição do diluente Botusemen Special® com adição de colesterol pode ter permitido o melhor resultado no teste *in vivo* após o período de resfriamento. O colesterol tem múltiplos efeitos sobre as membranas espermáticas, incluindo a estabilização, redução da permeabilidade e manutenção das características morfológicas. O dano à membrana durante o resfriamento é a principal causa da morte do espermatozoide. Quando estas células são arrefecidas durante a criopreservação, o elevado teor de colesterol torna as membranas mais fluidas, e estas sofrem menos danos nas membranas do que as membranas de espécies que têm uma relação colesterol: fosfolípidos baixa (Galo: 0,30; Touro: 0,45; Coelho 0,88; Humano 0,99) (13,32).

O colesterol adicional se incorpora nas membranas das células plasmáticas, aumenta a hidrofobicidade e, consequentemente, a resistência dos espermatozoides ao dano criogênico, modifica o padrão de capacitação e a capacidade subsequente do sêmen de sofrer a reação de acrosoma. Embora os espermatozoides de aves não pareçam sofrer capacitação ou hiperativação da motilidade antes da fertilização, eles passam um longo tempo no oviduto da fêmea antes da penetração (9,33).

O tratamento 5 não utilizou nenhum diluente o que representou uma queda significativa na qualidade e eficiência da célula espermática ao passar pelo resfriamento, porém com resultados superiores a T1, T2 e T3. Para manter a capacidade de fertilização, o sêmen é geralmente armazenado entre 2 e 8°C para que o metabolismo celular seja reduzido e, consequentemente, haja menos produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). O alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o ácido araquidônico e docosatetraenóico, nos fosfolípidos das membranas dos espermatozoides das aves, torna estas células particularmente suscetíveis à peroxidação lipídica. Danos peroxidativos afetam a morfologia dos espermatozoides e reduzem a sua motilidade, acredita-se ser esta a principal causa da perda da capacidade de fertilização observada durante o armazenamento do sêmen de aves (34).

De acordo com Olaet al., (27) a baixa fertilidade geral do sêmen conservado a frio neste estudo é consistente com os relatos de que as galinhas inseminadas com sêmen fresco produzem ovos mais férteis do que as galinhas inseminadas com sêmen refrigerado. Uma baixa taxa de eclodibilidade está associada a uma redução da fertilidade, bem como a um aumento da mortalidade embrionária, que é comum em galinhas mais velhas ou em um grupo de fêmeas com atividade pouco frequente de acasalamento ou IA.

Os fatores capazes de influenciar diretamente a eclodibilidade são ligados à mortalidade embrionária causada por contaminação do sêmen ou dos ovos, incorreta seleção e armazenamento dos ovos, falha na operação das incubadoras, temperatura, ventilação e umidade de incubação inadequados, e efeitos genéticos letais (35).

Neste estudo, após o período de incubação dos ovos e independente do tratamento utilizado, foi possível verificar que a quantidade de pintos nascidos cai gradativamente com o passar dos dias após a IA (Gráfico 1). A fertilidade máxima foi observada no 2º e 5º dia após a IA e a duração do período fértil neste experimento foi até o 14º dia, em desacordo com o estudo de Tabatabaei (36), no qual a fertilidade máxima foi obtida no dia 3º dia após a IA enquanto a duração da fertilidade foi obtida até no 19º dia.

Para manter um nível elevado e constante de fertilidade, muitos produtores utilizam duas IA por semana em cada galinha, porém os resultados de fertilidade em relação ao tempo após a IA encontrados neste experimento mostraram que sete dias é o melhor intervalo entre as IA. Esse resultado está de acordo com Bui *et al.* (37), que notou redução na fertilidade dos ovos uma semana após a IA. Saleh *et al.*, (38) e Mohan *et al.* (39), também concluíram que para otimizar o uso do reprodutor e produzir a maior quantidade de ovos férteis o intervalo ideal de inseminação nas galinhas é de 7 dias.

