

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PERFURAÇÕES ESPERMÁTICAS AO REDOR DO DISCO
GERMINATIVO DE OVOS INCUBÁVEIS E CORRELAÇÃO
COM FERTILIDADE E ECLODIBILIDADE DE
REPRODUTORAS PESADAS**

RODRIGO WEIDE JASKULSKI

**Botucatu – SP
Dezembro de 2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PERFURAÇÕES ESPERMÁTICAS AO REDOR DO DISCO
GERMINATIVO DE OVOS INCUBÁVEIS E CORRELAÇÃO
FERTILIDADE E ECLODIBILIDADE DE REPRODUTORAS
PESADAS**

RODRIGO WEIDE JASKULSKI

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu – SP
Dezembro de 2010

Nome do autor: JASKULSKI, Rodrigo Weide

COMISSÃO EXAMINADORA

Botucatu, 10 de dezembro de 2010

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Prof. Dr. José Roberto Sartori

Prof^a. Dr^a. Nadja Susana Mogyca Leandro

Talvez por ser prisioneiro
Das ânsias e rebeldias
De andar as noites e os dias
Rondando como tropeiro
Talvez por ser guitarrero
Criado sem protocolo
Desde que mamei no colo
Da mama bugra campeira
Trago a alma prisioneira
Das coisas que vêm do solo

Jayme Caetano Braun

Para ti, que partistes cedo, mas moldou meu caráter, opiniões e tudo que, pode ter certeza, soube aproveitar muito bem

Meu Pai,

Porque na rinha da vida
 Já me bastava um empate!
 Pois cheguei no arremate
 Batido, sem bico e torto ..
 E só me resta o conforto
 Como a ti, galo de rinha
 Que se alguém me
 dobrar - me a espinha
 Há de ser depois de morto!

Jayme Caetano Braun

Pra ti, mãe

Ah, mas se ela adivinhasse,
 Se pudesse ouvir o olhar,
 E se um olhar lhe bastasse
 Pra saber que a estão a amar!

Mas quem sente muito, cala;
 Quem quer dizer quanto sente
 fica sem alma nem fala,
 fica só, inteiramente!

Mas se isto puder contar-lhe
 O que não lhe ousou contar,
 Já não terei que falar-lhe
 Porque lhe estou a falar...

Fernando Pessoa

Para ti, companheira, amiga e esposa, Elisane

Permita morena, que eu ceve outro mate, pra dor que me bate nesta solidão
 Permita morena, que chame teu nome, matando a fome do meu coração
 Se acaso morena teus olhos luzeiros, tiver paradeiro em outro olhar
 Perdoa morena meus olhos tristonhos, perdoa os meus sonhos se contigo eu sonhar
 Perdoa morena, se trouxe contigo, teu lindo sorriso na graça do olhar
 Perdoa morena, se tenho saudade, me falta coragem pra te procurar
 Não chores morena se à noite sinuela, povoar de estrelas teu meigo sonhar
 E quando enxergares a estrela cadente, é meu sonho insistente a te cortejar

Jayro Lambari Fernandes

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Orientador Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, pela orientação e pela confiança em mim depositada durante a realização do curso.

À Professora e Co-orientadora Dr^a Elisabeth Gonzales, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e carinho.

Ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, pela oportunidade de realização deste trabalho e também pelo auxílio financeiro recebido.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo apoio logístico prestado durante o curso.

A empresa Hygen Genética Avícola, nas pessoas do Sr. José Antônio Campos Fracasso e Jonivan Paloschi, pelo provimento dos ovos incubáveis para realização do experimento e pela disponibilidade em ajudar nesta minha caminhada.

Ao Sr. Valdir Centenaro, fiel parceiro desta empreitada, pela ajuda durante toda a realização do experimento. Obrigado pela amizade e apoio.

À equipe do laboratório da empresa Hygen, pela ajuda durante minhas sessões experimentais e pelo carinho e amizade a mim destinados.

A todos colaboradores da empresa Hygen Genética Avícola, especialmente Rogério Stabellini e Carmelina Simões, pela ajuda e constante motivação passada nestes anos.

A Sr. Felipe Kroetz Neto, pela ajuda no início da caminhada e pela incansável amizade e carinho. Obrigado parceiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução deste trabalho e não foram citados nominalmente, mas que não estão esquecidos, muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|---------|
| TABELA 1 | Índices de incubação médios do lote estudado, índices de incubação sugeridos pelo manual da linhagem Avian Cobb 48 e número médio de PEMPE. |34 |
| TABELA 2 | Resultados da contagem de PEMPE em ovos de reprodutoras tipo corte em função da idade. |36 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|---|---------|
| FIGURA 1 | Resultados da contagem de PEMPE em ovos de reprodutoras tipo corte em função da idade. |32 |
| FIGURA 2 | Número médio de PEMPE/0,27mm ² de ovos de reprodutoras tipo corte durante o período experimental. |37 |
| FIGURA 3 | Taxa de fertilidade e eclosão de ovos de reprodutoras tipo corte durante o período experimental. |37 |
| FIGURA 4 | Correlação entre a média de perfurações espermáticas e a fertilidade (a) e a média de perfurações espermáticas e a eclosão (b). |39 |

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| RESUMO | viii |
| ABSTRACT | ix |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1- INTRODUÇÃO | 2 |
| 2- OBJETIVO | 4 |
| 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1- Anatomia do sistema reprodutivo da galinha..... | 5 |
| 3.1.1- Ovário | 5 |
| 3.1.2- Oviduto | 6 |
| 3.1.2.1 Infundíbulo..... | 7 |
| 3.1.2.2 Magno | 7 |
| 3.1.2.3 Istmo | 7 |
| 3.1.2.4 Útero | 8 |
| 3.1.2.5 Vagina..... | 8 |
| 3.2 Ovo..... | 8 |
| 3.3 Estrutura anatômica das membranas da gema | 10 |
| 3.4 Seleção e transporte espermático no oviduto | 11 |
| 3.5 Fertilização aviária | 13 |
| 3.6 Fixação e penetração espermática..... | 14 |
| 3.7 Interação oócito e espermatozóide | 14 |
| 3.8 A técnica de contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica | 17 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 18 |
| CAPÍTULO 2 | 24 |
| TRABALHO CIENTÍFICO | 25 |

RESUMO

JASKULSKI, RODRIGO WEIDE. Perfurações espermáticas ao redor do disco germinativo de ovos incubáveis e correlação fertilidade e eclodibilidade de reprodutoras pesadas. Botucatu, 2010. 54p. Dissertação (mestrado). Universidade Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

No presente estudo foram correlacionados os resultados das contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa de ovos incubáveis com as taxas de eclosão e fertilidade, objetivando-se analisar a possibilidade do uso dessa técnica como alternativa aos métodos tradicionais de avaliação da fertilidade, executados no incubatório. As avaliações foram realizadas a cada três semanas durante todo o período reprodutivo de um lote comercial de matrizes de corte da linhagem Avian Cobb 48, submetidas à monta natural a partir da 25^a semana de idade. Foram realizadas 10 avaliações, sendo utilizados 30 ovos em cada avaliação. Foi realizada a extração, fixação e coloração da membrana perivitelínica externa para possibilitar a visualização das perfurações ao microscópio óptico. A idade da ave influenciou negativamente o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa, bem como a taxa de fertilidade e de eclosão. Houve correlação positiva entre o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica e a taxa de fertilidade ($r= 0,885$; $P<0,05$), assim como com a taxa de eclosão ($r= 0,800$; $P<0,05$). É possível inferir que a contagem de perfurações espermáticas pode ser utilizada como ferramenta de avaliação da fertilidade de ovos incubáveis.

PALAVRAS CHAVES Reprodutoras pesadas, fertilidade, perfuração espermática

ABSTRACT

JASKULSKI, RODRIGO WEIDE. Sperm penetration in germinal disc region of hatching eggs - practical use. Botucatu, 2010. 54p. Dissertação (mestrado). Universidade Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

Abstract - In this study we correlated the results of counting sperm penetration in the outer perivitelline layer of hatching eggs to the fertility and hatching rates, aiming to examine the possibility of using this technique as an alternative to traditional methods of fertility evaluation, performed in the hatchery. The evaluations were performed every three weeks throughout the reproductive period of a flock of commercial broiler strain Cobb Avian 48, submitted to natural mating from the 25th week of age. Were performed 10 evaluations, 30 eggs were used in each assessment. Was extracted, fixed and stained outer perivitelline layer to enable viewing of holes in an optical microscope. The bird's age negatively influenced the number of sperm holes in the outer perivitelline layer and the fertility rate and hatching. A positive correlation between the number of sperm holes in the perivitelline layer and the fertility rate ($r = 0.885$, $P < 0.05$), as well as the hatching rate ($r = 0.800$, $P < 0.05$). It can infer that the sperm count of holes can be used as a tool for assessing the fertility of eggs hatching.

KEY WORDS: Broilers breeders, fertility, sperm penetration

CAPÍTULO 1

1- INTRODUÇÃO

A indústria avícola tem demonstrado um extraordinário desenvolvimento durante as últimas décadas. A carne de frango, outrora colocada em segundo plano no cenário do comércio de carnes, vem, ano após ano, se consolidando como uma das mais importantes fontes de proteína animal para alimentação humana. O crescente aumento da demanda do produto conduziu a avicultura industrial a elevar a eficiência da criação de frangos de corte, com intuito de diminuir o custo de produção respeitando os princípios de bem estar animal, exigência do consumidor moderno.

Desde o início da década de 40, a necessidade de produzir carne de frango em larga escala fez com que fossem intensificadas as pesquisas envolvendo genética, nutrição e manejo. Essas áreas evoluíram rapidamente, dando origem aos moldes de criação atuais, nos quais se obtém valores próximos ao máximo de rendimento das aves. A indústria avícola brasileira ocupa, atualmente, lugar destacado na produção mundial de carne de frango. No ano de 2008 o país produziu cerca de 10,94 milhões de toneladas de carne de frango, que o colocou na posição de segundo maior produtor e líder na exportação mundial de carnes desta espécie (União Brasileira Avicultura, 2009).

