

Allan Andrade Coelho

---

EFEITO DA ADIÇÃO DE CAFEÍNA SOBRE A MOTILIDADE  
E FERTILIDADE DE SÊMEN DE GALO LEGORNE

Tese Apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como Parte das  
Exigências do Curso de Zootecnia,  
para Obtenção do Título de  
"Magister Scientiae".

---

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
JULHO - 1995

## AGRADECIMENTOS

**Ao** professor **Ciro Alexandre Alves Torres**, pela orientação e pela amizade.

Ao professor **Paulo Rubens Soares**, pelo apoio e pela colaboração.

**Ao** laboratorista **Fernando Mendes**, pela ajuda e pela cooperação.

Aos acadêmicos **André Luiz R. Magalhães**, **Cláudio Vaz di Mambro Ribeiro** e **Ana Paula Ribeiro de Jesus**, pela ajuda no experimento e pela amizade.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pelos conselhos e pela convivência agradável.

À **Capes** e ao **CNPq**, pelo apoio financeiro.

**A** todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para o bom andamento desse trabalho.

## BIOGRAFIA

Allan Andrade Coelho, filho de Dirceu Teixeira Coelho e Maria da Glória Andrade Coelho, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 17 de março de 1968.

Em janeiro de 1991, obteve o diploma de Médico Veterinário na Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 1991, foi admitido no curso de pós-graduação do Departamento de Zootecnia desta mesma instituição, na área de fisiologia animal (reprodução). Defendeu a presente tese em 30 de junho de 1994.

## CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS .....	vii
EXTRATO .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Características Físicas e Morfológicas do Sêmen de Galo .....	
2.1.1. Volume .....	3
2.1.2. Concentração Espermiática .....	5
2.1.3. Percentagem de Espermatozóides Vivos .....	5
2.1.4. Morfologia Espermiática .....	7
2.1.5. Fertilidade .....	8

2.2. Conservação do Sêmen de Galo .....	8
2.2.1. Diluição do Sêmen .....	9
2.2.2. Temperatura de Conservação .....	11
2.3. Metabolismo Espermático e Nucleotídeos Cíclicos .....	13
2.4. Efeito da Adição de Cafeína ao Sêmen .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1. Características Gerais .....	23
3.2. Animais .....	24
3.3. Colheita do Sêmen .....	25
3.4. Tratamento do Sêmen e Delineamento Experimental .....	26
3.5. Avaliação do Sêmen .....	27
3.5.1. Volume .....	27
3.5.2. Motilidade .....	27
3.5.3. Vigor .....	28
3.5.4. Concentração Espermática .....	28
3.5.5. Percentagem de Espermatozoides Vivos e Anormais .....	29
3.6. Avaliação da Fertilidade .....	29
3.7. Análise Estatística .....	31

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
4.1. Volume e Concentração Espermática .....	32
4.2. Espermatozóides Vivos e Morfologia Espermática .....	34
4.3. Motilidade .....	35
4.4. Fertilidade .....	37
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	39
BIBLIOGRAFIA .....	41

valores de contagem  
por diversos auto

## LISTA DE QUADROS

	Página
001. Volume de sêmen ejaculado e concentração espermática de galos de quatro raças .....	4
002. Valores de concentração espermática no sêmen de galo observado por diversos autores .....	6
003. Percentual de espermatozóides vivos no sêmen de galo observados por diversos autores.....	6
004. Percentual de espermatozóides anormais no sêmen de galo observados por diversos autores .....	7
005. Valores nutricionais da ração oferecida à aves no período experimental .....	24

006. Valores médios de volume e concentração espermática do sêmen de galos da raça Legorne branca .....	33
007. Valores percentuais de espermatozóides vivos e espermatozóides anormais, no sêmen fresco de galos da raça Legorne branca .....	34
008. Motilidade espermática média (em Porcentagem) no sêmen de galos submetido a diversos tratamentos, por períodos de até 48 horas após a sua colheita .....	36
009. Taxas de fertilidade média (em Porcentagem) do sêmen de galos submetido a vários tratamentos, por períodos de até 48 horas após a sua colheita .....	38



## EXTRATO

COELHO, Allan Andrade, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1995.  
**Efeito da Adição de Cafeína Sobre a Motilidade e Fertilidade de Sêmen de Galo Legorne.** Professor Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Conselheiros: Professores Paulo Rubens Soares e Luiz Fernando Teixeira Albino.

No presente experimento objetivou-se estudar o efeito da adição de cafeína no sêmen de galos utilizados para a inseminação artificial de poedeiras leves da raça Legorne branca, do plantel da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Fez-se um *pool* com o sêmen colhido de 50 galos, e este foi dividido em oito frações, correspondendo aos seguintes tratamentos: 1) sêmen puro; 2) sêmen diluído 1:4 em Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE); e 3) sêmen diluído em BPSE adicionado de 2mM de cafeína imediatamente após a colheita. **As** demais frações foram semelhantes à fração 3, sendo a cafeína adicionada 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a colheita. Analisaram-se microscopicamente todas **as** amostras, para a

determinação da motilidade espermática das mesmas. Esse procedimento foi feito imediatamente após a colheita do sêmen e foi repetido a 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a mesma. A fertilidade foi determinada por meio da inseminação artificial de 264 galinhas, divididas em 33 grupos de oito aves, e verificada pela fertilidade dos ovos após incubação. A diluição do sêmen em BPSE retardou a queda da motilidade espermática ao longo do período de estocagem e aumentou a fertilidade, quando comparado ao sêmen puro. A adição de cafeína estimulou significativamente a motilidade espermática após 24 horas de estocagem à temperatura de 20 a 22°C, quando comparada ao sêmen diluído em BPSE. Esse estímulo foi mais evidente quando a motilidade encontrava-se diminuída no decorrer da estocagem. Apesar das diferenças no estímulo da motilidade, houve pouca diferença na fertilidade do sêmen sob os diversos tratamentos, e a adição de cafeína logo após a colheita apresentou os piores resultados. A adição de cafeína ao sêmen de galo constitui-se em um recurso que pode ser utilizado para maximizar a fertilidade de sêmen estocado por períodos superiores a 24 horas. Essa adição deverá ser feita próximo à hora de inseminação.

## I. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial em avicultura (*Gallus domesticus*), em razão de suas vantagens técnicas, como alta taxa de fertilidade, maior eficiência reprodutiva, maior poder de seleção etc., torna-se cada dia mais presente nos plantéis reprodutores geradores de aves avós.

Entretanto, um dos pontos fundamentais na utilização dessa técnica consiste no uso de sêmen de boa qualidade. O sêmen de galo possui uma alta concentração espermática, o que contribui para um rápido esgotamento dos nutrientes presentes no plasma seminal, diminuindo a viabilidade do mesmo. Em virtude desse fato, recomenda-se que a inseminação seja feita o mais rapidamente possível após a colheita do sêmen, visando maximizar a taxa de fertilidade (RESENDE et alii, 1973; RESENDE, 1977 e RESENDE et alii, 1978). Na prática, por motivos diversos, esse intervalo da colheita do sêmen à inseminação se prolonga, resultando na queda da taxa de fertilidade (WARREN e GISH, 1943;

se prolonga, resultando na queda da taxa de fertilidade (WARREN e GISII, 1943; GARREN e SHAFFNER, 1952; BAJPAI e BROWN, 1964; CLARKE et alii, 1982).

Uma das principais causas da queda na fertilidade de um sêmen estocado é a diminuição do metabolismo energético dos seus espermatozoides (FORD e WAITES, 1986). O metabolismo energético dos espermatozoides está diretamente relacionado à sua concentração interna de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) (CIULAVATNATOL e TREETIPSATTI, 1983; MORISAWA et alii, 1983; TASHI e MEANS, 1983; SIMPSON e WHITE, 1987).

Sabe-se que os nucleotídeos cíclicos são metabolizados pela enzima fosfodiesterase (HARPER et alii, 1982). A adição de inibidores da fosfodiesterase, como a cafeína (1,3,7, trimetil-2,6, dioxipurina), ao sêmen promove um aumento na concentração de AMPc espermático, elevando o metabolismo energético dos espermatozoides (GARBERS et alii, 1971b; LEVIN et alii, 1981). O metabolismo energético dos espermatozoides pode ser avaliado pela motilidade, taxa de consumo de oxigênio e taxa de glicólise ou frutólise (GARBERS et alii, 1971b; MORISAWA et alii, 1983).

No presente experimento objetivou-se verificar os efeitos da adição de cafeína sobre a motilidade e fertilidade do sêmen de galo, conservado à temperatura ambiente (20 a 22°C), por diversos periodos de tempo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Características Físicas e Morfológicas do Sêmen de Galo

O sêmen de galo tem, geralmente, um aspecto branco leitoso, podendo vir a se tornar mais claro após sucessivas ejaculações (RAIMO, 1943), e mantém sua capacidade fertilizante em pH variando de 6,0 a 8,0 (BOGDONOFF e SHAFFNER, 1954).

#### 2.1.1. Volume

O volume pode variar grandemente de acordo com o regime alimentar, idade, raça, método e frequência de colheita e a produção de fluido pelas dobras

linfáticas da cloaca (MARTINS, 1981). Retirando o sêmen da cloaca das galinhas logo após o cruzamento com galos, PARKER (1945) encontrou um volume médio de 0,11 ml de sêmen por ejaculado. Essa média aumentou para 1,0 ml por ejaculado quando a colheita passou a ser feita diretamente do galo. Segundo ALLEN e CHAMPION (1955), ocorrem diferenças entre raças quanto ao volume de sêmen ejaculado (Quadro 1).

KAMAR (1960) verificou que o volume de sêmen ejaculado varia dentro de uma mesma raça. Trabalhando com três grupos, que denominou alta, média e baixa fertilidade, encontrou os seguintes valores médios: 0,42 ml, 0,33 ml e 0,31 ml, respectivamente.