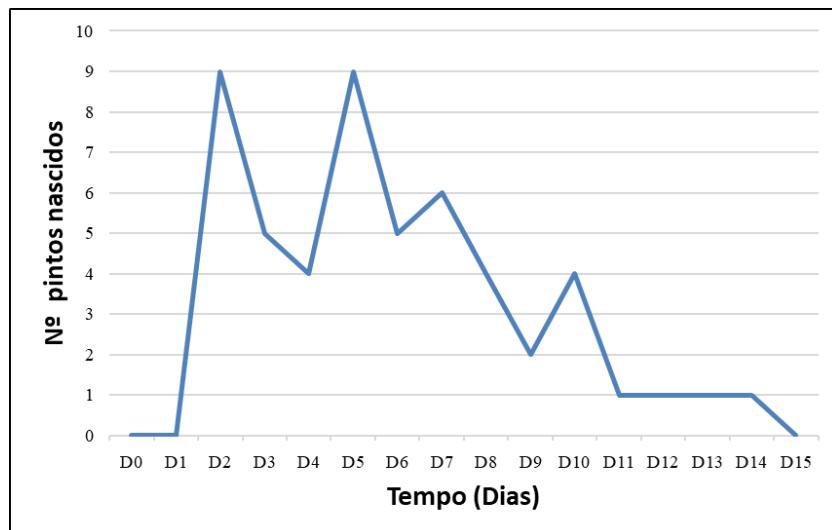


Gráfico 1. Ecloção dos ovos por dia após IA

Fonte: dados da pesquisa

## CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados, conclui-se que dentre os diluentes de sêmen comerciais de diferentes espécies testados, o que apresentou melhor resultado para diluição do sêmen de galo resfriado por 12 horas à 5 °C, em relação a fertilidade e eclodibilidade dos ovos foi o Botusêmen Special®.

Recomenda-se mais estudos para explorar as possíveis formas de armazenamento de sêmen resfriado durante mais horas à temperatura de refrigeração (5 °C) sem diminuição significativa da fertilidade.

## REFERÊNCIAS

1. Tvrdá E, Petrovičová M, Benko F, Ďuračka M, Kováč J, Slanina T, et al. Seminal Bacterioflora of Two Rooster Lines: Characterization, Antibiotic Resistance Patterns and Possible Impact on Semen Quality. *Antibiotics* (Basel). 2023;12(2):336.
2. Serpa FC, Jácome IMTD, Garcia RG, Zanchin LF, Somavila EM, Molinari M, et al. Inseminação artificial em codornas através de diferentes métodos de coleta de sêmen. *Res Soc Dev.* 2020;9(4):e88942789.
3. Habibullah M, Hashem MA, Rana MS, Islam MH. Effect of Artificial Insemination on different production parameter in Hubbard classic broiler parent stock. *J Bangladesh Agric Univ.* 2015;13(1):71-7.
4. Ewuola EO, Ogundeleji KT, Osanyinlusi TM, Oyedele DM, Adebisi KA, Bolarinwa OA. Effects of semen dosage, oviductal sperm storage and insemination interval on egg fertility, embryo mortality and hatchability in Nera Black breeder chickens. *Niger J Anim Prod.* 2020;47(3):34-43.
5. Łukaszewicz E, Jerysz A, Kowalczyk A. Effect of semen extenders on viability of ISA Brown and Hubbard Flex roosters' sperm stored for 24 h. *Poult Sci.* 2020;99(5):2766-74.

6. Castro FS, Pimentel AM, Mattos RC, Rechsteiner SMEF. Utilização de leite com diferentes concentrações de gordura como diluentes para sêmen equino refrigerado. Cienc Anim Bras. 2020;21:e-44262.
7. Murugesan S, Ramasamy K. Effect of semen parameters on duration of fertility in layer breeder chicken. Indian J Poult Sci. 2020;55(1):51-3.
8. Bustani GS, Baiee FH. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. Vet World. 2021;14(5):1220-33.
9. Partyka A, Niżański W. Advances in storage of poultry semen. Anim Reprod Sci. 2022;246:106921.
10. Blesbois E. Biological Features of the Avian Male Gamete and their Application to Biotechnology of Conservation. J Poult Sci. 2012;49(3):141-9.
11. Peixoto JV. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805) [tese] [Internet]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2010 [citado 03 Fev 2024]. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/a6e93a7e-4bfa-45ea-a9d2-212b5fcddd3a/full>
12. Rutz F, Anciuti MA, Xavier EG, Roll VFB, Rossi P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. Rev Bras Reprod Anim. 2007;31(3):307-17.
13. Janosikova M, Petricakova K, Ptacek M, Savvulidi FG, Rychtarova J, Fulka J Jr. New approaches for long-term conservation of rooster spermatozoa. Poult Sci. 2023;102(2):102386.
14. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, organizador. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte: CBRA; 2013.
15. Pimprasert M, Kheawkanha T, Boonkum W, Chankitisakul V. Influence of Semen Collection Frequency and Seasonal Variations on Fresh and Frozen Semen Quality in Thai Native Roosters. Animals (Basel). 2023;13(4):573.
16. Braga P. Relação do tempo de armazenamento dos espermatozoides no oviduto de perus com a fertilidade e desenvolvimento embrionário [dissertação] [Internet]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2016 [citado 23 Abr 2024]. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18883>
17. Novaes GA. Utilização da terapia fotodinâmica antimicrobiana no sêmen de galos domésticos: análise de diferentes tempos de pré-irradiação, irradiância e exposição radiante da luz [dissertação] [Internet]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2021 [citado 27 Fev 2025]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-15032022-115047/>
18. Sarkar PK. Motility, Viability and Fertilizing Ability of Avian Sperm Stored Under in Vitro Conditions. Rev Agric Sci. 2020;8:15-27.
19. Bongalhardo DC. Produção e preservação do sêmen de galos. Rev Bras Reprod Anim. 2013;37(2):131-5.