Em consequência disso, nas últimas décadas, o setor avícola tem observado a melhora dos seus parâmetros produtivos e essa melhora tem significado um aumento no rendimento do produto, assim como um desafio para os integrantes da cadeia produtiva. Através da seleção genética é possível aumentar o peso e a eficiência alimentar das reprodutoras pesadas, com intuito de obter descendentes com índices cada vez maiores de transformação de alimento em carne. Tais características, em reprodutores, são antagônicas às características reprodutivas, o que transforma a tarefa de se obter um grande número de pintinhos por fêmea alojada cada vez mais desafiadora.

Conhecimento aprofundado da fisiologia reprodutiva das aves e o desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem no monitoramento e a seleção de reprodutoras pesadas, de linhas puras ou de granjas de multiplicação genética contribuem para que haja um incremento na eficiência reprodutiva das atuais linhagens de alta conformação. Técnicas

capazes de diagnosticar problemas de fertilidade com alta sensibilidade e confiabilidade, refletindo pequenas mudanças na capacidade reprodutiva, tanto das fêmeas quanto dos machos e, conseqüentemente, na eclodibilidade dos ovos, devem ser desenvolvidas.

Uma técnica, desenvolvida por Branwell et al. (1995), ofereceu a indústria e à comunidade acadêmica um método capaz de analisar quantitativamente o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa (PEMPE) de ovos incubáveis. Com base nessa contagem, pode-se fazer uma avaliação da capacidade de fertilização do óvulo. Desde então, esse tema tem sido objeto de estudo de vários autores que correlacionam o número de PEMPE com fatores relacionados à fertilidade de reprodutores, galiformes ou não (Branwell & Howarth, 1992; Mcdaniel et al., 1996; Branwell et al., 1996; Fairchild & Cristhensen., 2005). Essa técnica, de simples execução, quando utilizada de forma intensiva em granjas reprodutoras, pode permitir que se obtenha uma avaliação rápida da situação reprodutiva do plantel. Constitui-se, assim, em uma ferramenta importante nos processos decisórios para uma possível correção de manejo nutricional, sanitário ou de criação. Ela também pode ser útil em granjas de melhoramento genético para seleção de indivíduos com maior capacidade de fertilização (Branwell & Howarth, 1992).

2- OBJETIVO

No presente estudo objetivou-se fundamentar o uso da técnica de contagem de PEMPE em ovos incubáveis como alternativa aos métodos tradicionais de avaliação da fertilidade executados no incubatório.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Anatomia do sistema reprodutivo da galinha

Nas aves, assim como nos mamíferos, dois ovários e dois ovidutos são formados durante a embriogênese. É um fato característico das aves, a usual supressão do desenvolvimento posterior desses órgãos do lado direito, resultado da secreção pelo ovário de substâncias inibidoras do ducto de Müller, origem do oviduto. O ducto esquerdo é protegido por apresentar maior número de receptores para estrogênio, sendo assim, mais sensível a este hormônio que o ducto direito (Bull, 1994). Aparentemente o estrogênio impede a ação de substâncias inibidoras do ducto de Müller (Rutz et al., 2007).

3.1.1- Ovário

Nos primeiros cinco meses de vida, o ovário desenvolve-se gradativamente, passando de uma pequena estrutura irregular com superfície granular fina para uma estrutura onde podem ser observados folículos individuais. Esses folículos aumentam rapidamente em número e tamanho, até alguns apresentarem vários centímetros de diâmetro. O ovário maduro lembra um cacho de uvas, devido ao fato de conter milhares de folículos e fica ligado à parte cranial do rim esquerdo. Os folículos maiores são pendulares e constituídos de um grande oócito cheio de gema, cercado por uma parede folicular altamente vascularizada (Dyce, 1997). Durante o desenvolvimento da maturidade sexual, o peso ovariano passa de 0,5 g a até 40-60 g. A maior parte deste aumento de peso provém de quatro a seis folículos em desenvolvimento, sendo que o maior deles pode pesar cerca de 20 g, com diâmetro de aproximadamente 40 mm (Getty, 1981).

O ovário das aves difere dos mamíferos pelo seu tamanho e sua organização hierárquica. Nos 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 é liberado dentro de um intervalo mais curto. Além disso, como as aves não sofrem gestação, o embrião deve obter todos os nutrientes para o seu desenvolvimento fora do corpo maternal. Este fato faz com que o óvulo maturo das aves seja muito maior que o de mamíferos, servindo como fonte energética e proteica durante o período inicial de

desenvolvimento. Nas aves, os folículos grandes e amarelos, destinados a ovulação, estão organizados dentro de uma hierarquia (Rutz et al., 2007). O controle da hierarquia folicular que permite a ovulação diária é estabelecido pelos folículos pequenos (seis a oito milímetros). O folículo amarelo que ultrapassar seis milímetros de diâmetro entra em hierarquia, continua a desenvolver e ovula. Entretanto, eventos moleculares dentro de folículos menores (menor que oito milímetros) fazem com que muitos folículos entrem em atresia, enquanto outros folículos são selecionados para entrar em hierarquia (Jonhson, 1993).

Uma das principais funções dos ovários é a produção de hormônios esteróides, essenciais para o crescimento e função do trato reprodutivo. Dentre esses, está a progesterona, a qual estimula a secreção de albúmen no magno e indução do pico de LH. Os androgênios atuam em características sexuais secundárias (crista e barbela). Os estrogênios desencadeiam a síntese da gema pelo fígado e a mobilização de cálcio dos ossos medulares para a formação 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, pois não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, já que não há prenhes para manter (Bahr e Johnson, 1991).

3.1.2- Oviduto

O oviduto está associado ao ovário e é equivalente ao canal deferente do macho. Na ave em postura, o oviduto aparece como um tubo largo com dobras, altamente vascularizado e ocupa uma grande extensão na cavidade abdominal (Moreng & Evans, 1990). Esta estrutura conduz o ovo fertilizado para a cloaca, adicionando a esse quantidades substanciais de nutrientes e, envolvendo o ovo com membranas e casca, as quais conferem proteção ao embrião. Esta estrutura também tem a função de transportar espermatozóides para a fertilização, podendo servir como local de armazenagem para estes, já que uma inseminação é suficiente para fertilizar os ovos liberados durante aproximadamente 10 dias (Dyce, 1997). Durante o período pré-reprodutivo da ave, o oviduto mede de 10 a 30 cm de comprimento, aumentando para 50 a 70 cm durante o período de atividade reprodutiva (Bull, 1994). Em uma ave pré-púbere, o peso deste órgão é de aproximadamente 0,2 g,

podendo passar de 50 g em uma ave em idade produtiva. Esse aumento de até 250 vezes no seu peso está relacionado com a elevação pré-puberal da concentração de andrógenos, estrógenos e progesterona (Etches, 1998). Anatômica e funcionalmente o oviduto pode ser dividido em cinco regiões:

3.1.2.1 Infundíbulo

A estrutura chamada infundíbulo é a extremidade caudal do oviduto, formada por uma porção de parede delgada, com formato de funil, e um tubo mais espesso – a região tubular. O seu óstio é posicionado pelo saco aéreo abdominal esquerdo, o que facilita a apreensão do oócito recém liberado. O oócito leva aproximadamente 15 min para passar pelo infundíbulo e, durante este período as glândulas infundibulares fornecem-lhe a camada calazífera ou calazas. As calazas, por sua vez, correspondem a dois espessamentos de albúmen retorcidos no sentido horário, os quais mantêm a gema no centro do ovo e permitem-na girar, para que o disco germinativo permaneça sempre no lugar mais alto, independente da posição do ovo (Dyce, 1997).

3.1.2.2 Magno

O magno é uma estrutura altamente espiralada com cerca de 30 cm, sendo o segmento mais longo do oviduto (Bull, 1994). Suas paredes apresentam pregas mucosas maciças, cobertas por glândulas que tem a função de adicionar cerca de metade do albúmen total ao ovo. Na extremidade distal do magno, as pregas mucosas são mais baixas, levando o ovo aproximadamente três horas para atravessar este segmento do magno (Dyce, 1997).

3.1.2.3 Istmo

O istmo está situado entre o magno e o útero, é curto e estreito, variando o comprimento entre quatro e 12 cm. Esta estrutura é reconhecida macroscopicamente por suas paredes finas e por pregas luminiais menos volumosas do que as encontradas no magno (Hafez, 2004). Nesse segmento são secretadas as duas membranas da casca e o ovo permanece por cerca de uma hora e meia nesse local (Bull, 1994).

3.1.2.4 Útero

O útero ou glândula da casca é uma região curta e dilatada em forma de bolsa. Na galinha, em idade reprodutiva, seu comprimento pode variar de quatro a 12 cm, assim como o istmo. Sua parede mucosa apresenta pregas longitudinais e transversais que abrigam glândulas tubulares de estrutura semelhante às glândulas do magno (Dyce, 1997). É nessa porção que o ovo permanece o maior tempo, cerca de 20 horas. O processo mais importante que acontece nesta região é a calcificação da casca. O crescimento dos cristais de cálcio se dá a uma taxa de 300 mg de cálcio por hora. As tarefas finais do útero são a pigmentação e a formação da cutícula, camada externa à casca que tem função protetora (Hafez, 2004).

3.1.2.5 Vagina

A vagina é um tubo muscular em forma de “S”, por onde o ovo passa rapidamente quando é expelido. Ela desemboca em uma abertura semelhante a uma fenda, na parede lateral do urodeu. Quando o ovo é posto, a abertura vaginal projeta-se através do ânus, reduzindo o contato deste com as fezes (Dyce, 1997).

3.2 Ovo

O ovo é um recipiente biológico que contém os materiais orgânicos e inorgânicos necessário para a propagação de algumas espécies. Ele é considerado a unidade reprodutora mais complexa e diferenciada da natureza. Contém o óvulo, envolto por grande quantidade de material nutritivo. Em um ovo não fertilizado, os cromossomos maternos se encontram unidos em uma zona denominada blastodisco, na superfície da gema. Quando o ovo é fertilizado, essa região é ocupada por um embrião que contém de 30.000 a 40.000 células e passa a ser denominada blastoderme (Etches, 1998). O ovo é envolvido por uma casca permeável, permitindo que ocorra a troca de gases entre o meio interno e externo. Diferentes tipos de aminoácidos, lipídios, vitaminas e minerais, necessários para o crescimento do embrião, estão armazenados em seu interior na forma de albume (clara) e gema (Bull 1994).

Em todas as espécies de aves, a gema representa de 32-35% do ovo, o albume 52-58% e o restante, 9-14%, é representado pela casca e suas membranas (Etches 1998).