QUADRO 1 - Volume de sêmen ejaculado e concentração espermática de galos de quatro raças

Raça	Volume	Concentração <sup>1</sup>
White Wyandotte	0,39±1,78	1,38±3,12
White Leghorn	0,42±1,32	1,43±2,76
White Plymouth Rock	0,42±1,30	1,34±2,90
New Hampshire	0,42±1,82	1,36±3,12

\* Milhões de espermatozoides/mm<sup>3</sup>.

Fonte: ALLEN e CHAMPION, 1955

O volume médio do ejaculado de galos da raça Legorne branca variou dentre os trabalhos consultados: de 0,4 a 1,0 ml (PISTENMA et alii, 1971), 0,8 ml (CARVALHO, 1976) e 0,5 ml (SEVINÇ et alii, 1985).

### 2.1.2. Concentração Espermática

A concentração espermática, assim como o volume, varia de acordo com o regime alimentar, a idade, a raça, a frequência de colheita e a produção de fluido transparente pelas dobras linfáticas da cloaca (MARTINS, 1981). Diferenças nas concentrações espermáticas, dentre as diversas raças, são mostradas no Quadro 1.

No Quadro 2 são mostrados diferentes valores de concentração espermática, observados por diversos autores. A variação nos valores desse parâmetro é muito grande. PARKER et alii (1940) observaram, em 192 ejaculados de 14 galos, que a concentração espermática alcançou o valor de até 10 milhões de espermatozoides/mm<sup>3</sup>.

### 2.1.3. Percentagem de Espermatozoides Vivos

O percentual de espermatozoides vivos, observado nos diversos trabalhos consultados, é apresentado no Quadro 3.

QUADRO 2 - Valores de concentração espermática no sêmen de galo observado por diversos autores

Concentração Espermática/mm <sup>3</sup>	Autores
1.064.000	SAMPSON e WARREN (1939)
2.340.000	PARKER et alii (1940)
3.200.000	WHEELER e ANDREWS (1943)
1.890.000 (Aves maduras - 53 semanas)	WILWERTII (1952)
2.100.000 (Aves jovens - 28 semanas)	WILWERTII (1952)
2.658.000	CARVALHIO (1976)

QUADRO 3 - Percentual de espermatozoides vivos no sêmen de galo observados por diversos autores

Espermatozoides Vivos (%)	Autores
76,65	KAMAR e BADRELDINI (1959)
79,00 (Alta fertilidade)	KAMAR (1960)
74,00 (Média fertilidade)	KAMAR (1960)
73,00 (Baixa fertilidade)	KAMAR (1960)
87,98 (Aves jovens)	MARINI e GOODMAN (1969)
83,52 (Aves adultas)	MARINI e GOODMAN (1969)
89,00	WILSON et alii (1969)
88,70 (Primavera)	SAEID e AL-SOUDI (1975)
91,80 (Verão)	SAEID e AL-SOU111 (1975)
96,00	CARVALHIO (1976)



BILGILI et alii (1987) observaram que a percentagem de espermatozóides vivos, no sêmen mantido a 22°C, manteve-se constante nas quatro primeiras horas, mas reduziu significativamente após 24 horas de estocagem.

#### 2.1.4. Morfologia Espermática

As percentagens de espermatozóides anormais, nos vários trabalhos consultados, encontram-se no Quadro 4. As variações podem estar associadas aos animais, à técnica de identificação e à estação do ano, como foi observado

QUADRO 4 - Percentual de espermatozóides anormais no sêmen de galo observados por diversos autores

Espermatozóides Anormais (“h)	Autores
05,00	SAMPSON e WARREN (1939)
03,80	MUKHERJEE e BHATTACHARYA (1949)
07,75	ALLEN e CHAMPION (1955)
21,44	KAMAR e BADRELDINI (1959)
18,20	SAEKI (1960)
20,00-22,00	KAMAR (1960)
10,00-14,00	SAEID e AL-SOUDI (1975)
06,34	CARVALHO (1976)
05,44	SEVINÇ et alii (1985)

por KAMAR e BADRELDINI (1959), que encontraram uma variação anual, significativa, no percentual de espermatozóides anormais.

### 2.1.5. Fertilidade

WISHART e PALMER (1986) verificaram uma relação direta entre a fertilidade e a motilidade, o conteúdo de ATP e a integridade morfológica dos espermatozóides.

## 2.2. Conservação do Sêmen de Galo

O estudo da conservação do sêmen de galo intensificou-se com o advento da inseminação artificial em galinhas, isto é, na década de 30 (ISHIKAWA, 1930; BURROWS e QUINN, 1935, 1937 e 1938; MUNRO, 1938; BONNIER e TRULSSON, 1939; BONADONNA, 1939). A manutenção da viabilidade do sêmen de galo é de extrema importância para a inseminação artificial, pois os espermatozóides ejaculados em um só acasalamento não vão fecundar apenas um ovócito, como na vaca, ou fecundar vários ovócitos em um breve período de tempo, como na porca, mas necessitam manter seu poder fertilizante por vários

dias para poder fecundar, ao longo dos dias subsequentes, os ovócitos produzidos pela galinha, que produz, em **média**, um ovócito ao dia.

### 2.2.1. Diluição do Sêmen

O sêmen de galo apresenta uma das concentrações espermáticas mais **altas** dentre os **animais** domésticos. Essa alta concentração implica uma menor **disponibilidade** de plasma seminal por espermatozóide. Como consequência, há uma menor reserva de nutrientes e um rápido acúmulo dos metabólitos excretados pelos espermatozóides, que são tóxicos para os mesmos (CLARKE et alii, 1982). Com o objetivo de contornar esse problema, vários diluentes já foram testados. O efeito da diluição do sêmen sobre a sua fertilidade varia grandemente, dependendo dos componentes da solução diluidora e do grau de diluição (LAKE, YAMANE e VANWAMBEKE (1967) demonstrou que o sêmen de galo poderia ser diluído em água destilada (1957).

YAMANE et alii (1962) observaram que o meio **diluyente**, para o sêmen de galo, necessita ser **hipertônico**, pois a hipotonicidade causaria o “dobramento” da peça intermediária do espermatozóide. Já MAEDA e TERADA (1983) verificaram que esse “dobramento” ocorre em razão de uma alta **concentração** de ions cloreto no diluente.

BONNIER e TRULSSON (1939) observaram uma maior fertilidade do sêmen diluído em solução de Ringer quando comparado ao sêmen puro, o que foi também observado por WEAKLEY e SHAFFNER (1952) quando diluíram o sêmen de galo com plasma seminal homólogo obtido por centrifugação. Já SCHINDLER et alii (1955) não verificaram diferença na fertilidade do sêmen puro quando comparado ao diluído com as soluções de Ringer, Locke e leite integral, quando conservadas por um período de até quatro horas.

VANTIENHOVEN (1960) observou que a diluição do sêmen de galo com solução salina fisiológica ou solução fosfatada tamponada deprimiu a taxa respiratória dos espermatozóides. CLARKE et alii (1982), comparando sêmen puro e diluído em Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE), verificaram que a taxa respiratória dos espermatozóides foi maior quando o sêmen de galo foi diluído.

VANWAMBEKE (1967) demonstrou que o sêmen de galo poderia ser mantido "in vitro" por até 24 horas, sem uma perda substancial de sua fertilidade, desde que associado a baixas temperaturas. Entretanto, MARTINS (1981) e RESENDE et alii (1983) não recomendam a diluição do sêmen de galo na rotina de inseminação artificial, observando melhores resultados para o emprego do sêmen puro. No entanto, BILGILI et alii (1987) verificaram que o sêmen puro tem sua fertilidade sensivelmente reduzida nas quatro primeiras horas de estocagem a 22°C, quando comparado ao sêmen diluído em BPSE, que tem

também uma maior viabilidade, quando armazenado a 22°C por 48 horas. Estes autores verificaram ainda que, quanto maior o número de espermatozóides viáveis depositados no oviduto da galinha, até um máximo de 100 milhões, maior será a taxa de fertilidade. A partir desse valor, a taxa permanece constante.

### 2.2.2. Temperatura de Conservação

ISHIKAWA (1930) verificou que a armazenagem do sêmen de galo deve ser feita abaixo da temperatura fisiológica da galinha (40°C) e ASHIZAWA e NISHIYAMA (1978) demonstraram que a taxa de consumo de oxigênio do sêmen, mantido a 41°C, foi cinco vezes superior àquela do sêmen conservado a 5°C.

A conservação do sêmen de galo a 0°C foi demonstrada como inviável por GARREN e SHAFFNER (1952), pois a viabilidade do sêmen a essa temperatura não foi além de 10 minutos.

Em contrapartida, quando mantido a uma temperatura de 2 a 5°C, o sêmen de galo manteve-se viável por um período de até 24 horas (POLGE, 1951; SCHINDLER et alii, 1955; LAKE, 1967; VANWAMBEKE, 1968 e 1970; PISTENMA et alii, 1971; VANWAMBEKE, 1972; SEXTON, 1978; LAKE e RAVIE, 1979). WISHART (1981) observou que o sêmen de galo mantido à

temperatura de 5°C sob aeração por 48 horas apresentou-se com uma fertilidade correspondente a 90% daquela obtida com o uso de sêmen puro e fresco.

Outros experimentos demonstraram que a melhor faixa térmica para a conservação do sêmen de galo é de 5 a 10°C (GARREN e SHAFFNER, 1952; SEXTON, 1977; CLARKE et alii, 1982). Entretanto, WARREN e GISH (1943) verificaram que o sêmen armazenado a uma temperatura de 10,0 a 15,5°C por 24 horas produziu somente 6% de ovos férteis após inseminação. Já HUNSAKER et alii (1956) observaram uma menor queda da viabilidade apenas quando o sêmen foi armazenado a 15°C.

GARREN e SHAFFNER (1952) observaram que o sêmen de galo perdia a sua fertilidade após 90 minutos, quando mantido a 20, 30 e 40°C. Ao final de quatro horas de estocagem, a fertilidade do sêmen de galo é praticamente nula, quando este é mantido a 41°C (SCHINDLER et alii, 1955) e 30°C (HUNSAKER et alii, 1956). BURROWS e QUINN (1939) verificaram que o sêmen estocado a 40°C tornou-se pútrido em poucas horas após a colheita.