20. Burrows WH, Quinn JP. The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poult Sci.* 1937;16(1):19-24.
21. Khaeruddin K, Srimaharani S. Use of Old Coconut Water with Various Skim Concentrations of Milk as a Diluent for Kampong Chicken Semen. *Chalaza J Anim Husb.* 2019;4(1):24-9.
22. Chankitisakul V, Boonkum W, Kaewkanha T, Pimprasert M, Ratchamak R, Authaida S, et al. Fertilizing ability and survivability of rooster sperm diluted with a novel semen extender supplemented with serine for practical use on smallholder farms. *Poult Sci.* 2022;101(12):102188.
23. Getachew T, Goshu G, Lemma A. Effects of Using Commercial and Homemade Extenders on Sperm Quality of Liquid Stored Semen of Horro Chicken Breed. *J Worlds Poult Res.* 2023;13(2):216-22.
24. SAS Institute Inc. SAS [Internet]. São Paulo: SAS; [citado 22 Jul 2024]. Disponível em: [https://www.sas.com/pt\\_br/home.html](https://www.sas.com/pt_br/home.html)
25. Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, et al. Influence of season on the freezability of free-range poultry semen. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(4):578-83.
26. Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J. Chicken Sperm Cryopreservation: Review of Techniques, Freezing Damage, and Freezability Mechanisms. *Agriculture.* 2023;13(2):445.
27. Ola SI, Faleye O, Adeyemi A, Adeyosoye O. Evaluation of Egg Yolk Plasma as Replacement for Whole Egg Yolk in Chicken Semen Extender. *J Poult Res.* 2020;17(2):96-101.
28. Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, et al. Cryoprotective and contraceptive properties of egg yolk as an additive in rooster sperm diluents. *Cryobiology.* 2012;65(3):230-4.
29. Rakha BA, Ansari MS, Akhter S, Santiago-Moreno J, Blesbois E. Cryoprotectant effects of egg yolk on Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Theriogenology.* 2018;119:150-5.
30. Abouelezz FMK, Castaño C, Toledano-Díaz A, Esteso MC, López-Sebastián A, Campo JL, et al. Sperm–egg penetration assay assessment of the contraceptive effects of glycerol and egg yolk in rooster sperm diluents. *Theriogenology.* 2015;83(9):1541-7.
31. Appiah MO, Li W, Zhao J, Liu H, Dong Y, Xiang J, et al. Quercetin supplemented casein-based extender improves the post-thaw quality of rooster semen. *Cryobiology.* 2020;94:57-65.
32. Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham J. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reprod Domest Anim.* 2010;45 Suppl 2:57-66.

33. Chuaychu-Noo N, Thananurak P, Chankitisakul V, Vongpralub T. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology*. 2017;74:8-12.
34. Partyka A, Niżański W. Supplementation of Avian Semen Extenders with Antioxidants to Improve Semen Quality—Is It an Effective Strategy? *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(12):1927.
35. Figueiredo EAPD, Sousa FMD, Guidoni AL, Rosa PS. Comparação de diluentes, diluições e tempo de armazenamento do sêmen sobre fertilidade, eclodibilidade e nascimento de pintos em matrizes pesadas. *Rev Bras Zootec.* 1999;28(6):1239-44.
36. Tabatabaei S. The Effect of Spermatozoa Number on Fertility Rate of Chicken in Artificial Insemination Programs. *J Anim Vet Adv.* 2010;9(12):1717-9.
37. Bui HYT, Nakamura Y, Takenouchi A, Tsudzuki M, Maeda T. Timing and Interval Effects of Repeated Inseminations by Roosters on the Fathering of Chicks. *J Poult Sci.* 2018;55(4):301-6.
38. Saleh DM, Mugiyono S, Sumaryadi MY, Nugroho AP. The Effects of Sperm Number and Insemination Interval on the Fertility and Hatchability of Sentul Hens. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2019;372(1):012037.
39. Mohan J, Sharma SK, Kolluri G, Dhama K. History of artificial insemination in poultry, its components and significance. *Worlds Poult Sci J.* 2018;74(3):475-88.

**Recebido em: 10/03/2025**  
**Aceito em: 25/03/2025**