A casca é uma barreira física que, além de permitir as trocas gasosas, após o 10º dia de incubação, participa com a doação de cálcio de 80% da formação esquelética do embrião. Na parte externa, apresenta a cutícula, um material protéico que funciona como barreira bacteriana, auxiliando também a regular a perda de umidade e trocas gasosas. Internamente, a casca apresenta duas membranas, uma externa mais espessa e outra interna, mais fina, onde existem fibras protéicas inter cruzadas, dificultando a entrada de bactérias e resistindo a movimentos hídricos (Ar et al., 1976).

O albume possui a função de auxiliar o correto posicionamento da gema e blastoderme. Além disso, protege mecanicamente a blastoderme no início do desenvolvimento embrionário e minimiza ataques de microrganismos patogênicos. O albume também mantém a hidratação do embrião, auxilia na formação da câmara de ar e constitui-se em reserva alimentar ao embrião (Etches, 1998).

A rotação em seu próprio eixo, com a passagem do ovo através do oviduto, faz com que proteínas presentes no albume se interliguem, formando dois ligamentos proteináceos chamados de chalazas. Estas estruturas se projetam dentro da capa intermediária e têm a função de posicionar a gema no centro do ovo (Etches, 1998).

O albume é formado pelas proteínas: ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucóide, avidina e lisozima. A ação destas proteínas confere proteção embrionária contra a ação bacteriana. Os mecanismos envolvidos nesta proteção são: alta viscosidade, a qual impede a movimentação do agente contaminante para o centro do ovo, ação da avidina sobre a reprodução bacteriana, pela característica desta de se ligar à biotina bacteriana e a ação direta das lisozimas hidrolisando polissacarídeos da parede bacteriana (Wolanski et al., 2007).

A gema contém o pró-núcleo feminino e a maioria dos nutrientes necessários ao desenvolvimento embrionário. Além de conter esses nutrientes é rica em imunoglobulina G (IgG), a qual confere imunidade materna ao embrião (Hafez, 2004). Em um oócito não fertilizado, os cromossomos são armazenados em uma estrutura chamada de blastodisco. Essa estrutura é macroscopicamente visível na superfície da gema como uma pequena mancha branca de aproximadamente 3 mm de diâmetro (Etches 1998).

3.3 Estrutura anatômica das membranas da gema

A gema é rodeada por quatro camadas lipoprotéicas concêntricas que juntas formam a membrana perivitelínica externa da gema (Bellairs et al., 1963). As duas mais externas são derivadas do oviduto e, as duas internas do ovário. As camadas são assim denominadas: membrana vitelínica (8 nm), espaço vitelínico, membrana perivitelínica (MP) (4µm), membrana média contínua (50 a 100 nm) e capa extravitelínica ou membrana perivitelínica externa (MPE) (6 µm) (Etches, 1998). Essas membranas são homólogas a zona pelúcida que engloba o oócito nos mamíferos (Sasanami et al., 2007).

Nas áreas distantes do blastodisco, a membrana vitelínica é intimamente ligada a membrana perivitelínica. Na região do blastodisco, a membrana vitelínica está densamente povoada de microvilosidades que se projetam dentro do espaço perivitelínico, local de união espermática durante a fertilização (Bakst & Howarth, 1977).

Já a membrana perivitelínica externa (MPE) que é acrescentada à gema na porção final do infundíbulo e superior do magno. A presença dessa camada, rica em inibidores de tripsina, previne a entrada adicional de espermatozóides no oócito, o que pode ser prejudicial à fertilização (Bekhtina, 1968; Howarth, 1971). Stelle et al. (1994) sugerem que a introdução desta camada altera as características da membrana perivitelínica de se ligar aos espermatozóides. Robertson et al. (1997) notaram que quando a membrana perivitelínica foi separada do complexo de membranas perivitelínicas após a ovoposição ela manteve as características de ligação de espermatozóides, tal qual um oócito coletado logo após a ovulação. Esses resultados sugerem que o bloqueio realizado pela MPE aos espermatozóides é mais mecânico que químico, concordando com os resultados de Howarth e Digby (1973).

Embora a polispermia seja uma característica fisiológica nas aves, a excessiva entrada de espermatozóides no oócito pode ter efeitos deletérios na fertilização (Bekhtina, 1968). Em suas pesquisas com a contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, Fofanova (1965) e Branwell et al. (1995) encontraram centenas de orifícios, no entanto, somente 30 pró-núcleos foram encontrados. Isso sugere que nem todos os espermatozóides que entram a membrana perivitelínica conseguem entrar em contato com o ooplasma feminino.

Observações feitas por Bakst & Howarth (1977) indicaram que a membrana perivitelínica do blastodisco é estruturalmente diferente do restante da gema. Nessa região encontra-se o maior número de espermatozóides no momento da fertilização.

As proteínas que formam as camadas perivitelínicas do oócito têm sequência similar a família das proteínas ZPC. Em galinhas, foram identificadas as glicoproteínas ZP1 (ZPB1), ZPB (ZPB2), ZP2 (ZPA), ZP3 (ZPC) e ZPD (Waclawek et al., 1998). Stewart et al. (2004) comprovaram que os espermatozóides de galo interagem com membranas perivitelínicas de várias outras espécies de aves, com graus médios de interação de: 100% com outros galiformes (galinha, peru, codornas, faisão e galinhas de angola), 44% com anseriformes (pato e ganso) e menos de 30% com passeriformes (pássaros) e columbiformes (pombas). Essa interação pode ser explicada pelo fato de que um homólogo da proteína ligadora de espermatozóides das galinhas, ZP1 e ZP3, foi identificado em todas as espécies de aves estudadas.

3.4 Seleção e transporte espermático no oviduto

Após a introdução dos espermatozóides na cloaca da fêmea, seja por monta natural ou inseminação artificial, uma série de fatores atuam selecionando-os ao longo do oviduto da ave, definindo a quantidade e a qualidade dos espermatozóides que chegam até o sítio de fertilização, no sistema reprodutivo da fêmea. A presença de um ovo no oviduto torna-se uma barreira física à passagem do espermatozóide, além disso, as secreções deste órgão também podem exercer seleção sobre os mesmos. A resposta imune da fêmea à de um corpo estranho representado pelo ejaculado e o ambiente inóspito da vagina também afetam quantitativa e qualitativamente os espermatozóides destinados a fertilização.

No oviduto da ave, principalmente na vagina, existe uma camada ciliar longitudinal externa, contínua ao músculo liso dos ligamentos dorsal e ventral do oviduto. Os cílios provêm o movimento peristáltico do oviduto que, além de deslocar o ovo ao longo deste órgão, também expõem um grande número de espermatozóides após a monta natural ou inseminação artificial (Bakst, 1994). A presença do ovo no istmo ou magno prejudica o transporte de espermatozóides, porém, se este estiver no útero, não há prejuízo ao transporte de células (Mimura, 1937). Segundo Howarth (1971), somente 20% dos espermatozóides permanecem viáveis 30 minutos após a inseminação. De acordo com

Bakst (1994), os espermatozóides devem possuir uma combinação entre as características de viabilidade, motilidade, atividade metabólica e integridade das membranas plasmáticas para obterem êxito na passagem destas barreiras.

Ao contrário da maioria dos mamíferos, nos quais os espermatozóides permanecem por um período de tempo relativamente curto no trato feminino, os espermatozóides das aves que transpõem a vagina são armazenados em modificações da membrana do trato reprodutivo da fêmea chamadas de túbulos de estocagem seminal (TES), localizados na junção útero-vaginal (Bohr et al., 1964). Nas galinhas, espermatozóides armazenados neste local podem permanecer viáveis por períodos de até 32 dias, sendo em peruas, este tempo pode chegar a 70 dias (Hafez, 2004). Os espermatozóides são expostos a vários fatores, nos túbulos de estocagem seminal, que suprimem a motilidade, o metabolismo espermático, a enzima acrosina, a imunogenicidade espermática e estabilizam as membranas plasmáticas. Acredita-se que possa haver influência do zinco, cálcio e do ácido glutâmico nestas mudanças fisiológicas dos espermatozóides nesse local.

Birkhead (1998) relata que, por intermédio do teste de DNA, pode-se comprovar a paternidade de perus inseminados com um *pool* de espermatozóides de diferentes machos. Nesses experimentos foi encontrado prevalência de reprodutores, evidenciando que existe uma seleção espermática nos túbulos de estocagem.

Segundo Brillard (1992), há uma maior quantidade de espermatozóides nos túbulos de estocagem em aves jovens, quando comparados com aves mais velhas. O número de espermatozóides nos túbulos de estocagem também varia de acordo com o número de cópulas ou inseminações. Inseminações realizadas antes da postura diária propiciam menor armazenagem de células nos túbulos de estocagem quando comparadas a inseminações realizadas após a postura do ovo (Mcintyre & Christensen, 1983). Ainda segundo Brillard (1993), o volume de sêmen inoculado pode ter influência no número de espermatozóides armazenados nos túbulos de estocagem.

Os espermatozóides alcançam o sítio de fertilização, localizado no infundíbulo, em um tempo mínimo de 15 minutos. Segundo Mimura (1937), o antiperistaltismo do oviduto é o mecanismo primário de transporte dessas células até o local. Ao contrário da fertilização nos mamíferos, o espermatozóide das aves não necessita passar pelo processo de capacitação no oviduto. Esse fato foi comprovado por meio de experimentos, nos quais

foram realizadas inseminações com espermatozóides coletados diretamente do ducto deferente de galos. Nesses estudos foram encontrados resultados semelhantes a inseminação comumente utilizada, com coleta por massagem abdominal (Bakst & Cecil, 1981). Entretanto, um processo semelhante ao processo de capacitação nos mamíferos acontece no infundíbulo das aves. Quando os espermatozóides que estão armazenados nos túbulos de estocagem seminal são lançados para realizar a fertilização de um óvulo, existe aumento na motilidade, metabolismo e desestabilização da membrana plasmática (Bakst et al., 1994).

De acordo com Mímura (1937), os espermatozóides tem pouca resistência no istmo e magno. Uma vez alcançado o infundíbulo, o espermatozóide pode realizar a fertilização, ser armazenado temporariamente em locais de estocagem espermática secundários, ser capturado pela membrana perivitelínica externa do óvulo ou se perder dentro da cavidade abdominal da ave.