A criopreservação do sêmen de galo não se justifica em plantéis comerciais, pois, em razão do intenso trabalho de seleção a que são submetidos, as gerações mais novas sempre se apresentam produtivamente superiores às anteriores. O uso dessa técnica se limita à preservação de raças raras.

### 2.3. Metabolismo Espermático e Nucleotídeos Cíclicos

Os nucleotídeos cíclicos apresentam diversos efeitos em uma larga escala de sistemas biológicos, mas a única função conhecida do AMPc em células eucarióticas é a estimulação da fosforilação protéica por meio da ativação de uma proteína quinase dependente de AMPc (ROSEN et alii, 1975; CHULAVATNATOL e TREETIPSATTI, 1983).

No espermatozóide, o aumento da concentração de AMPc promove a maturação espermática (GARBERS et alii, 1971b; MORISAWA et alii, 1983), estimula a motilidade (STEINBERGER e STEINBERGER, 1980) e participa no processo de capacitação (MORTON e ALBAGLI, 1973; TASHI e MEANS, 1983). KOPF et alii (1979), GARBERS e KOPF (1980) e REES et alii (1990) observaram que a elevação da concentração interna de AMPc determinou um aumento no metabolismo dos espermatozoides. DUNCE (1973), SCHOENFELD et alii (1973), HAESUNGCHARERN e CHULAVATNATOL (1973), SCHOENFELD et alii (1975) e TURNER et alii (1978) verificaram que a adição de AMPc aumentou a percentagem de espermatozoides ativos, assim como a atividade dos mesmos. Os níveis intracelulares de AMPc são regulados pelo equilíbrio entre a sua síntese, decorrente do metabolismo do ATP pela enzima adenil ciclase, e sua degradação pela enzima fosfodiesterase para adenosina monofosfato (5'-AMP).

A elevação dos níveis intracelulares de AMPc pelo estímulo de sua síntese não tem dado resultado (TASH e MEANS, 1983). CASILLAS e HOSKINS (1970) verificaram um pequeno aumento na síntese de AMPc com o uso dos hormônios tiroxina e triiodotironina.

MOUSSA (1983) observou que tanto o AMPc quanto a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) influenciam o metabolismo oxidativo dos espermatozóides, ratificando os achados de GARBERS et alii (1971b), que verificaram que o AMPc e o GMPc induzem a uma elevação na taxa respiratória e na motilidade espermática. Esses últimos autores observaram ainda que outros nucleotídeos cíclicos, como a uridina monofosfato cíclica (UMPc), citosina monofosfato cíclica (CMPc), deoxitimidina monofosfato cíclica (dTMPc) e inosina monofosfato cíclica (IMPc), não influenciam a funcionalidade espermática.

Parece haver dois mecanismos distintos que modulam a motilidade espermática: 1) mecanismo dependente de AMPc - envolvido com a motilidade inicial e o vigor; e 2) mecanismo dependente de cálcio - envolvido com a assimetria dos batimentos flagelares e com o mecanismo de quimiotaxia dos espermatozóides (GIBBONS, 1983).

BRAUN (1975), WATKINS et alii (1978), HYNE e GARBERS (1979), KOPF e GARBERS (1980), GARBERS (1981), HYNE e LOPATA (1982), KOPF et alii (1983) e KOPF e VACQUIER (1984) verificaram que o sistema



enzimático adenil ciclase do espermatozóide é estimulado por cálcio exógeno, corroborando os achados de MORTON et alii (1974), os quais verificaram que a administração de cálcio a uma concentração de 0,1 a 3 milimolares (mM) estimula, dependendo da dose, a motilidade e a concentração intracelular de AMPc.

Vários estudos indicam que o AMPc e o cálcio agem separadamente ou sinergicamente, de modo a regular a motilidade espermática em invertebrados (GRAY et alii, 1976; TUBB et alii, 1978 e 1979) e mamíferos (GARBERS et alii, 1971b; FRENKEL et alii, 1973; GARBERS et alii, 1973; HOSKINS et alii, 1975; PETERSON e FREUND, 1976; HYNE e GARBERS, 1979; PETERSON et alii, 1979). Alguns experimentos demonstraram que o cálcio extracelular pode exercer sobre a motilidade um efeito estimulatório (MORITA e CHIANG, 1970; YANAGIMACHI e USUI, 1974; YOUNG e NELSON, 1974; DAVIS, 1978; COOPER, 1984), e inibitório (ROSADA et alii, 1970; BREDDERMAN e FOOTE, 1971; McGRADY et alii, 1974), ou exercer pouco efeito sobre a mesma (QUINN et alii, 1970; HYNE e GARBERS, 1979), dependendo da concentração e da espécie animal.

MANN e LUTWAK-MANN (1981) sugeriram que o AMPc age diretamente na membrana citoplasmática do espermatozóide, regulando as trocas de fosfato inorgânico e cálcio, resultando em um aumento na motilidade. SIMPSON e WHITE (1987) verificaram que o AMPc e as metilxantinas

diminuíram a taxa de absorção do cálcio pelo espermatozóide. WISHART e ASHIZAWA (1987) observaram que o cálcio afetou a motilidade espermática, sem afetar o metabolismo dos nucleotídeos cíclicos.

Alguns autores propõem o envolvimento do AMPc e do cálcio no processo de maturação espermática no epidídimo (FRENKEL et alii, 1973; HOSKINS et alii, 1975; PETERSON e FREUND, 1976; PETERSON et alii, 1979).

A presença e a atividade da proteína quinase dependente de AMPc, nos espermatozóides, já foram demonstradas em vertebrados e invertebrados (GRAY et alii, 1976; HOSKINS et alii, 1974). A fosforilação protéica, realizada pela proteína quinase dependente de AMPc, é responsável pela ativação da motilidade espermática em inúmeras espécies (BROKAW, 1983). Vários autores têm sugerido que a proteína quinase dependente de AMPc se localiza sobre a superfície externa do espermatozóide (MAJUMDER, 1978; HOROWITZ et alii, 1981; SCHOFF, 1982). Já GARBERS (1981) e TASH e MEANS (1983) verificaram que o sistema adenil ciclase e a proteína quinase, dependente de AMPc, estão presentes por toda a estrutura do espermatozóide, sendo a gota citoplasmática particularmente rica em proteína quinase, dependente de AMPc.

A motilidade espermática depende do ATP como fonte de energia e é controlada pelo AMPc (STEINBERGER e STEINBERGER, 1980; MORISAWA e OKUNO, 1982). O conteúdo espermático de AMPc aumenta de três a dez vezes

quando o espermatozóide passa pelo processo de maturação, isto é, passa do estado quiescente para o estado móvel, no trânsito epididimário (GARBERS et alii, 1971b; HOSKINS et alii, 1974; MORTON et alii, 1974; CASCIERI et alii, 1976).

O íon bicarbonato aumenta acentuadamente os níveis de AMPc nos espermatozóides (GARBERS et alii, 1982). HOSKINS et alii (1983) sugeriram que o íon bicarbonato modula os níveis de nucleotídeos cíclicos, por intermédio do cálcio.

TASH e MANN (1973) e CHAUDHRY e ANAND (1975) quantificaram o nível de AMPc no sêmen bovino em 155 a 183 pmol/10<sup>9</sup> espermatozóides.

#### 2.4. Efeito da Adição de Cafeína ao Sêmen

A cafeína (1,3,7 - trimetil - 2,6 - dioxipurina) pertence ao grupo das metilxantinas e é um inibidor da fosfodiesterase. No espermatozóide existem duas classes distintas de fosfodiesterase: uma que prefere o AMPc e outra que prefere o GMPc como substrato; a cafeína atua sobre as duas, inibindo-as (TASH e MEANS, 1983). A adição de cafeína elevou os níveis intracelulares de AMPc nos espermatozóides (SCHOFF e LARDY, 1987; WISHART e ASHIZAWA, 1987). Entretanto, GARBERS et alii (1971b) verificaram que a cafeína só

aumenta a concentração espermática de AMPc na presença de um substrato (piruvato, acetato, oxalacetato ou  $\beta$ -hidroxibutirato). Observaram ainda que o espermatozóide é mais permeável à cafeína e ao GMPc que ao AMPc.

A adição de cafeína ao sêmen mostrou-se capaz de **alterar** diversos **parâmetros** do sêmen, como : a motilidade espermática (GARBERS et alii, 1971b; MOUSSA, 1983; JIANG et alii, 1984), a taxa respiratória dos espermatozoides (SIMPSON e WHITE, 1987), a taxa de glicólise ou frutólise (HICKS et alii, 1972; FRENKEL et alii, 1973; GARBERS et alii, 1973), a absorção de cálcio (SIMPSON e WHITE, 1987), dentre outros.

A adição de cafeína ao sêmen aumentou a motilidade espermática em diversas espécies: bovinos (GARBERS et alii, 1971b; SCHIOFF e LARDY, 1986 e 1987), bubalinos (FATTOUHI et alii, 1985; GEHLAUT e SRIVASTAVA, 1987; FATTOUHI e ABDON, 1991), suínos (GARBERS et alii, 1973), roedores (FRENKEL et alii, 1973; MORTON et alii, 1974), aves (WISLIART e ASHIZAWA, 1987), peixes (MORISAWA e OKUNO, 1982), moluscos hialotídeos (KOPF et alii, 1984) e humanos (BARKAY et alii, 1977; HARRISON, 1978; TURNER et alii, 1978; TRAUB et alii, 1982; AITKEN et alii, 1983; MOUSSA, 1983; JIANG et alii, 1984; REES et alii, 1990).

A cafeína exerce um maior estímulo ao sêmen com baixa motilidade inicial (BARKAY et alii, 1977; GEHLAUT e SRIVASTAVA, 1987; RUZICHI et alii, 1987). AITKEN et alii (1983) observaram **que a** adição de cafeína, a uma

suspensão de espermatozóides capacitados, não alterou a motilidade dos mesmos, mas aumentou a capacidade fecundante.