O infundíbulo é dividido em três regiões: região fimbriada (próximo ao ovário), a região afunilada (mais proximal) e a região chalazífera, mais distal (Dyce, 1997). Os sítios de armazenamento espermático secundário são localizados na região chalazífera. Embora o infundíbulo seja considerado um local de armazenamento espermático secundário, há ainda poucos experimentos que exploram as funções e características dessa região. Esse local apenas está relacionado com a capacidade de manter viáveis os espermatozóides e lançá-los, passivamente, até a região afunilada do infundíbulo onde poderá encontrar um óvulo para ocorrer a fertilização (Etches, 1998).

3.5 Fertilização aviária

O processo de fertilização, que pode ser resumido como a entrada do gameta masculino no oócito feminino, é composto por vários passos que incluem: o contato ou a interação entre as membranas do oócito e do espermatozóide; a entrada do espermatozóide no oócito, a ativação metabólica do oócito, o reinício da meiose no oócito e a formação e fusão dos pró-núcleos masculino e feminino (Hafez 2004). O encontro entre os gametas acontece na região afunilada do infundíbulo onde, um ou vários espermatozóides atravessam a membrana perivitelínica externa, preferencialmente na região do disco germinativo, e digerem um orifício de 10-20 μm , penetrando no oócito feminino (Bakst &

Howarth, 1977). No momento da ovulação, o pró-núcleo feminino está na fase de metáfase, da segunda divisão meiótica (Etches, 1998). Após 15 minutos da ovulação, os espermatozoides penetram na membrana perivitelínica externa (Bakst & Howarth, 1977).

3.6 Fixação e penetração espermática

A ligação do espermatozoide com a membrana perivitelínica (MP) do oócito e a subsequente reação acrossômica é um importante evento que define o sucesso da fertilização em aves. O resultado desta interação é um orifício hidrolizado pelo qual o espermatozoide penetrou no oócito. (Bakst & Howarth, 1977; Waclawek et al., 1998). O espermatozoide das aves penetra na membrana perivitelínica do oócito de forma digestiva (Bellairs et al., 1963; Fugii, 1976), assim como acontece nos mamíferos. Okamura e Nishiyama (1978) relataram que no momento em que o espermatozoide das aves entra em contato com a membrana perivitelínica, ele é submetido a uma reação acrossomal, resultando na fusão da membrana acrossomal externa do espermatozoide, do plasmalema, sua vesiculação e posterior liberação das enzimas acrossomais, principalmente a acrosina. Esta reação permite a digestão de um caminho ou orifício na membrana perivitelínica pelo qual o espermatozoide entrará. Após a fusão com a membrana plasmática do oócito, o envelope nuclear do espermatozoide se desintegra e o material de cromatina liberado sofre uma descondensação. Uma vez que os pró-núcleos masculino/feminino estejam em íntima proximidade, os envelopes nucleares se dispersam propiciando uma intermistura dos cromossomos (Etches, 1998).

3.7 Interação oócito e espermatozoide

Nas aves, a polispermia, ou seja, a penetração de mais de um espermatozoide na membrana perivitelínica, é um evento fisiológico. As aves não possuem o mecanismo dos mamíferos em que, imediatamente após a fertilização, a superfície do oócito sofre modificações que impedem a penetração de espermatozoides adicionais (Etches, 1998). A ocorrência de múltiplas penetrações e a formação de vários orifícios na membrana perivitelínica do oócito recém fertilizado é normal. A maioria desses orifícios estão concentrados em uma área circular de 2,6 mm ao redor do disco germinativo. Uma possível atração quimiostática dos espermatozoides para essa área foi discutida por Rothschild

(1956) em seus escritos sobre as regras quimiotáticas do processo de fertilização. Outros autores sugerem que este fato se deve a ausência de cálcio na região do disco germinativo. Embora o cálcio não seja o responsável pela atração dos espermatozóides para esta área, ele é necessário a ativação do espermatozóide, possivelmente induzindo a reação acrossoma do espermatozóide com o oócito (Holm et al. 2000). Bakst (1988) utilizando a microscopia eletrônica, encontrou diferença no tamanho e no número de vilosidades na área ao redor do disco germinativo e nas áreas adjacentes a esta estrutura. Isso sugere que as vilosidades na região do disco germinativo estejam associadas a ligação espermática nas aves. Ao redor do disco germinativo há, aproximadamente, 20-25 vezes mais perfurações que nas outras áreas da membrana perivitelínica (Branwell et al., 1995; Wishart, 1997), sendo esta uma relação linear ($r=0,81$)(Wishart, 1997).

Poucos minutos após a ovulação, no magno, a membrana perivitelínica externa (MPE) é secretada sobre a membrana perivitelínica (Bellairs et al., 1963). Espermatozóides encontrados nesse local estão aderidos a estrutura proteínica da membrana perivitelínica externa. Há aproximadamente 10 vezes mais espermatozóides aderidos na membrana perivitelínica externa do que orifícios na membrana perivitelínica.

Também existe correlação entre o número de perfurações na membrana perivitelínica encontradas ao redor do disco germinativo, o número de perfurações na membrana perivitelínica encontradas em outras regiões do ovo fora do disco germinativo e; o número de espermatozóides encontrados na membrana perivitelínica externa (Branwell et al., 1995; Wishart, 1997). Pesquisas foram realizadas a fim de determinar a possível correlação entre esses parâmetros e a probabilidade de um ovo de galinha estar fertilizado. Dentre essas, Wishart (1997) relata que um ovo tem 50% de probabilidade de estar fertilizado se possuir mais que 0,1 espermatozóides na membrana perivitelínica externa por mm^2 . Em adição, o autor concluiu que um ovo tem 50% de chance de estar fértil se, no mínimo, três espermatozóides penetrarem na membrana perivitelínica sobre o disco germinativo, sendo que as maiores taxas de fertilidade foram obtidas quando houve seis perfuração nesta mesma região. Resultados semelhantes foram encontrados por Branwell et al. (1995) ao pesquisarem a frequência de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, sobre o disco germinativo.

É assumido que o número de espermatozóides aderidos sobre a membrana perivitelínica externa está relacionado com o número de espermatozóides presentes no infundíbulo e na porção inicial do magno, no momento da fertilização (Wishart, 1997).

Os túbulos de estocagem seminal são os principais locais de armazenagem de espermatozóides no oviduto, o número de espermatozóides aderidos na membrana perivitelínica externa ou o número de orifícios da membrana perivitelínica são altamente correlacionados com o número de espermatozóides disponíveis para fertilização de um ovo (Bakst, 1994).

Staines (1998) concluiu que a contagem tanto de orifícios espermáticos na membrana perivitelínica quanto do número de espermatozóides aderidos na membrana perivitelínica externa podem ser utilizadas para estimar a fertilidade de um lote de aves comerciais. A contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica também pode ser utilizada para avaliação de sêmen de aves e mostra ter, para esta espécie, mais sensibilidade e acurácia em diagnosticar danos as membranas espermáticas que os testes usuais de motilidade e viabilidade (Kasai, et al. 2000).

Segundo Robertson et al. (1997), para que os espermatozóides realizem as perfurações é necessária complexa interação de parâmetros regulatórios hormonais e metabólicos aliada a fatores como: motilidade espermática, ligação entre o oócito e o espermatozóide, indução da reação acrossomal e da hidrólise da membrana perivitelínica. Portanto, a técnica de contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica avalia o resultado da soma de todos os eventos citados acima, o que confere ao teste ampla capacidade de avaliação da fertilização aviária.

A idade da ave influencia a quantidade de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa. Gumalka e Kapowska (2005) estudaram dois lotes de matrizes pesadas, de diferentes idades inseminadas com sêmen de galos da mesma idade e observaram que as aves de 36 semanas tiveram dois dias a mais de fertilidade efetiva do que aves de 56 semanas. Todos os índices de fertilidade diminuíram com o aumento da idade das fêmeas, mesmo quando estas foram inseminadas com sêmen de galos mais jovens. A duração da fertilidade está mais relacionada com a fêmea, por uma possível perda na capacidade de armazenamento dos túbulos de estocagem seminal. Fairchild & Cristhensen (2005) também observaram diferenças significativas no número de perfurações

espermáticas na membrana perivitelínica de ovos de peruas com idades distintas. Além disso, os autores relacionaram a diminuição no número de perfurações com o aumento nos índices de mortalidade embrionária precoce.

As linhagens também apresentam comportamento diferenciado com relação ao número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica. Segundo Christensen et al. (2005), linhagens selecionadas para crescimento rápido apresentam índices inferiores de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, quando comparadas com linhagens selecionadas para produção de ovos. Em consequência, a fertilidade dos ovos e a viabilidade embrionária também são afetadas negativamente.

A proporção entre machos e fêmeas em um lote parece afetar significativamente o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica. Comparando as taxas de fertilidade de matrizes pesadas de três idades distintas, Hazary et al. (2001) encontraram resultados de fertilidade superiores nos lotes nos quais havia um menor número de fêmeas para cada macho alojado.

3.8 A técnica de contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica

A avaliação da quantidade de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica é feita por meio de uma técnica descrita, inicialmente, por Bramwell (1992) e modificado em alguns aspectos por Donoghue (1996). A técnica consiste na separação e colheita da gema, que é passada cuidadosamente em papel filtro para remoção do albúmem remanescente ao redor desta. Uma porção de aproximadamente 1 cm² da membrana perivitelínica na região do disco germinativo é retirada e imersa em solução salina para remoção do restante de albúmem e gema. O pedaço da membrana é colocado sobre uma lâmina com auxílio de pinça e agulha e fixado com formalina 20%, retirando-se o excesso logo em seguida. A seguir, algumas gotas do reativo de Schiff são depositadas sobre esta membrana para corala. Após este procedimento, coloca-se uma lamínula sobre a membrana e visualiza a estrutura e perfurações espermáticas em microscópio ótico em aumento de 100 vezes. A contagem é realizada em 5 campos de 0,27 mm², totalizando uma área de 1,35 mm.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AR, A.; PAGANELLI, C. V.; REEVES, R. B.; GREENE, D. G.; RHAN, H. The avian egg wather vapor condutance, shell tchicness and functional pore area. **The Condor**, v.76, p. 153-158, 1976.