HARRISON (1978), trabalhando com casais humanos subférteis, não obteve nenhuma gestação após a inseminação com sêmen tratado com cafeína, apesar de ter observado um aumento na motilidade espermática.

O efeito da cafeína sobre a velocidade de deslocamento dos espermatozóides é discutido, e os experimentos têm apresentado resultados conflitantes. LEVIN et alii (1981), AITKEN et alii (1983) e MOUSSA (1983) observaram que apesar de aumentar o número de espermatozóides móveis, a cafeína não alterou a velocidade dos mesmos. Já TRAUB et alii (1982) reportaram um aumento na velocidade do espermatozóide, principalmente nos primeiros 30 minutos após a adição de cafeína. RUZICH et alii (1987), utilizando a análise computacional em vídeo, constataram que a cafeína realmente aumenta a percentagem de espermatozóides móveis e a velocidade dos mesmos, sem afetar a linearidade dos movimentos espermáticos.

AITKEN et alii (1983) verificaram que a adição de cafeína ao sêmen humano aumentou a taxa de penetração dos espermatozóides no muco cervical, mas não alterou a qualidade de seus movimentos.

Trabalhos como os de GARBERS et alii (1971a, b), HICKS et alii (1972), FRENKEL et alii (1973) e REES et alii (1990) demonstraram que a cafeína estimula o consumo de oxigênio pelos espermatozóides. SIMPSON e WHITE

(1987) verificaram que a cafeína aumenta a taxa respiratória, principalmente dos espermatozóides provenientes do epidídimo. A adição de cafeína também estimulou a taxa de glicólise nos espermatozóides (HICKS et alii, 1972; FRENKEL et alii, 1973; GARBERS et alii, 1973; REES et alii, 1990).

SCHOFF e LARDY (1986 e 1987) observaram que a cafeína não alterou o pH interno do espermatozóide e nem estimulou a fosforilação protéica.

O uso da cafeína em amostras de sêmen submetidas à criopreservação tem demonstrado resultados promissores na motilidade dos espermatozóides. Trabalhando com sêmen humano descongelado, BARKAY et alii (1977) verificaram que a cafeína aumentou a motilidade em até 80%. Os melhores resultados foram obtidos quando a cafeína foi adicionada ao sêmen, durante ou imediatamente após o seu descongelamento. GEHLAUT e SRIVASTAVA (1987) observaram que a cafeína aumentou a motilidade do sêmen bubalino descongelado em até 100%, dependendo do diluente utilizado. A cafeína também aumentou a motilidade pré-congelamento e pós-descongelamento no sêmen de bovinos (MIYAMOTO e NISHIKAWA, 1979) e suínos (MIYAMOTO e NISHIKAWA, 1980).

As concentrações de cafeína adicionadas ao sêmen variaram nos diversos experimentos e dentre as espécies estudadas. LEVIN et alii (1981), trabalhando com sêmen humano, verificaram que a cafeína estimulou a motilidade de maneira dose-dependente, quando a concentração da mesma variou de 0,012 a 2,0 mM.

Já BARKAY et alii (1977) observaram que a melhor concentração de cafeína para o sêmen humano foi de 7,2 mM. A dose efetiva (DE<sub>50</sub>) para o estímulo da motilidade e da velocidade foi de 0,3 mM, e o efeito da adição de cafeína iniciou-se imediatamente após a mistura e manteve-se por mais de quatro horas (LEVIN et alii, 1981; e RUZICH et alii, 1987). FATTOUH e ABDOL (1991) verificaram que a melhor concentração de cafeína foi de 2 mM para sêmen de búfalo. WISHART e ASHIZAWA (1987) utilizaram 2 mM de cafeína em sêmen de galo e conseguiram restabelecer a motilidade dos espermatozóides imobilizados pela manutenção do sêmen a uma temperatura de 41°C.

Os efeitos da cafeína sobre a motilidade dos espermatozóides são discutíveis. LEVIN et alii (1981) observaram que a motilidade foi estimulada (dose-dependente) em concentrações micromolares, mas a inibição da fosfodiesterase espermática necessitou de doses milimolares, sugerindo que a cafeína pode estimular a motilidade por outro mecanismo, além da inibição da fosfodiesterase, corroborando os achados de TAMBLYN e FIRST (1977).

REES et alii (1990) constataram que a cafeína e a pentoxifilina, apesar de serem do grupo das metilxantinas e inibirem a fosfodiesterase, não apresentaram os mesmos efeitos sobre a motilidade dos espermatozóides, reforçando a hipótese de que o efeito decorrente da adição de cafeína não se limita à inibição da fosfodiesterase. Também SCHOFF e LARDY (1987) sugeriram que a cafeína estimula a motilidade espermática por meio de um processo que não envolva

nucleotídeos cíclicos. KOPF et alii (1984) sugeriram que as metilxantinas afetam o funcionamento espermático via efeito primário no transporte de cálcio, por meio de uma proteína carreadora, na membrana citoplasmática do espermatozóide.

DOUGHERTY et alii (1976) e READ e SCHNIEDEN (1978) não observaram nenhum efeito estimulatório da cafeína sobre o sêmen humano.

HARRISON et alii (1980) verificaram que ocorrem alterações na ultra-estrutura da cabeça do espermatozóide após a estocagem com cafeína. Essas alterações estariam associadas ao processo de capacitação dos espermatozóides.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Características Gerais

O experimento foi conduzido no setor de avicultura e no laboratório de reprodução animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), município de Viçosa, Minas Gerais, durante o período de 12 de abril a 5 de agosto de 1993. Nesse período a temperatura ambiental oscilou entre 5,4° C e 32,0° C, sendo a temperatura média compensada de 17,9°C.

### 3.2. Animais

Foram utilizados 50 galos e 264 galinhas em postura,, todos da raça *legorne* branca, mantidos em gaiolas individuais, onde tinham água à vontade e recebiam ração balanceada de postura , na forma farelada. Os valores nutricionais da ração balanceada oferecida aos animais estão descritos no Quadro 5. Os galos iniciaram o período *pré-experimental* com 28 semanas de idade e as galinhas iniciaram o experimento com 34 semanas de idade.

QUADRO 5 - Valores nutricionais da ração oferecida à aves no período experimental\*

Nutrientes	Valor (%)
Proteína bruta	15,83
Cálcio	3,53
Fósforo disponível	0,52
Metionina	0,32
Metionina + Cistina	0,69
Lisina	0,76
Energia metabolizável	2.760 cal/kg

\* Fonte: FÁBRICA DE RAÇÕES (UFV).

### 3.3. Colheita do Sêmen

Todos os galos passaram por um período pré-experimental de 30 dias, quando foram submetidos a uma “toilete”, isto é, a uma retirada das penas da região pericloacal. Essa retirada foi feita por arrancamento manual e repetida a cada duas semanas durante todo o período de colheita de sêmen. A “toilete” visou facilitar o processo de colheita do sêmen, por permitir uma melhor visualização da cloaca, e diminuir as fontes de contaminação do sêmen. Durante a fase pré-experimental, foram feitas duas colheitas semanais com o intuito de condicionar os galos ao procedimento de colheita, minimizando o estresse durante a fase experimental, e realizar uma triagem e seleção dos mesmos, descartando aqueles que apresentassem baixa qualidade seminal.

A colheita foi feita por meio do método de massagem abdominal descrito por BURROWS e QUINN (1935) e modificada por WHEELER (1948). Tomou-se o cuidado para que o sêmen não fosse contaminado por detritos sólidos da cloaca, como fezes e uratos. O sêmen era recolhido em um tubo de vidro graduado, quando se fazia o registro individual do volume ejaculado. Os ejaculados dos diversos galos foram misturados, formando um “pool” de sêmen.

### 3.4. Tratamento do Sêmen e Delineamento Experimental

O “pool” de sêmen foi mantido em tubo de ensaio tampado, em ambiente aquecido com temperatura controlada em 20 a 22°C, durante todas as fases de manipulação, e a estocagem foi feita em estufa de cultura microbiológica, mantendo a mesma faixa térmica. O sêmen foi dividido em oito frações, correspondendo aos oito tratamentos distintos: 1. sêmen puro; 2. diluído 1:4 em BPSE; 3. diluído como o grupo anterior, e adicionado com 2mM de cafeína logo após a colheita. As demais frações de sêmen receberam tratamento semelhante à fração 3, diferindo apenas no intervalo da colheita à adição de cafeína: fração 4. quatro horas após a colheita; fração 5 - oito horas; fração 6 - 12 horas; fração 7 - 24 horas e fração 8 - 48 horas após a colheita.

Na primeira fração, o sêmen foi mantido puro, acondicionado em tubo de ensaio estéril tampado, a uma temperatura ambiental controlada de 20 a 22°C na colheita, sendo estocado em estufa de cultura à mesma faixa térmica, até a inseminação.

Na segunda fração,, o sêmen foi diluído em “Beltsville Poultry Semen Extender” (BPSE) (SEXTON, 1977) na proporção de uma parte de sêmen para quatro partes do diluente (SEXTON, 1978) aquecido a 37°C, logo após a colheita, e mantido nas mesmas condições descritas para o primeiro grupo.

As demais frações receberam um tratamento semelhante àquele da segunda, exceto pelo fato de ao diluente serem adicionados 2 mM de cafeína (WISHART e ASHIZAWA, 1987). A adição de cafeína foi efetuada nos seguintes horários: 0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após a colheita para os grupos 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

### 3.5. Avaliação do Sêmen

#### 3.5.1. Volume

Foi determinado individualmente para cada galo, pela leitura direta da escala no tubo de colheita graduado de 0 a 15 ml, com precisão de 0,1 ml.

#### 3.5.2. Motilidade

Retirou-se uma gota de sêmen do “pool”, e esta foi diluída na proporção de 1:10 em BPSE. Imediatamente, uma gota dessa diluição era colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas e mantidas em mesa térmica, sendo levada a um microscópio ótico de contraste de fase. A percentagem de espermatozóides

móveis foi estimada após a observação de vários campos com um aumento de 100 vezes, em pelo menos duas lâminas.