BAHR, J.M.; JOHNSON, P.A. Reproduction in poltry. In:**Reproduction in domestic animals**. San Diego, Academic Press Inc., California, 1991, p.555-575.

BAKST, M. R.; HOWARTH, B. Hydrolysis of the hen's perivitelline membrane by cock sperm in vitro, **Biology Reproduction**, v.17, p. 370-379, 1977.

BAKST, M. R.; CECIL, H. C. Changes in the characteristics of turkey ejaculated semen and ductus deferens semen with repeated ejaculations. **Reproduction Development**, v. 21, p. 1095-1103, 1981.

BAKST, M. R. Turkey hen fertility and egg production after artificial insemination and multiple oviduct eversion during the pre-laying period. **Journal of Reproduction and Fertility**,v. 83, p. 873-877, 1988.

BAKST, M. R. Fate of fluorescent stained sperm following insemination: New light on oviducal sperm transport and storage in the turkey, **Biology reproduction**, v.50, p. 987-992, 1994.

BEKHTINA, V. G. Morphological features of polyspermy fecundation in hens. In In: Pushkin Research Laboratory of Livestock Breeding, 1968. Leningrado – Rússia. **Anais...Leningrado**. 1968. p. 148-156.

BELLAIRS, R. M.; HARKNESS, M.; HARKNESS, R. D. The vitelline membrane of the hen's egg: a chemical andelectron microscopical study, **Journal of Ultrastructure Research**, v.8, p. 339-359, 1963.

- BIRKHEAD, T.R. Sperm competition in birds, **Reviews of Reproduction**, 1998.
- BIRKHEAD, T. R.; SHELDON, B. C.; FLETCHER, F. A comparative study of sperm-egg interactions in birds, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 353-361, 1994.
- BOBR, L. W.; LORENZ, F. W.; OGASAWARA, F. X. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds, **Journal of reproduction and fertility**, v.8, p. 39-47, 1964.
- BRANWELL, R. K., HOWARTH, B. Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum, **Biology Reproduction**, v. 47, p. 1113-1117, 1992.
- BRANWELL, R. K., MARKS, H. L., HOWARTH, B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs, **Poultry Science**, v.74, p. 1875-1883, 1995.
- BRAMWELL, R.K.; MCDANIEL, C.D.; WILSON, J.L.; HOWARTH, B. Age effect of male and female broiler breeders on sperm penetration of the perivitelline layer overlying the germinal disc, **Poultry Science**, v.75, p. 755-762, 1996.
- BRILLARD, J. P. Factors affecting oviductal sperm storage in domestic fowl following artificial insemination, **Animal Reproduction Science**, v.27, p. 247-256, 1992.
- BRILLARD, J. P. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination, **Poultry Science**, v.72, p. 923-928, 1993.
- BULL, M. L. Anatomia do aparelho reprodutor do macho e da fêmea. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS, **Fisiologia da reprodução das aves**. Campinas, FACTA, São Paulo. 1994. p. 1-10.

CRISTHENSEN, V. L.; FAIRCHILD, B. D.; ORT, D. T.; NESTOR, K. E. Dam and sire effects on sperm penetration of the perivitelline layer and resulting fecundity of different lines of turkeys, **Journal Applied of Poultry Research**, v. 14, p. 483-491, 2005.

DONOGHE, A. M. The effect of twenty-four hour in vitro storage on sperm hydrolysis through the perivitelline layer of ovipositioned turkey eggs. **Poultry Science**, v. 75, p. 1035-1038, 1996.

DYCE, K. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Guanabara Koogan, 1997.

ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. Wallingford, OXON - UK: CAB Internacional, 1998.

FAIRCHILD, B. D.; CRISTHENSEN, V. L. Influence of hen age and number of inseminated sperm on the number of holes hydrolyzed in the inner perivitelline layer of turkey eggs, **Journal Applied of Poultry Research**, v. 14, p. 576-571, 2005.

FOFANOVA, K. A. Morphological data on polyspermy in chickens, **Feeding Procedures**, v. 24, p. T239- T247, 1965.

FUGII, S. Scanning microscopical observation on the penetration mechanism of fowl spermatozoa into the ovum in the process of fertilization, **Journal of Faculty of Fish and Animal Science**, p. 85-92, 1976.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981.

GUMALKA, M.; KAPKOWSKA, E. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 135-148, 2005.

HAFEZ, B. **Reprodução animal**. Barueri, SP: Manole, 2004.

HAZARY, R. C.; STAINES, H. J.; WISHART, G. J. Assessing the effect of mating ratio on broiler breeder performance by quantifying sperm:egg interaction, **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, p. 1-4, 2001.

HOLM, L.; EKWALL, H.; WISHART, G. J.; RIDDERSTRALE, Y. Localization of calcium and zinc in the sperm storage tubules of chicken, quail and turkeys using X-ray microanalysis, **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, p. 331-336, 2000.

HOWARTH, B. Transport of spermatozoa in the reproductive tract of turkey, **Poultry Science**, v.50, p. 8-9, 1971.

HOWARTH, B.; DIGBY, S. T. Evidence for the penetration of the vitelline membrane of the hen's ovum by a trypsin-like acrosomal enzyme. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 33, p. 123-125, 1973.

JOHNSON, A. Regulation of follicle differentiation by gonadotropins and growth factors, **Poultry Science** , v. 72, p. 867-873, 1993.

KASAI, K.; IZURNO, A.; INABA, T.; SAWADA, T. Assessment of fresh and stored duck spermatozoa quality via in vitro sperm-egg interaction assay, **Theriogenology**, v. 53, p. 283-290, 2000.

MCDANIEL, C.D., BRAMWELL, R.K.; HOWARTH JR, B.; The male contribution to broiler breeder heat stress infertility as determined by sperm-egg penetration and sperm storage within the hen's oviduct, **Poultry Science**, v. 75, p. 1546-1554, 1996.

MCINTYRE, D. R.; CHRISTENSEN, V. L. Filling rates of the uterovaginal sperm storage glands in the turkey, **Poultry Science**, v. 62, p. 1652-1656, 1983.

MIMURA, H. Studies on the ciliary movement of the oviduct of domestic fowl, **Okajima's Folia Anatomy of Japan**, v.15, p. 287-295, 1937.

MORENG, R.; EVENS, J. **Ciência e Produção de Aves**. São Paulo, SP. Roca, 1990.

OKAMURA, F.; NISHIYAMA, H. The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*, **Cell Tissue Research**, v. 188, p. 497-508, 1978.

ROBERTSON, L.; BROWN, H. L.; STAINES, H. J.; WISHART, G. J. Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 123-125, 1997.

ROTHSCHILD, L. **Fertilization**. Londres, Inglaterra: Methuen Co., 1956.

RUTZ, F., ANCIUTI, M., XAVIER, E., & ROLL, V. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p. 307-317, 2007.

SASANAMI, T.; MURATA, T.; OHTSUKI, M.; MATSUSHIMA, K.; HYAMA, G.; KANSABU, N.; MORI, M. Induction of sperm acrosome reaction by perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in Japanese quail (*Coturnix japonica*), **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 133, p. 41-49, 2007.

STAINES, H. J.; MIDDLETON, R. C.; LAUGHLIN, K. F.; WISHART, G. J. Quantification of a sperm-egg interaction for estimating the mating efficiency of broiler breeder flocks, **British Poultry Science**, v. 39, p. 273-277, 1998.

STEELE, M. G.; MELDRUM, W.; BRILLARD, J. P.; WISHART, G. J. The interaction of avian spermatozoa with the perivitelline layer in vitro and in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 599-603, 1994.

STEWART, S. G.; BAUSEK, N.; WOLHRAB, F.; SCHNEIDER, W. J.; HORROCKS, A. J.; WISHART, G. J. Species specificity in avian sperm:perivitelline interaction, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137, p. 657-663, 2004.

UBA. União Brasileira de Avicultura - **Relatório Anual 2008/2009**. Brasília: Athalaia Gráfica e editora, 2009.

WACLAWEK, M.; FOISNER, R.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. J. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells, **Biology of Reproduction**, v.59, p. 1230-1239, 1998.

WISHART, J. G. Regulation of the length of the fertile period in the domestic fowl by numbers of oviducal spermatozoa, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 493-498, 1987.

WISHART, J. G. Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys, **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 81-92, 1997.

WOLANSKI, N. J.; RENEMA, R. A.; ROBINSON, F. E.; CARNEY, V. L.; FANCHER, B. I. Relationships among egg characteristics, chick measurements, and early growth in ten broiler breeder strains, **Poultry Science**, v. 86, p. 1784-1792, 2007.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO

Contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa de ovos de galinhas - aplicação prática

Este artigo científico foi redigido de acordo com as normas para publicação na revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, exceto a apresentação das figuras e tabelas.

Contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa de ovos de galinhas - aplicação prática

Rodrigo Weide Jaskulski⁽¹⁾, João Carlos Pinheiro Ferreira⁽¹⁾, Elisane Lenita Milbradt⁽¹⁾,
Elisabeth Gonzales⁽²⁾,

⁽¹⁾ Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Distrito de Rubião Junior, s/n, Cep 18.618-970 Botucatu, SP, Brasil. E-mail: rodrigojask@gmail.com, jcferreira@fmvz.unesp.br, emibradt@gmail.com ⁽²⁾ Universidade Federal de Goiás, Câmpus Samambaia, Rodovia Nova Veneza, Caixa postal 131, Cep 74001-970 Gioânia, GO, Brasil. E-mail: elisa.gonzales@uol.com.br

Resumo - No presente estudo foram correlacionados os resultados das contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa de ovos incubáveis com as taxas de eclosão e fertilidade, objetivando-se analisar a possibilidade do uso dessa técnica como alternativa aos métodos tradicionais de avaliação da fertilidade, executados no incubatório. As avaliações foram realizadas a cada três semanas durante todo o período reprodutivo de um lote comercial de matrizes de corte da linhagem Avian Cobb 48, submetidas à monta natural a partir da 25^a semana de idade. Foram realizadas 10 avaliações, sendo utilizados 30 ovos em cada avaliação. Foi realizada a extração, fixação e coloração da membrana perivitelínica externa para possibilitar a visualização das perfurações ao microscópio óptico. A idade da ave influenciou negativamente o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa, bem como a taxa de fertilidade e de eclosão. Houve correlação positiva entre o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica e a taxa de fertilidade ($r=0,885$; $P<0,05$), assim como com a taxa de eclosão ($r=0,800$; $P<0,05$). É possível inferir que a contagem de perfurações espermáticas pode ser utilizada como ferramenta de avaliação da fertilidade de ovos incubáveis.