### 3.5.3. Vigor

A avaliação do vigor foi feita semelhantemente à motilidade. O vigor foi classificado, segundo a classificação de FERREIRA NETO et alii (1977), variando de zero (0) a cinco (5), sendo o escore 0 equivalente à total imobilidade espermática e o escore 5, à movimentação intensa, vigorosa, progressiva e com formação de ondas.

### 3.5.4. Concentração Espermática

Diluiu-se 20 µl de sêmen puro em 19,98 ml (diluição 1:1000) de solução de formol salina a 1% . Após a homogeneização da mistura, uma alíquota era levada à câmara de Neubauer, onde a contagem era feita sob microscopia de contraste de fase a um aumento de 400 vezes, com duas repetições de cada amostra analisada.

### 3.5.5. Percentagem de Espermatozóides Vivos e Anormais

Examinaram-se 200 espermatozóides por esfregaço preparado por meio da técnica de coloração pela solução de nigrosina - azul de bromofenol tamponado, descrita por KAMAR (1959).

Essa mesma técnica foi utilizada na coloração dos esfregaços que serviram para a avaliação da percentagem de espermatozóides anormais, sendo o tempo de contato com a solução aumentado, com o intuito de corar o maior número possível de espermatozóides, não se limitando apenas aos mortos. Examinaram-se 200 espermatozóides corados e foram considerados apenas as anomalias de cabeça e peça intermediária.

**As** análises do sêmen foram feitas em vários períodos após a colheita: 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. **As** amostras tratadas com cafeína, que foram subsequentemente submetidas à *microscopia*, passaram por um período mínimo de 10 minutos de incubação com a cafeína, antes de serem analisadas.

### 3.6. Avaliação da Fertilidade

A fertilidade das amostras de sêmen foi determinada pela *inseminação* artificial de 264 galinhas, divididas aleatoriamente em 33 grupos de oito aves

cada, correspondendo a oito galinhas inseminadas para cada tratamento. A inseminação foi feita segundo técnica descrita por RESENDE et alii (1983), utilizando-se uma seringa acoplada a uma pipeta, e foi realizada após as 16 horas, conforme recomendação de PARKER (1945). Cada galinha foi inseminada uma única vez, recebendo uma dose de  $200 \times 10^6$  espermatozoides vivos, o dobro do número mínimo (100 milhões) de espermatozoides recomendado para a inseminação artificial de galinhas (MUNRO, 1938; BAHR e BAKST, 1987; BILGILI et alii, 1987).

Os ovos foram coletados a partir do 2º dia até o 20º dia após a inseminação (KIRBY e FROMAN, 1991), sendo identificados pelo número da galinha e pela data da postura, e armazenados em temperatura ambiente (a temperatura ambiental média no período foi de 16,08°C). A cada quatro dias, os ovos armazenados eram colocados em incubadora, onde permaneciam por 19 dias. No nono dia de incubação eram submetidos à ovoscopia, os embrionados retornavam à incubadora e os claros eram quebrados para a verificação de uma possível morte embrionária precoce. Aos 19 dias de incubação os ovos eram transferidos para a câmara de oclusão.

A taxa de fertilidade foi calculada pelo número de ovos embrionados sobre o número total de ovos.



### 3.7. Análise Estatística

Cada período de estocagem (0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas) foi considerado, para efeito de análise estatística das variáveis estudadas, como inteiramente casualizado. As médias dos fatores qualitativos (tratamentos) foram comparadas, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Volume e Concentração Espermática

O volume e a concentração espermática são parâmetros que foram analisados como informação complementar, pois, apesar de não serem influenciados pelos tratamentos propostos, serviram para caracterizar melhor o sêmen utilizado no experimento. Os valores médios desses parâmetros estão reproduzidos no Quadro 6.

O volume médio de 0,42 ml por ejaculado não diferiu da média encontrada por KAMAR (1960), SOLLER et alii (1965) e SEVINÇ et alii (1985), porém apresentou-se inferior aos valores reportados por BURROWS e QUINN (1935 e 1937), PISTENMA et alii (1971) e CARVALHO (1976). Essas diferenças podem ser atribuídas às diferenças na metodologia de colheita do

QUADRO 6 - Valores médios de volume e concentração espermática do sêmen de galos da raça Legorne branca

Parâmetros	Valores Médios	Desvio-Padrão
Volume (ml)	0,420	0,050
Concentração ( $\times 10^9$ espermatozóides/ml)	2,724	0,546

sêmen, na alimentação das aves e no grau de adaptação do animal, já que alguns autores utilizaram galos de plantéis de doadores de sêmen, que eram rotineiramente manipulados antes da fase experimental.

**A** concentração espermática média de 2,724 milhões de espermatozóides por  $\text{mm}^3$  foi superior às médias encontradas por SAMPSON e WARREN (1939) e WILWERTH (1952), ficando próxima dos valores observados por PARKER et alii (1940) e CARVALHO (1976), mas inferior aos achados de WHEELER e ANDREWS (1943). **As** diferenças observadas podem ser explicadas pelas diferentes raças e linhagens utilizadas nos diversos experimentos.

## 4.2 Espermatozóides Vivos e Morfologia Espermática

As percentagens de espermatozóides vivos e espermatozóides anormais são apresentadas no Quadro 7. Esses valores correspondem à média obtida da análise do sêmen fresco de galo.

Verificou-se que uma média de 93,9% dos espermatozóides estavam vivos, imediatamente **após** a colheita. Esse valor é próximo àquele observado por SAEID e AL-SOUDI (1975) e CARVALHO (1976) e superior aos achados de KAMAR e BADRELDINI (1959), KAMAR (1960) e MARINI e GOODMAN (1969). Essas variações podem ser devidas a diferenças no potencial reprodutivo dos plantéis avaliados e na técnica de coloração do esfregaço seminal para a análise.

QUADRO 7 - Valores percentuais de espermatozóides vivos e espermatozóides anormais', no sêmen fresco de galos da raça Legorne branca

Parâmetros	Valores Médios	Desvio-Padrão
Espermatozóides vivos	93,9	4,0
Espermatozóides anormais	6,0	2,9

1. Anomalias de cabeça e peça intermediária.

A percentagem média de anomalias morfológicas espermáticas de 6,0% foi semelhante aos valores encontrados por SAMPSON e WARREN (1939), ALLEN e CHAMPION (1955) e CARVALHO (1976), porém apresentou-se inferior às médias encontradas por KAMAR e BADRELDINI (1959) e KAMAR (1960) e superior ao valor médio observado por MUKHERJEE e BHATTACHARYA (1949). As diferenças podem ser devidas à variação na temperatura ambiental para as aves nos diversos experimentos, fato que foi demonstrado claramente nos trabalhos de KAMAR e BADRELDINI (1959) e SAEID e AL-SOUDI (1975).

Em virtude de problemas técnicos na preparação das lâminas, não foi possível avaliar o percentual de espermatozóides vivos e anormais após os vários períodos de estocagem do sêmen e tratamento com cafeína.

#### 4.3. Motilidade

A motilidade dos espermatozóides sob os diversos tratamentos no decorrer do período de estocagem é apresentada no Quadro 8.

A motilidade inicial observada neste experimento, variando de 92,5 a 95,4%, foi semelhante à encontrada por ALLEN e CHAMPION (1955), mas foi superior às observadas por RAIMO (1943), COOPER e ROWELL (1958),

QUADRO 8 - Motilidade, espermática média (em Porcentagem) no sêmen de galos submetido a diversos tratamentos, por períodos de até 48 horas após a sua colheita'

Tratamento	Períodos de Estocagem (Horas)					
	0	4	8	12	24	48
Puro	95,4 a	37,5 b	27,5 b	15,2 b	1,6 c	0,0
Diluído	92,5 a	79,1 a	69,9 a	65,6 a	13,8 bc	0,0
Cafeína 0 h	93,6 a	74,1 a	71,4 a	67,0 a	20,0 abc	0,0
Cafeína 1 h		81,6 a	80,8 a	70,0 a	30,0 abc	0,0
Cafeína 2 h		79,1 a	80,8 a	71,0 a	43,0 abc	0,2
Cafeína 3 h		76,6 a	80,0 a	77,0 a	40,0 abc	0,0
Cafeína 4 h		71,6 a	85,0 a	84,1 a	46,0 ab	0,0
Cafeína 8 h			77,5 a	82,5 a	39,2 abc	0,4
Cafeína 12 h				88,3 a	48,5 a	0,4
Cafeína 24 h					54,2 a	0,0
Cafeína 48 h						3,6

1. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

KAMAR (1960), McDANIEL e CRAIG (1962), SAEID e AL-SOUDI (1975) e CARVALHO (1976).

O sêmen puro apresentou uma rápida diminuição em sua motilidade, quando comparado aos outros tratamentos. A adição de cafeína só aumentou significativamente a motilidade a partir de 24 horas de estocagem, sendo que a adição tardia (12 e 24 horas após a colheita) apresentou-se melhor.

De modo geral, o sêmen puro apresentou uma motilidade inferior ao sêmen diluído e ao sêmen tratado com cafeína, após a estocagem. Provavelmente esse quadro provém de um declínio do metabolismo energético espermático causado pela rápida diminuição dos nutrientes do plasma seminal, decorrente da alta concentração espermática do sêmen de galo. A diluição aumenta a oferta de nutrientes para os espermatozóides, e a adição de cafeína estimula o metabolismo energético dos mesmos.



#### 4.4. Fertilidade

No Quadro 9 são mostradas as taxas de fertilidade do sêmen de galo submetido a vários tratamentos, durante o período de 48 horas de estocagem do mesmo.

Quando a inseminação ocorreu imediatamente após a colheita do sêmen, não houve influência do tratamento sobre a fertilidade. Após quatro horas de armazenagem, o sêmen que foi tratado com cafeína logo após a colheita apresentou uma pior taxa de fertilidade. De modo geral, as amostras tratadas com cafeína, horas antes da inseminação, apresentaram taxas de fertilidade mais baixas que as demais. Esse fato pode ser explicado pelo estímulo do metabolismo energético do espermatozóide, proporcionado pela cafeína, que leva a um rápido aumento da taxa de glicólise, com uma substancial queda nos níveis de reserva

QUADRO 9 - Taxas de fertilidade média (em Porcentagem) do sêmen de galos submetido a vários tratamentos, por períodos de até 48 horas após a sua colheita

Tratamento	Períodos de Estocagem (Horas)					
	0	4	8	12	24	48
Puro	59,7	32,8	8,2	0,7	0,0	0,0
Diluído	33,6	29,8	23,1	0,8	0,0	0,0
Cafeína 0 h	37,5	4,3*	7,0	0,0	0,0	0,0
Cafeína 4 h		30,3	5,1	0,0	0,0	0,0
Cafeína 8 h			14,5*	0,8	0,0	0,0
Cafeína 12 h				1,9	0,0	0,0
Cafeína 24 h					0,0	0,0
Cafeína 48 h						0,0

Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

energética do espermatozóide. Outro fato que pode estar envolvido é que a cafeína, embora cause alterações na membrana acrossômica dos espermatozóides, capacitando-os à fecundação, reduz a sua vida útil no trato reprodutivo da galinha, ocasionando uma menor taxa de fertilidade.



## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstram que o sêmen de galo é muito sensível à estocagem, diminuindo consideravelmente a sua motilidade espermática e seu poder fecundante com o decorrer do tempo. A diluição do sêmen em BPSE retardou essa ação nociva da estocagem sobre os espermatozoides. A adição de cafeína demonstrou ser um artifício que pode ser utilizado para minimizar o efeito deletério da armazenagem sobre a fertilidade do sêmen de galo.

Após observar e discutir os resultados obtidos, concluiu-se que:

1. o sêmen puro, estocado à temperatura ambiente (20 a 22°C), apresenta uma queda maior e mais rápida na motilidade espermática;

2. a adição de cafeína estimula, significativamente, a motilidade espermática de sêmen estocado por 24 horas;
3. a cafeína foi mais atuante sobre a motilidade, quando adicionada próxima ao momento da inseminação;
4. apesar de promover diferenças na motilidade espermática, os tratamentos propiciaram pequena diferença na fertilidade do sêmen; e
5. a diluição do sêmen em BPSE prolonga a fertilidade do mesmo.

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- AITKEN, R.J.; BEST, F.; RICHARDSON, D.W.; SCHATS, R.; SIMM, G.  
Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, **73**: 441-9, 1983.
- ALLEN, C.J. & CHAMPION, L.R. Competitive fertilization in the fowl. **Poultry Sic.**, **34**(6):1332-42, 1955.
- ASHIZAWA, K. & NISHIYAMA, H. Effects of the temperature on the *vigour* of motility, oxygen consumption, and duration of motility of fowl spermatozoa under aerobic conditions. **Jap. Poultry Sci.**, **14**:264-6, 1978.
- BAHR, J.M. & BAKST, M.R. Poultry. In: HAFEZ, E.F.E. ed. **Reproduction in farm animals**. Philadelphia, Lea & Fabiger, 1987.p.379-98.
- BAJPAI, P.K. & BROWN, K.I. The effect of different temperatures on the metabolic activity, morphology and fertilizing capacity of turkey semen. **Poultry Sci.**, **43**: 1501-8, 1964.

- BARKAY, J.; ZUCKERMAN, H.; SKLAN, D.; GORDON, S. Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. **Fertil. Steril.**, 28:175-7, 1977.
- BILGILI, S.F.; SEXTON, K.J.; RENDEN, J.A. Fluorometry of poultry semen: Influence of dilution and storage on chicken spermatozoal viability and fertility. **Poultry Sci.**, 66:2032-5, 1987.
- BOGDONOFF, P.D. & SHAFFNER, C.S. The effect of pH on the "in vitro" survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. **Poultry Sci.**, 33(4):665-9, 1954.
- BONADONNA, T. Artificial insemination of birds. In: WORD'S POULTRY CONGRESS, 7, Cleveland, 1939. **Proceedings.** Cleveland, 1939. p.79-82.
- BONNIER, G. & TRULSSON, S. Artificial insemination of chickens with semen diluted in ringer solution. In: WORD'S POULTRY CONGRESS, 7, Cleveland, 1939. **Proceedings...** Cleveland, 1939. p.79-82.
- BRAUN, T. The effect of divalent cations on bovine spermatozoal adenylate cyclase activity. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, 1:271-81, 1975.
- BREDDERMAN, P.J. & FOOTE, F.H. The effect of Ca<sup>++</sup> ions on cell volume and motility of bovine spermatozoa. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 137:1440-4, 1971.
- BROKAW, C.J. Control mechanisms in sperm flagella. In: ANDRÉ, J. (ed.) **The sperm cell. Fertilizing power, surface properties, motility, nucleus and acrosome, evolutionary aspects.** Hague, Martinus Nijhoff Publishers, 1983. p.291-303.
- BUNGE, R.G. Caffeine-stimulation of ejaculated human spermatozoa. **Urology** 1(1):37, 1973.

- BURROWS, W.H. & QUINN, J.P. A method of obtaining spermatozoa from domestic fowl. **Poultry Sci.**, 14:251-4, 1935.
- BURROWS, W.H. & QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Sci.**, 16:19-24, 1937.
- BURROWS, W.H. & QUINN, J.P. Effective dosages of undiluted semen in artificial insemination of chickens. **Poultry Sci.**, 17:131-5, 1938.
- BURROWS, W.H. & QUINN, J.P. Artificial insemination of chicken and turkey. In: WORD'S POULTRY CONGRESS, 7, Cleveland, 1939. **Proceedings...** Cleveland, 1939. p.82-5.
- CARVALHO, M.R. **Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de galos "White Leghorn" em confronto com a fertilidade.** Belo Horizonte, UFMG, 1976. 31p. (Tese M.S.)
- CASCIERI, M.; AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. **J. Biol. Chem.** 251:787-93, 1976.
- CASILLAS, E.R. & HOSKINS, D.D. Activation of monkey spermatozoal adenyl cyclase by thyroxine and triiodothyronine. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 40:255-62, 1970.
- CHAUDHRY, P.S. & ANAND, S.R. Enzyme activities regulating adenosine 3',5'-cyclic monophosphate of buffalo, bull and goat spermatozoa. **Ind. J. Biochem. Biophys.**, 12:290-1, 1975.
- CHULAVATNATOL, M. & TREETIPSATIT, N. Initiation of sperm flagellar movement using rat demembrated sperm model: nucleotide specificities. In: ANDRÉ, J. (ed.) **The sperm cell.** Hague, Martinus Nijhoff Publishers, 1983. p.364-7.

CLARKE, R.N.; SEXTON, T.J.; OTTINGER, M.A. Effects of holding temperature and storage time on respiration rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. **Poultry Sci.**, 61:1912-7, 1982.

COOPER, T.G. The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse. **Gamete Res.**, 9:55-74, 1984.

COOPER, D.M. & ROWELL, J.G. Relations between fertility, embryonic survival and some semen characteristics in the chicken. **Poultry Sci.**, 37(3):699-707, 1958.

DAVIS, B.K. Effect of calcium on motility and fertilization by rat spermatozoa. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 157:54-6, 1978.

DOUGHERTY, K.A.; COCKETT, A.T.K.; URRY, R.L. Caffeine, theophylline, and human sperm motility. **Fertil. Steril.**, 27:541, 1976.

FATTOUH, El-S.M.; SEIDA, A.A.; NASR, M.T.; ABDOU-AHMED, M.M. Effect of caffeine on the motility of ejaculated and epididymal buffalo spermatozoa. **Vet. Med. J. Egypt**, 33:261-71, 1985.

FATTOUH, El-S.M. & ABDOU, M.S.S. Effect of caffeine on the post-thaw motility of buffalo spermatozoa. **Theriogenology**, 36(1): 149-54, 1991.

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S.; MAGALHÃES, L.M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte, Rabelo Brasil, 1977.279p.

FORD, W.C.L. & WAITES, G.M.H. Sperm maturation and the potential for contraceptive interference. In: ZATUCHINI, C.I.; GOLDSMITH, A.; SPIELER, J.M.; SCIARRA, J.J. (eds.) **Male contraception: advances and future prospects**. Philadelphia, Harper e Row, p.89-106, 1986.

- FRENKEL, G.; PETERSON, R.N.; FREUND, M. The role of adenine nucleotides and the effect of caffeine and dibutyryl cyclic AMP on the metabolism of guinea pig epididymal spermatozoa. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **144**:420-5, 1973.
- GARBERS, D.L. The elevation of cyclic AMP concentrations in flagellaless sea urchin sperm heads. **J. Biol. Chem.**, **256**:620-4, 1981.
- GARBERS, D.L. & KOPF, G.S. The regulation of spermatozoa by calcium and cyclic nucleotides. **Adv. Cyclic Nucleotide Res.**, **13**:251-306, 1980.
- GARBERS, D.L.; FIRST, N.L.; SULLIVAN, J.J.; LARDY, H.A. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. **Biol. Reprod.**, **5**:336-9, 1971a.
- GARBERS, D.L.; LUST, W.D.; FIRST, N.L.; LARDY, H.A. Effect of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. **Biochemistry**, **10**(10):1825-31, 1971b.
- GARBERS, D.L.; FIRST, N.L.; GORMAN, S.K.; LARDY, H.A. The effects of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors on ejaculated porcine spermatozoan metabolism. **Biol. Reprod.**, **8**:599-606, 1973.
- GARBERS, D.L.; TUBB, D.J.; HYNE, R.V. A requirement of bicarbonate for  $\text{Ca}^{2+}$ -induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. **J. Biol. Chem.** **257**:8980-4, 1982.
- GARREN, H.W. & SHAFFNER, C.S. The effect of temperature and time of storage on the fertilizing capacity of undiluted fowl semen. **Poultry Sci.**, **31**(1):137-45, 1952.
- GEHLAUT, B.S. & SRIVASTAVA, R.K. Effect of caffeine citrate on postthawed motility of buffalo bull spermatozoa. **Theriogenology**, **28**(6):767-72, 1987.