Termos para indexação: Reprodutoras pesadas, fertilidade, perfuração espermática

Sperm penetration in germinal disc region of hatching eggs - practical use

Abstract - In this study we correlated the results of counting sperm penetration in the outer perivitelline layer of hatching eggs to the fertility and hatching rates, aiming to examine the possibility of using this technique as an alternative to traditional methods of fertility evaluation, performed in the hatchery. The evaluations were performed every three weeks throughout the reproductive period of a flock of commercial broiler strain Cobb Avian 48, submitted to natural mating from the 25th week of age. Were performed 10 evaluations, 30 eggs were used in each assessment. Was extracted, fixed and stained outer perivitelline layer to enable viewing of holes in an optical microscope. The bird's age negatively influenced the number of sperm holes in the outer perivitelline layer and the fertility rate and hatching. A positive correlation between the number of sperm holes in the perivitelline layer and the fertility rate ($r = 0.885$, $P < 0.05$), as well as the hatching rate ($r = 0.800$, $P < 0.05$). It can infer that the sperm count of holes can be used as a tool for assessing the fertility of eggs hatching.

Index terms: Broiler breeders, fertility, sperm penetration

Introdução

A intensa seleção genética realizada na avicultura industrial, aliada as ótimas condições ambientais oferecidas às aves, tem criado indivíduos com alto potencial reprodutivo traduzindo-se em quantidades de ovos cada vez maiores. Paralelamente, esse melhoramento vem aumentando o peso e a eficiência alimentar das aves, com intuito de se obter descendentes com altos índices de transformação de alimento em carne. Estas questões tornam difícil a tarefa de manter este grande número ovos com altas taxas de fertilidade por longo período de tempo.

Em plantéis industriais, a avaliação da fertilidade é baseada em índices reprodutivos coletados no incubatório, como a taxa de fertilidade, taxa de eclosão e os dados gerados através do embriodiagnóstico. Porém, os resultados destes indicadores são, muitas vezes, subjetivos, como é o caso dos dados gerados por meio do embriodiagnóstico, o qual está sujeito a interpretações do executante. Em adição, em caso de uma falha reprodutiva, os resultados desses testes não apresentam evidências que possibilitem distinguir se a origem do problema é a fêmea ou o macho.

Métodos eficazes no diagnóstico de problemas reprodutivos, com capacidade de detecção de pequenas mudanças na capacidade reprodutiva, tanto de fêmeas quanto de machos, necessitam ser desenvolvidos. Estudos *in vitro* utilizando o princípio da interação entre o espermatozóide e a membrana perivitelínica externa e interna da gema revelaram correlação positiva entre número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica e a fertilidade do ovo (Robertson, 1997; Wishart, 1997; Staines, 1998). Esses estudos evidenciaram a possibilidade da utilização prática de metodologias que utilizem o princípio da contagem de espermatozóides ou de perfurações espermáticas nas membranas perivitelínicas.

Porém, para que estas metodologias sejam utilizadas como ferramenta de avaliação da fertilidade é necessário a comprovação da eficiência das mesmas.

No presente estudo foram correlacionados os resultados das contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa (PEMPE) de ovos incubáveis com as taxas de eclosão e fertilidade, objetivando-se analisar a possibilidade do uso da técnica de contagem de PEMPE em ovos incubáveis como alternativa aos métodos tradicionais de avaliação da fertilidade, executados no incubatório.

Material e Métodos

Animais , instalações, manejo e nutrição

A coleta de dados foi realizada em um lote comercial composto por 2915 reprodutoras e 306 reprodutores do tipo corte (*Gallus gallus*) da linhagem Avian Cobb 48, durante o período de março a dezembro de 2010. As aves foram alojadas em piso, em aviário do tipo aberto, com cortinas laterais brancas.

O sistema de iluminação foi composto por lâmpadas de vapor de sódio, as quais proporcionavam, aproximadamente, 100 lux de intensidade luminosa. O programa de luminosidade foi ajustado a fim de fornecer 17 horas de luz por dia (17L:7D). A ambiência das aves foi controlada de acordo com os padrões descritos no manual da linhagem Avian Cobb 48 (COBB Vantress Brasil, 2008), utilizando-se para isso ventiladores de pressão positiva e nebulizador. As aves foram submetidas a restrição alimentar diária com volumes descritos no manual da linhagem (COBB Vantress Brasil, 2008). As rações, tanto de machos como de fêmeas, foram compostas, basicamente, por milho e farelo de soja, com 15,5% de proteína bruta e 2800 kcal de energia metabolizável.

A fertilização das fêmeas foi realizada pelo sistema de monta natural, sendo o primeiro acasalamento realizado as 25 semanas de idade. O percentual de machos em relação ao número de fêmeas do lote foi, nas respectivas semanas, de 10,3% (27s), 10,1% (30s), 9,9% (33s), 9,6% (36s), 9,4% (39s), 9,5% (42s), 9,4% (45s) e 9,2 % (48s, 51s e 54 semanas). O peso das aves foi mensurado semanalmente, sendo que este apresentou um desvio padrão de ± 50 g do preconizado pelo manual da linhagem durante toda a fase experimental.

O protocolo experimental foi analisado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de Botucatu e recebeu a aprovação para a execução sob o nº 216/2008-CEEA.

Coleta de ovos

As coletas dos ovos foram realizadas nas seguintes idades do lote: 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51 e 54 semanas. Para cada idade amostrada, foram utilizados 30 ovos coletados no primeiro dia da semana experimental, no horário das 10:00 horas. Após a coleta, as análises eram iniciadas em um período não superior a duas horas.

Retirada, fixação e coloração da membrana perivitelínica externa e contagem das perfurações espermáticas

Para execução desses procedimentos tomou-se como base a técnica preconizada por Branwell et al. (1995).

Realizou-se a quebra do ovo e extração inicial do albume seguida do acondicionamento da gema em uma placa de Petry com solução salina 1%. Após a localização do disco germinativo da gema, a região foi submetida a sucessivas lavagens com solução salina 1% e posterior secagem, com papel filtro, para retirada total do albume. Após esse procedimento foi retirada, com auxílio de tesoura oftálmica, uma porção de 2 cm² de membrana perivitelínica tendo ao centro o disco germinativo. Essa porção de membrana foi

lavada em solução salina a 1% e distendida, cuidadosamente, em uma lâmina de microscopia óptica. Em sequência, procedeu-se a fixação da mesma por meio de uma gota de solução de formaldeído a 20%, seguido da coloração com reagente de Schiff (S3952016, Sigma).

A leitura das lâminas foi realizada com auxílio de um microscópio óptico (L-1000-AC, Bioval, São Paulo, Brasil) em aumento de 100 vezes. A contagem das perfurações foi feita em três campos de 0,27 mm² ao redor do disco germinativo, totalizando uma área de 0,81 mm². Foram consideradas perfurações espermáticas, os orifícios de coloração branca, gerados pela hidrólise da membrana perivitelínica pelo acrossoma do espermatozóide, conforme mostra a Figura 1.

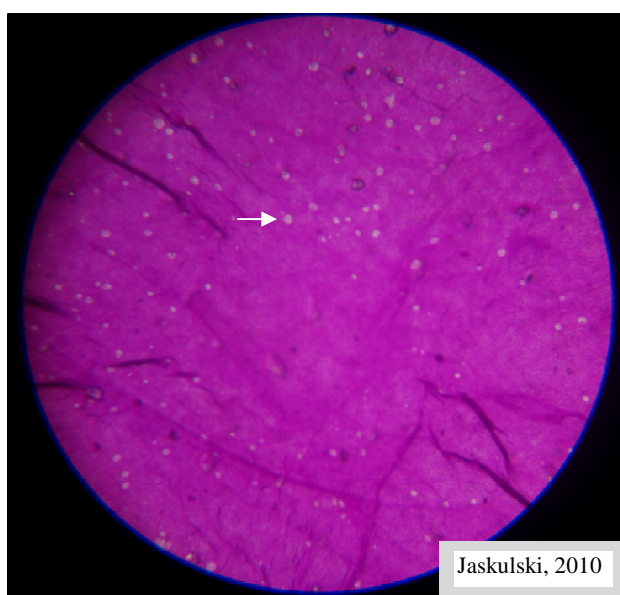


Figura 1. Perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa de ovos incubáveis de reprodutoras tipo corte. A seta branca aponta para uma perfuração espermática.

Dados de incubatório

Após a coleta, os ovos foram fumigados (paraformaldeído) e armazenados por um período máximo de quatro dias, em sala climatizada à 19 a 20°C de temperatura. A incubação

foi realizada em incubatório comercial, o qual utiliza incubadoras de estágio múltiplo marca CASP (Mod. M62) (bulbo seco=37,4°C e bulbo úmido=28,5°C).

Antes da incubação, os ovos foram submetidos a pré-aquecimento por um período quatro horas. Aos 14 dias de incubação, foi realizada a ovoscopia em uma amostragem de 344 ovos, sendo os ovos translúcidos retirados e submetidos a embriodiagnóstico. A taxa de fertilidade foi calculada com base no número de ovos considerados inférteis neste teste, ou seja, sem modificações macroscópicas no disco germinativo. Aos 19 dias de incubação, foi realizada a transferência dos ovos para nascedouros marca CASP (Mod. 21 I) (bulbo seco=36,9°C e bulbo úmido=30°C). Ao nascimento das aves, foi obtida a taxa de eclosão, resultante do número de aves nascidas dividido pelo número de ovos incubados nas semanas experimentais.

Análise estatística

Os resultados das contagens de perfurações espermáticas foram transformados para $x^{0,5}$, a fim de viabilizar a análise de variância (ANOVA), sendo a diferença entre as médias comparadas pelo Teste de Scott Knott (5%). A correlação entre as taxas de fertilidade e eclosão dos ovos, nas respectivas semanas de coleta, com número de perfurações espermáticas foi determinada através do teste de correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAEG (1999).

Resultados e Discussão

As metodologias de contagem das perfurações espermáticas na membrana perivitelínica externa (PEMPE) e interna (PEMPI) ou a mensuração do número de espermatozoides na membrana perivitelínica externa podem ser utilizadas para estimar a fertilidade de um lote comercial de aves (Staines,1998). Nesse estudo, optou-se pela técnica de

contagem de PEMPE por esta ser de fácil execução e não necessitar de estrutura laboratorial específica, a despeito das outras técnicas mencionadas.

Na Tabela 1 podem ser visualizadas as taxas de fertilidade e eclosão obtidas no estudo, as taxas sugeridas como padrão pelo manual da linhagem de reprodutoras tipo corte Avian Cobb 48 e o número médio de PEMPE/0,27 mm²).

Tabela 1. Índices de incubação médios do lote estudado, índices de incubação sugeridos pelo manual da linhagem Avian Cobb 48 e número médio de PEMPE.

| Idade (semanas) | Características | | | | Nº médio de PEMPE (0,27mm ²) |
|-----------------|-------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|--|
| | Eclosão total (%) | Padrão da eclosão (%) | Fertilidade (%) | Padrão da fertilidade (%) | |
| 27 | 66,9 | 75,00 | 54,50b | 60,00 | 22b |
| 30 | 77,70 | 78,00 | 92,30a | 93,00 | 86a |
| 33 | 79,50 | 79,00 | 92,20a | 96,00 | 86a |
| 36 | 84,40 | 80,00 | 95,90a | 96,00 | 105a |
| 39 | 80,40 | 81,00 | 94,80a | 96,00 | 89a |
| 42 | 82,00 | 81,00 | 95,60a | 96,00 | 107a |
| 45 | 85,40 | 80,00 | 95,10a | 96,00 | 83a |
| 48 | 83,60 | 80,00 | 95,30a | 96,00 | 70ab |
| 51 | 82,20 | 80,00 | 90,20a | 96,00 | 75ab |
| 54 | 76,60 | 79,00 | 85,60a | 96,00 | 58b |
| Média | 79,87 | 79,30 | 89,15 | 92,10 | 78,10 |

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem, significativamente, pelo teste Scott Knott (5%).

Na primeira semana do estudo, as taxas de eclosão e fertilidade foram inferiores aos índices sugeridos pelo manual da linhagem Avian Cobb 48. O número médio de PEMPE também foi baixo, 22 PEMPE/0,27mm², quando comparado com os resultados obtidos na segunda semana do estudo, na qual foram encontradas 86 PEMPE/0,27mm².

Nas aves, parte dos espermatozóides que transpõe a vagina é armazenada em pregas na mucosa, localizadas na junção útero vaginal, denominadas de túbulos de estocagem seminal (TES) (Bobr et al., 1964). Bakst (1988) demonstrou que, em peruas, o volume e concentração do sêmen inoculado, sob forma de inseminação artificial, possuem influência direta sobre o número de espermatozóides armazenados nos TES. No presente estudo, a fertilização ocorreu por monta natural, portanto, os valores de PEMPE, encontrados na primeira semana do estudo, podem indicar que os TES ainda não estavam repletos de espermatozóides. Este fato pode estar relacionado a uma série de fatores, ligados tanto aos machos quanto as fêmeas.

Sabe-se que reprodutores machos atingem a fase adulta entre 24 e 30 semanas de vida, período no qual a produção de espermatozóides aumenta de forma exponencial até atingir o máximo, entre 30 e 35 semanas de vida da ave (Adjanohoum, 1994). Além disso, quando fêmeas e machos são colocados no mesmo aviário, é necessário um período de adaptação entre os mesmos e entre os próprios reprodutores machos, para que seja definida a hierarquia entre eles. Durante esse período de adaptação, os acasalamentos não ocorrem com tanta frequência, quando comparado com reprodutores já adaptados (Campos, 1994). Porém, não é possível afirmar que os resultados encontrados são devidos aos fatores mencionados, pois esses não foram contemplados nesse estudo.

Ainda, segundo Wishart (1997), a possibilidade de um ovo de galinha ser infértil é maior quando o número de PEMPE estiver abaixo de $0,2/\text{mm}^2$. Essa afirmação reforça os resultados de fertilidade e eclosão encontrados na 27ª semana, visto que o número médio de PEMPE foi baixo e o número de ovos em que não foram encontradas PEMPE foi alto, 13% do total amostrado.

Baixos valores médios de PEMPE ($<50/0,27\text{mm}^2$) de um indivíduo, de um lote ou de uma linha genética de galinhas podem ser considerados um forte indicativo de redução da

fertilidade. Embora apenas um espermatozóide seja necessário para fertilizar um ovo, baixos valores de perfurações espermáticas nos ovos de um lote de matrizes estão altamente correlacionados com baixas taxas de fertilidade e altos índices mortalidade embrionária precoce (Wishart, 1997; Fairchild & Cristhensen, 2005, Małgorzata et al., 2005).

O valor médio de PEMPE encontrado nesse estudo foi de $78,1/0,27\text{mm}^2$, similar aos encontrados por Branwell et al. (1996) que, ao trabalhar com duas linhagens de reprodutoras tipo corte, encontrou valores médios de PEMPE de 78,6 e $105,6/0,27\text{mm}^2$.

O número mínimo, médio e máximo de PEMPE em ovos incubáveis de reprodutoras tipo corte, nas idades estudadas, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados da contagem de PEMPE em ovos de reprodutoras tipo corte em função da idade.

| Característica | Idade (semanas) | | | | | | | | | |
|--|-----------------|------|-----|------|-----|------|------|------|------|-----|
| | 27 | 30 | 33 | 36 | 39 | 42 | 45 | 48 | 51 | 54 |
| Nº médio de PEMPE (0,27mm ²) | 22b | 86a | 86a | 105a | 89a | 107a | 83a | 70ab | 75ab | 58b |
| Nº mínimo de PEMPE | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nº máximo de PEMPE | 106 | 387 | 339 | 317 | 323 | 358 | 351 | 400 | 235 | 182 |
| Nº de ovos sem PEMPE | 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 | 3 | 2 | 7 |
| Erro Padrão Médio | 5,6 | 14,8 | 16 | 16,4 | 23 | 19,8 | 16,8 | 17,2 | 10,8 | 9,0 |

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem, significativamente, pelo teste Scott Knott (5%).

Na Figura 2 são apresentadas as médias de PEMPE dos ovos de reprodutoras tipo corte, durante o período experimental e, na Figura 3 estão demonstradas as taxas de fertilidade e eclosão dos ovos incubados nas semanas em que foram realizadas as contagens de PEMPE.

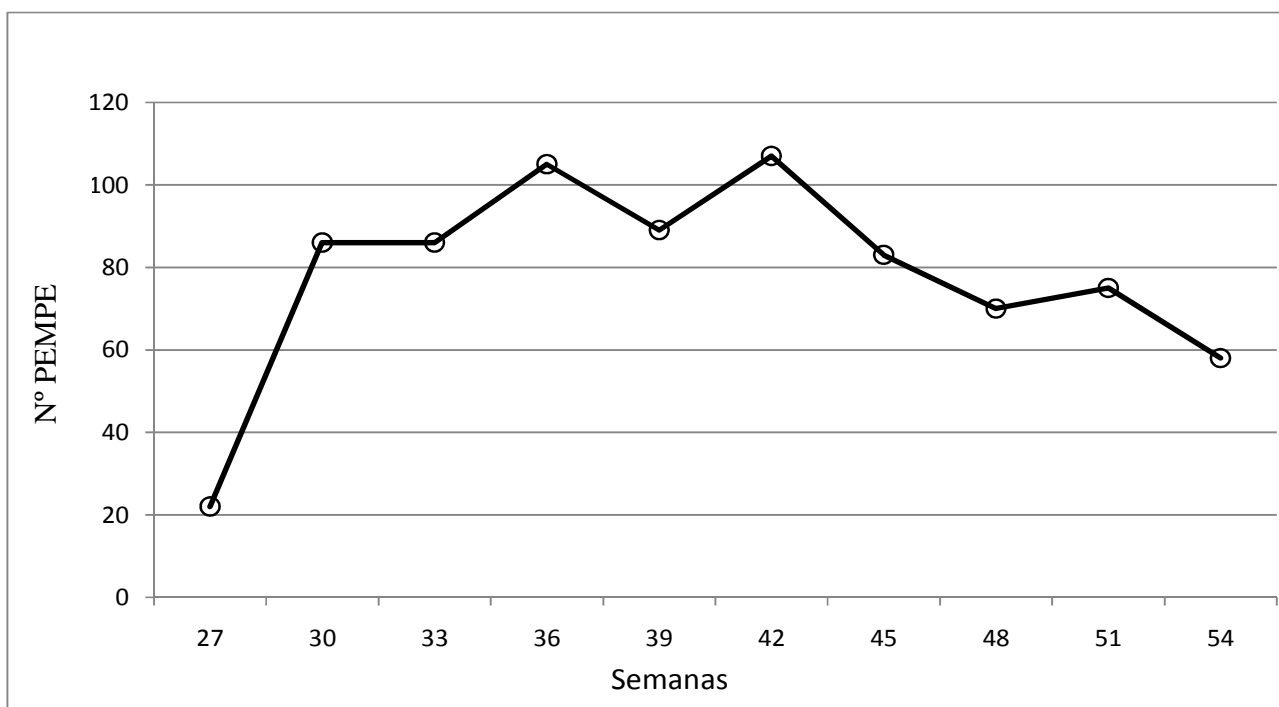


Figura 2. Número médio de PEMPE/0,27mm² de ovos de reprodutoras tipo corte durante o período experimental.