- GIBBONS, I.R. Sperm motility: mechanisms and control. In: ANDRÉ, J. (ed.) **The sperm cell. Fertilizing power, surface properties, motility, nucleus e acrosome, evolutionary aspects.** Hague, Martinus Nijhoff Publishers. 1983. p.304-14.
- GRAY, J.P.; DRUMMOND, G.I.; LUK, D.W.T.; HARDMAN, J.G.; SUTHERLAND, E.W. Enzymes of cyclic nucleotide metabolism in invertebrate and vertebrate sperm. **Arch. Biochem. Biophys.** 172:20-30, 1976.
- HAESUNGCHARERN, A. & CHULAVATNOTOL, M. Stimulation of human spermatozoal motility by caffeine. **Fertil. Steril.**, 24:662, 1973.
- HARPER, H.A.; RODWELL, V.W.; MAYES, P.A. **Manual de química fisiológica.** 5 ed. São Paulo, Atheneu, 1982. p.138.
- HARRISON, R.F. Insemination of husband's semen with and without the addition of caffeine. **Fert. Steril.**, 29(5):532-4, 1978.
- HARRISON, R.F.; HEPPARD, B.L.; KALIZER, M. Observations on the motility, ultrastructure and elemental composition of human spermatozoa incubated with caffeine. **Andrologia**, 12:34, 1980.
- HICKS, J.J.; PEDRON, N.; ROSADA, A. Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens and follicular fluid. **Fertil. Steril.**, 23:886-93, 1972.
- HOROWITZ, J.A.; TOEG, H.; ORR, G.A. CAMP-dependent protein kinases on the outer surface of rat caudal epididymal sperm. **J. Cell Biol.**, 91:189a, 1981.
- HOSKINS, D.D.; HALL, M.L.; MUNSTERMAN, D. Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma. **Biol. Reprod.**, 13:168-76, 1975.

HOSKINS, D.D.; STEPHENS, D.T.; HALL, M.L. Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and protein kinase levels in developing bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, 37:131-3, 1974.

HOSKINS, D.D.; ACOTT, T.S.; CRITCHLOW, L.; VIJAYARAGHAVAN, S. Studies on the roles of cyclic AMP and calcium in the development of bovine sperm motility. **J. Submicrosc. Cytol.**, 15:221-7, 1983.

HUNSAKER, W.G.; AITKEN, J.R.; LINDBLAD, G.S. The fertilizing capacity of fowl semen as affected by time and temperature of storage. **Poultry Sci.**, 35(3):649-53, 1956.

HYNE, R.V. & GARBERS, D.L. Regulation of guinea pig sperm adenylate cyclase by calcium. **Biol. Reprod.**, 21:1135-42, 1979.

HYNE, R.V. & LOPATA, A. Calcium and adenosine ? affect human sperm adenylate cyclase activity. **Gamete Res.**, 6:81-9, 1982.

ISHIKAWA, H. The life duration of cock spermatozoa outside the body. In: **WORLD'S POULTRY CONGRESS**, 4, 1930. Proceedings... s.l., s.ed., 1930. p.90-4.

JIANG, C.S.; KILFEATHER, S.A.; PEARSON, R.M. The stimulatory effects of caffeine, theophylline, lysine-theophylline and 3-isobutyl-1-methylxanthine on human sperm motility. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 18:258, 1984.

KAMAR, G.A.R. The differentiation of live from dead sperms in fowl semen. **Stain Tech.**, 34:5-7, 1959.

KAMAR, G.A.R. The influence of semen characteristics on hatching results of chicken eggs. **Poultry Sci.**, 39(1):188-92, 1960.

KAMAR, G.A.R. & BADRELDINI, A.L. Seasonal variation in semen characteristics of adult Fayomi cocks. **Poultry Sci.**, 38(2):301-15, 1959.

KIRBY, J.D. & FROMAN, D.P. Analysis of poultry fertility data. 2. Comparison of long- and short-term fertility trials. *Poultry Sci.*, **70**:1986-90, 1991.

KOPF, G.S. & GARBERS, D.L. Calcium and a fructose-sulphate-rich polymer regulate sperm cyclic nucleotide metabolism and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, **22**:1118-26, 1980.

KOPF, G.S. & VACQUIER, V.D. Characterization of a calmodulin-stimulated adenylate cyclase from abalone spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, **259**:7590-6, 1984.

KOPF, G.S.; TUBB, D.J.; GARBERS, D.L. Activation of sperm respiration by low molecular weight egg factor and by 8-bromoguanosine 3', 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.*, **254**:8554-60, 1979.

KOPF, G.S.; LEWIS, C.A.; VACQUIER, V.D. Regulation of abalone sperm cyclic AMP concentrations and the acrosome reaction by calcium and methylxanthines. *Devl. Biol.*, **98**:28-36, 1983.

KOPF, G.S.; LEWIS, C.A.; VACQUIER, V.D. Characterization of basal and methylxanthines-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  transport in abalone spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, **259**(9):5514-20, 1984.

LAKE, P.E. Fowl semen as collected by the massage method. *J. Agric. Sci. Camb.*, **49**(1):120-6, 1957.

LAKE, P.E. Artificial insemination in poultry and the storage of sperm - a reappraisal. *World's Poultry Sci. J.*, **23**:111-32, 1967.

LAKE, P.E. & RAVIE, O. Effect on fertility of storing fowl semen for 24 hours at 5°C in fluids of different pH. *J. Reprod. Fert.*, **57**:149-55, 1979.

- LEVIN, R.N.; GREENBERG, S.H.; WEIN, A.J. Quantitative analysis of the effects of caffeine on sperm motility and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate (AMP) phosphodiesterase. **Fert. Steril.**, 36:(6):798-802, 1981.
- MAEDA, T. & TERADA, T. Morphological observations on fowl spermatozoa stored in frozen or liquid state. **Anim. Breed. Abstr.**, 51(6):491, 1983.
- MAJUMDER, G.C. Occurrence of a cyclic AMP-dependent protein kinase on the outer surface of rat epididymal spermatozoa. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 83:829-36, 1978.
- MANN, T. & LUTWAK-MANN, C. **Male Reproductive Function And Semen.** New York, Springer-Verlag, 1981. p.264.
- MARINI, J.P. & GOODMAN, B.L. Semen characteristics as influenced by selection for divergent growth rate in chickens. **Poultry Sci.**, 48(3):859-65, 1969.
- MARTINS, E.N. **Inseminação artificial em *Gallus domesticus*.** Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1981. 7p.
- McDANIEL, G.R. & CRAIG, J.V. Predicting male fertilizing capacity in high and low fertility strains of chickens. **Poultry Sci.**, 41(3):866-9, 1962.
- McGRADY, A.V.; NELSON, L.; IRELAND, M. Ionic effects on the motility of bull and chimpanzee spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, 40:71-6, 1974.
- MIYAMOTO, H. & NISHIKAWA, Y. Effect of caffeine on motility of bull spermatozoa. **Jap. J. Zootech. Sci.**, 50:601-8, 1979.
- MIYAMOTO, H. & NISHIKAWA, Y. Effect of caffeine on motility of boar spermatozoa. **Jap. J. Zootech. Sci.**, 51:272-8, 1980.

MORISAWA, M. & OKUNO, M. Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature*, **295**:703-4, 1982.

MORISAWA, M.; OKUNO, M.; MORISAWA, S. Direct evidence that cyclic AMP is an indispensable factor for initiation of sperm motility in salmonid fishes. In: ANDRÉ, J. (ed.) *The sperm cell. Fertilizing power, surface properties, motility, nucleus e acrosome, evolutionary aspects*. Hague, Martinus Nijhoff Publishers, 1983. 465p.

MORITA, Z. e CHIANG, M.C. The motility and aerobic metabolism of spermatozoa in laboratory animals with special reference to the effects of cold shock and the importance of calcium for the motility of hamster spermatozoa. *Diol. Reprod.*, **3**:169-79, 1970.

MORTON, U. e ALBAGLI, L. Modification of hamster sperm adenyl cyclase by capacitation "in vitro". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **50**:697-703, 1973.

MORTON, B.; HARRIGAN-LUM, J.; ALBAGLI, L.; JOOSS, T. The activation of motility in quiescent hamster sperm from the epididymis by calcium and cyclic nucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **56**:372-9, 1974.

MOUSSA, M.M. Caffeine and sperm motility. *Fert. Steril.*, **39**(6):845-8, 1983.

MUKHERJEE, D.P. & BHATTACHARYA, P. Semen studies and artificial insemination in poultry. *Ind. J. Vet. Sci. Anim. Husband.*, **19**:79-85, 1949.

MUNRO, S.S. The effect of dilution and density on the fertilizing capacity of fowl sperm suspensions. *Can. J. Res.*, **16**:281-99, 1938.

PARKER, J.E. Relation of time of day of artificial insemination to fertility and hatchability of hen's eggs. *Poultry Sci.*, **24**(4):314-7, 1945.

- PARKER, J.E.; MCKENZIE, F.F.; KEMPSTER, H.L.; Observations on the sexual behavior of New Hampshire males. **Poultry Sci. College Station**, **19(3):191-7**, 1940.
- PETERSON, R.N. & FREUND, M. Relationship between motility and the transport and binding of divalent cations to the plasma membrane of human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, **27:1301-7**, 1976.
- PETERSON, R.N.; SEYLER, D.; BUNDMAN, D.; FREUND, M. The effect of theophylline and dibutyryl cyclic AMP on the uptake of radioactive calcium and phosphate ions by boar and human spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, **55:385-90**, 1979.
- PISTENMA, D.A.; SNAPIR, N.; MEL, H.C. Biophysical characterization of fowl spermatozoa. I. Preservation of motility and fertilizing capacity under conditions of low temperature and low sperm concentrations. **J. Reprod. Fert.**, **24(2):153-60**, 1971.
- POLGE, C. Artificial insemination in fowl. **Proc. Soc. Study Fert.**, **2(1):16-8**, 1951.
- QUINN, P.J.; WHITE, I.G.; VOGLMAYR, J.K. Use of continuous flow dialysis apparatus to determine the effect of cations, buffers and osmotic pressure on ram spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, **22:253-60**, 1970.
- RAIMO, H.F. Estudos sobre a fisiologia da reprodução em aves. II. Observações sobre a coleta e tecnologia do sêmen do *Gallus domesticus*. **Bol. Indus. Anim.**, **6(1/2):69-83**, 1943.
- READ, M.D. & SCINIEDEN, H. Effect of two methylxanthine derivatives and four prostaglandins on the motility of spermatozoa from volunteers and oligozoospermic patients. **Int. J. Androl.**, **1:220-4**, 1978.