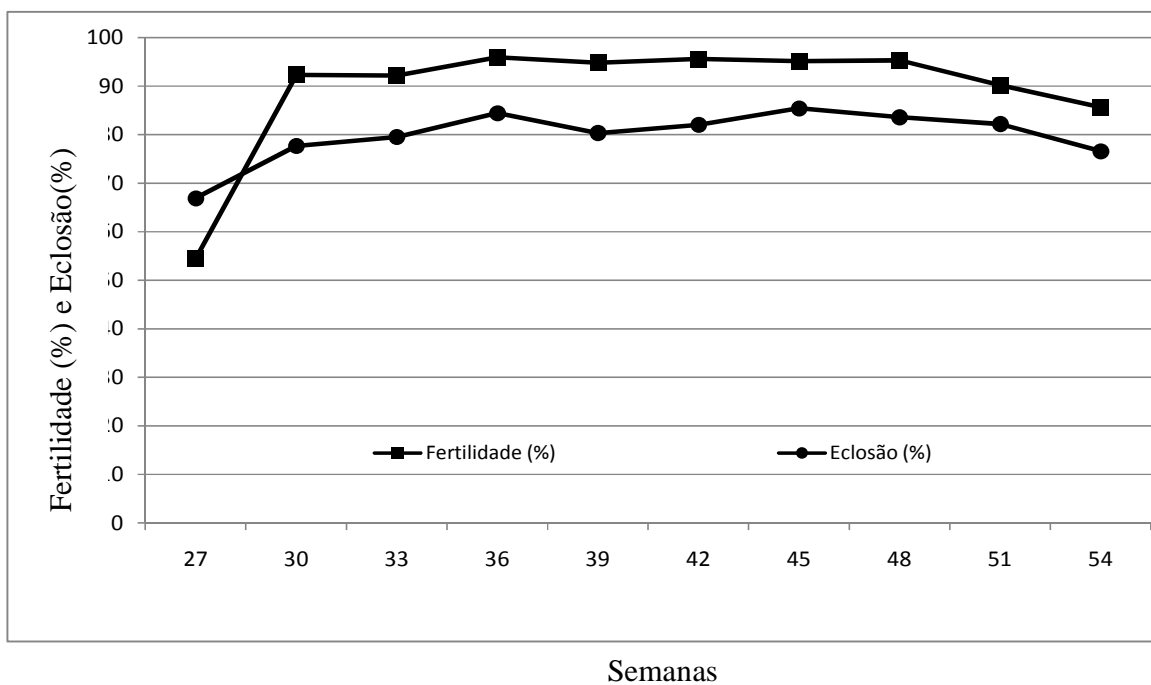


Figura 3. Taxa de fertilidade e eclosão de ovos de reprodutoras tipo corte durante o período experimental.

Neste estudo, observa-se que a idade das aves influenciou negativamente o número de PEMPE, concordando com os achados de Branwell (1992), Hazary et al. (2001) e Fairchild e Cristhensen (2005), os quais encontraram resultados semelhantes em suas pesquisas. Assim como a produção de ovos, a fertilidade e a eclosão, que possuem um comportamento de ascensão, estabilização e decréscimo com o decorrer da idade das aves, o número de PEMPE também demonstrou acompanhar esta tendência, como pode ser observado nas Figuras 2 e 3. Em adição, estudos anteriores comprovaram que o volume e a concentração espermática de sêmen de galos diminuem com a idade, o que pode conduzir ao declínio do número de PEMPE e, conseqüentemente, da taxa de fertilidade (Sexton, 1986; Sexton et al., 1989). Embora os efeitos da fêmea sobre a infertilidade de um lote não possam ser desprezados, a redução na taxa de fertilidade, em um lote de reprodutoras tipo corte, pode estar relacionado a alterações hormonais e comportamentais dos machos, comprometimento físico da cópula ou uma combinação de todos esses fatores (McGary et al., 2002).

A taxa de fertilidade teve correlação positiva ($r= 0,885$; $P<0,05$) com o número de perfurações na membrana perivitelínica externa (Figura 4a), assim como a taxa de eclosão ($r= 0,800$; $P<0,05$) (Figura 4b). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Staines (1998), o qual demonstra em diversos estudos, que a contagem de PEMP possui correlação positiva significativa com a taxa de fertilidade e eclosão. Baseado nisso, o autor considera a técnica de contagem de PEMP uma alternativa viável para determinação da fertilidade de ovos de galinha.

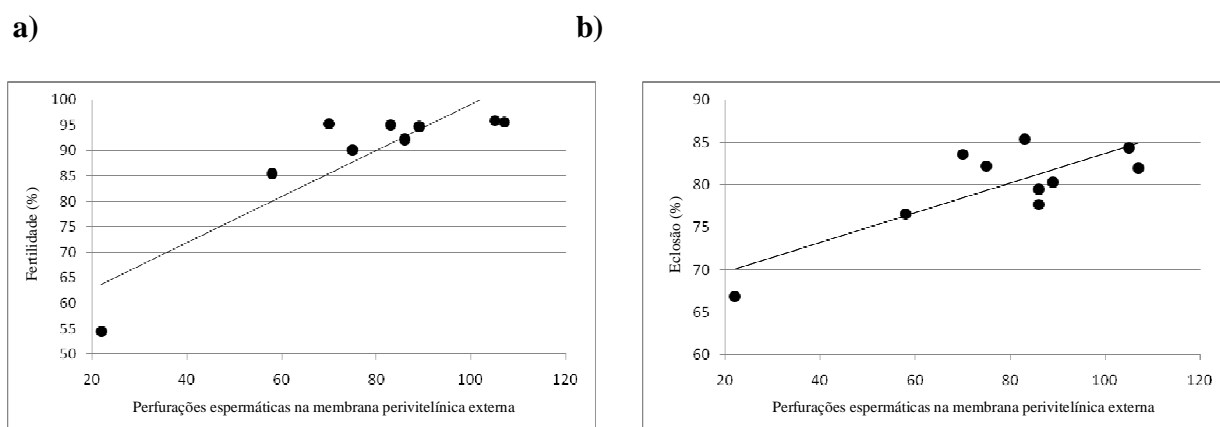


Figura 4. Correlação entre a média de perfurações espermáticas e a fertilidade (a) e a média de perfurações espermáticas e a eclosão (b).

O cálculo da taxa de fertilidade, realizado no incubatório, é feito através da análise, por meio do embriodiagnóstico, de uma amostragem de ovos tomada, preferencialmente, após o 12º dia de incubação. Este teste além de conduzir ao atraso de vários dias no diagnóstico de possíveis problemas reprodutivos, ainda possui o inconveniente de ser altamente dependente da avaliação do executante, principalmente na capacidade deste de diferenciar mortalidade embrionária inicial de infertilidade (Etches, 1998). Nesse mesmo sentido, a detecção de falhas reprodutivas com base na taxa de eclosão, calculada através da diferença entre o número de ovos eclodidos e o número de ovos incubados, tem como principal problema o tempo decorrido entre a postura dos ovos e o nascimento dos pintinhos.

Já, a predição da fertilidade em ovos frescos não incubados, pode antecipar a detecção de problemas reprodutivos, gerando informações em tempo real, antes do diagnóstico tradicional, realizado no incubatório. Portanto, a contagem de PEMPE pode ser superior às avaliações realizadas no incubatório, pois além das vantagens mencionadas, esta ainda fornece valores em escala quantitativa da fertilidade real do lote. Isto é, problemas reprodutivos que conduzem a queda nos valores de PEMPE podem ser identificados antes que ocorra declínio

nas taxas de fertilidade e eclosão, as quais, como demonstrado nesse estudo, possuem alta correlação com o número de PEMPE.

Conclusão

- 1- A técnica de contagem de PEMPE pode ser utilizada como ferramenta de avaliação da fertilidade em ovos incubáveis de reprodutoras tipo corte.

Referências

ADJANOHOUN, E. Fertilidade relacionada aos machos. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS. **Fisiologia da reprodução das aves**. CampinasFACTA;Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas. 1994. p. 107-115.

BAKST, M. R. Turkey hen fertility and egg production after artificial insemination and multiple oviduct eversion during the pre-laying period. **Journal of Reproduction and Fertility**,v. 83, p. 873-877, 1988.

BRANWELL, R. K., HOWARTH, B. Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum, **Biology Reproduction**, v. 47, p. 1113-1117, 1992.

BRANWELL, R. K., MARKS, H. L., HOWARTH, B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum as assessed on oviposited eggs, **Poultry Science**, v.74, p. 1875-1883, 1995.

BRAMWELL, R.K.; MCDANIEL, C.D.; WILSON, J.L.; HOWARTH, B. Age effect of male and female broiler breeders on sperm penetration of the perivitelline layer overlying the germinal disc, **Poultry Science**, v.75, p. 755-762, 1996.

BOBR, L. W.; LORENZ, F. W.; OGASAWARA, F. X. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds, **Journal of reproduction and fertility**, v.8, p. 39-47, 1964.

CAMPOS, E. J. Comportamento das aves e seus efeitos sobre a taxa de fertilidade. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLAS. **Fisiologia da reprodução das aves**. CampinasFACTA;Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologias Avícolas. 1994. p. 95-107.

COBB Vantress Internacional. **Guia de Manejo de matrizes**. Revisão de 2008. 2008.

ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. Wallingford, OXON - UK: CAB Internacional, 1998.

FAIRCHILD, B. D.; CRITHENSEN, V. L. Influence of hen age and number of inseminated sperm on the number of holes hydrolyzed in the inner perivitelline layer of turkey eggs, **Journal Applied of Poultry Research**, v. 14, p. 576-571, 2005.

HAZARY, R. C.; STAINES, H. J.; WISHART, G. J. Assessing the effect of mating ratio on broiler breeder performance by quantifying sperm:egg interaction, **Journal of Applied Poultry Research**, v. 10, p. 1-4, 2001.

MAŁGORZATA G.; KAPKOWSKA E. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p.135-148, 2005.

MCGARY, S.; ESTEVEZ, I.; BAKST, M.R.; POLLOCK, D.L. Phenotypic Traits as Reliable Indicators of Fertility in Male Broiler Breeders, **Poultry Science**, v. 81, p. 102-111, 2002.

ROBERTSON, L.; BROWN, H. L.; STAINES, H. J.; WISHART, G. J. Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 123-125, 1997.

SEXTON, T. J. Relationship of the number of spermatozoa inseminated to fertility of turkey semen stored 6 h at 5 degrees, **British Poultry Science**, v. 27, p. 237–245, 1986.

SEXTON, K. J.; RENDEN, J.A.; MARPLE, D.N.; KEMPPAINEN, R.J. Effects of ad libitum and restricted feeding on semen quantity and quality, body composition, and blood chemistry of caged broiler breeder males, **Poultry Science**, v. 68, p. 569–576, 1989.

STAINES, H. J.; MIDDLETON, R. C.; LAUGHLIN, K. F.; WISHART, G. J. Quantification of a sperm-egg interaction for estimating the mating efficiency of broiler breeder flocks, **British Poultry Science**, v. 39, p. 273-277, 1998.

WISHART, J. G. Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys, **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 81-92, 1997.