REES, J.M.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 90(1):147-56, 1990.

RESENDE, O.A. **Influência de alguns fatores da inseminação artificial sobre a fertilidade em galinhas.** Porto Alegre, Fac. Vet. UFRGS, 1977. 66p. (Tese M.S.)

RESENDE, O.A.; MONTEIRO, J.M.L.; GOMES, W.V.; DIAS, P.G.O.; MENEGUELLI, **C.A.** Influência do manejo da inseminação artificial na rotina de reprodução de galinhas Legorne Branca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 26, Porto Alegre, 1973. **Anais... Porto Alegre**, 1973. p.177-8.

RESENDE, O.A.; MONTEIRO, J.M.L.; MIES FILHIO, **A.** Influência de alguns fatores da inseminação artificial sobre a fertilidade em galinhas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 15, Belém, 1978. **Anais...** Belém, 1978. p.177-8.

RESENDE, O.A.; MONTEIRO, J.M.L.; SANTOS, M.W.; DIAS, P.G.O.; SOUZA, S.O. **Inseminação artificial em galinhas.** Niterói, PESAGRO-RIO, 1983. 28p. (Boletim técnico, 6)

ROSADA, A.; HICKS, J.J.; MARTINEZ-ZEDILLO, G.; BONDANI, A.; MARTINEZ-MANATOU, J. Inhibition of human sperm motility by calcium and zinc ions. *Contraception*, 2:259-73, 1970.

ROSEN, O.M.; ERLICHMAN, J.; RUBIN, C.S. Molecular structure and characterization of bovine heart protein kinase. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 5:253-63, 1975.

RUZICHI, J.V.; ARSDALEN, K.V.; GILL, H.; HYPOLITE, S.; WEIN, A.J.; LEVIN, R.M. Objective assessment of the effect of caffeine on sperm motility and velocity. *Fert. Steril.*, 48(5):891-3, 1987.

- SAEID, J.M. & AL-SOUDI, K.A. Seasonal variation in semen characteristics of White Leghorn, New Hampshire and indigenous chickens in Iraq. **Dr. Poultry Sci.**, 16(2):97-102, 1975.
- SAEKI, Y. Crooked-necked spermatozoa in relation to low fertility in the artificial insemination of fowl. **Poultry Sci.**, 39(6):1354-61, 1950.
- SAMPSON, F.R. & WARREN, D.C. Density of suspension and morphology of sperm in relation to fertility in the fowl. **Poultry Sci.**, 18(4):301-7, 1939.
- SCHINDLER, H.; WEINSTEIN, S.; MOSES, E.; GABRIEL, I. The effect of various diluents and storage times on the fertilizing capacity of cock semen. **Poultry Sci.**, 34(5):1113-7, 1955.
- SCHOENFELD, C.; AMELAR, R.D.; DUBLIN, L. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. A preliminary report. **Fertil. Steril.**, 24:772, 1973.
- SCHOENFELD, C.; AMELAR, R.D.; DUBLIN, L. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. **Fertil. Steril.**, 26:158, 1975.
- SCHOFF, P.K. cAMP-dependent protein kinases in intact and disrupted rat epididymal sperm. **Diol. Reprod.** 26(suppl. 1):61a, 1982.
- SCHOFF, P.K. & LARDY, H.A. Dissimilar effects of caffeine and 8-bromocyclic AMP on bovine sperm metabolism. **Diol. Reprod.**, 34(suppl. 1):218, 1986.
- SCHOFF, P.K.; & LARDY, H.A. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, 37:1037-46, 1987.
- SEVINÇ, A.; TEKIN, N.; MUYAN, M. Some semen characters in Leghorn and New Hampshire cocks. **Anim. Breed. Abstr.**, 53(6)516, 1985.



- SEXTON, T.J. **A** new poultry semen extender 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. **Poultry Sci.**, 56(5):1443-6, 1977.
- SEXTON, T.J. **A** new poultry semen extender. 3. Effect of storage conditions on the fertilising capacity of chicken semen stored at 5°C. **Poultry Sci.**, 57(1):285-9, 1978.
- SIMPSON, A.M. & WHITE, I.G. Interrelationships between motility, cAMP, respiration and calcium uptake of ram and boar sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, 15:189-207, 1987.
- SOLLER, M.; SCHINDLER, H.; BORNSTEIN, S. Semen characteristics, failure of insemination and fertility in Cornish and White Rock males. **Poultry Sci.**, 44(2):424-32, 1965.
- STEINBERGER, A. & STEINBERGER, E. **Testicular development, structure and function.** Raven Press, New York, 1980. p.513-22.
- TAMBLYN, T.M. & FIRST, N.L. Caffeine-stimulated ATP-reactivated motility in a detergent-treated bovine sperm model. **Arch. Biochem. Biophys.**, 181:208-15, 1977.
- TASH, J.S. & MANN, T. Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in relation to motility and senescence of spermatozoa. **Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, 184:109-14, 1973.
- TASH, J.S. & MEANS, A.R. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. **Biol. Reprod.**, 28(1):75-104, 1983.
- TRAUB, A.I.; EARNSHAW, J.C.; BRANNIGAN, P.D.; THOMPSON, W. **A** critical assessment of the response to caffeine of human sperm motility. **Fert. Steril.**, 37(3):436-7, 1982.

TUBB, D.J.; KOPF, G.S.; GARBERS, D.L. The evaluation of sperm adenosine 3',5'-monophosphate concentrations by factors released from eggs requires calcium. **Biol. Reprod.**, 18:181-5, 1978.

TUBB, D.J.; KOPF, G.S.; GARBERS, D.L. Starfish and horseshoe crab egg factors cause elevations of cyclic nucleotide concentrations in spermatozoa from starfish and horseshoe crab. **J. Reprod. Fert.**, 56:539-42, 1979.

TURNER, E.A.de.; APARICIO,N.J.; TURNER,D.; SCHWARZSTEIN,L. Effect of two phosphodiesterase inhibitors, cyclic adenosine 3':5'- monophosphate, and a  $\beta$ -blocking agent on human sperm motility. **Fert. Steril.** 29(3):328-31, 1978.

VANTIENHOVEN, A. The metabolism of fowl sperm in different diluents. **J. Agric. Sci.**, 54(1):67-80, 1960.

VANWAMBEKE, F. The storage of fowl spermatozoa. I. Preliminary results with new diluents. **J. Reprod. Fert.**, 13:571-5, 1967.

VANWAMBEKE, F. The effect of an oxygenated storage medium on the fertilising capacity of fowl spermatozoa stored for different periods. In: INTERNATIONAL ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL INSEMINATION, 6, Paris, 1968. **Proceedings...** Paris, 1968. p.1645-7.

VANWAMBEKE, F. The effect of two insemination methods on the fertilising capacity of fowl semen stored for 24 and 48 hours. In: WORD'S POULTRY CONGRESS, 6, s.l., 1970. **Proceedings...** s.l., 1970. p.349-51.

VANWAMBEKE, F. Fertility and hatchability results with fowl spermatozoa stored in fresh or frozen-dried diluent. **Br. Poultry Sci.**, 13:179-83, 1972.

WARREN, D.C. & GISII, C.L. The value of artificial insemination on poultry breedingwork. **Poultry Sci.**, 22:108-17, 1943.

WATKINS, H.D.; KOPF, G.S.; GARBERS, D.L. Activation of sperm adenylate cyclase by factors associated with eggs. **Biol. Reprod.**, 19:890-4, 1978.

WEAKLEY, C.E. & SHAFFNER, C.S. The fertilizing capacity of diluted chicken semen. **Poultry Sci.**, 31(4):650-3, 1952.

WHEELER, R.S. A one-man technique for collecting cock semen. **Poultry Sci.**, 27(4):523-4, 1948.

WHEELER, N.C. & ANDREWS, F.N. The influence of season on semen production in the domestic fowl. **Poultry Sci. College Station**, 22(5):361-7, 1943.

WILSON, H.R.; WARNICK, A.C.; GUTIERREZ, J.H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. **Poultry Sci.**, 48(2):714-7, 1969.

WILWERTH, A.M. Hipotireoidismo e sua influência sobre a produção de sêmen no galo doméstico. **Arq. Esc. Sup. Vet. UREMG**, 5:34-43, 1952.

WISHART, G.J. The effect of continuous aeration on the fertility of fowl and turkey semen stored above 0°C. **Dril. Poultry Sci.**, 22:445-50, 1981.

WISHART, G.J. & ASHIZAWA, K. Regulation of the motility of fowl spermatozoa by calcium and cAMP. **J. Reprod. Fert.** 80:607-11, 1987.

WISHART, G.J. & PALMER, F.H. Correlations of the fertilizing ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. **Brit. Poultry Sci.**, 27(1):97-102, 1986.

YAMANE, J.; TSUKUNAGA, S.; TAKAHASHI, T. A basic principle of make-up of the dilutor for fowl semen. **Zootech. Vet.**, 17(5):523-7, 1962.

YANAGIMACHI, R. & USUI, N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, **89**:161-74, 1974.

YOUNG, L.G. & NELSON, L. Calcium ions and control of the motility of sea urchin spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **41**:371-8, 1974.



201-04  
22875/199