

QUALIDADE E CONSERVAÇÃO DE SÊMEN DE GALOS (*GALLUS GALLUS*) COM USO DE ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP-108).

Carlos Tadeu Bandeira de Lavor¹; Thalita Evangelista Bandeira²; Kalil Andrade Mubarac Romcy³; Ilana Carneiro Lisboa Magalhães⁴; Maria Izabel Florindo Guedes⁵.

¹Universidade Estadual do Ceará - UECE. tadeulavor@bol.com.br

²Universidade Cruzeiro do Sul – UNICSUL. thalita.eb@hotmail.com

³Universidade Estadual do Ceará - UECE. kakkd12@gmail.com

⁴Universidade Estadual do Ceará - UECE. ilanamagalhães@hotmail.com

⁵Universidade Estadual do Ceará - UECE. florinfgr@uol.com.br

Introdução

Burrows e Quinn (1937) desenvolveram o método de massagem abdominal e pressão na região da cloaca, para coletar sêmen de galos. Com a técnica de coletar sêmen de aves, o rápido manuseio e o transporte desse sêmen até as fêmeas permitiu flexibilidade da inseminação artificial e propiciou o desenvolvimento de procedimentos eficientes para preservar o sêmen de aves em condições “*in vitro*” por algumas horas (RUTZ et al., 2007).

Uma solução para os desafios de manejo é a utilização de técnicas de reprodução assistida, incluindo a preservação de espermatozoides juntamente com a inseminação artificial.

É extensiva a lista de diluidores, conservantes, e de protocolos diferentes usados para melhorar o desempenho do sêmen de diversas espécies de aves, tentando otimizar a produção de proteína animal para o consumo humano e também otimizar a preservação da diversidade de espécies ainda existentes. Dentre esses diluidores soma-se a água de coco que transformada em material pulverizado (água de coco em pó - ACP), mantida as propriedades fundamentais do líquido *in natura* com estabilidade e longevidade, pode ser empregada em processos biotecnológicos, substituindo produtos importados, quimicamente constituídos e com preços elevados (MOREIRA-NETO et al., 2009).

O objetivo desse trabalho foi fazer uso de ACP - 108 como meio de conservação desse sêmen para preservar as características de integridade da célula espermática por períodos maiores de tempo e melhorar a qualidade do sêmen ejaculado de galos obtido por estímulo mecânico através de massagem dorso abdominal.

Material e métodos

Local:

O trabalho foi executado na Universidade Estadual do Ceará, no campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará, em um galpão experimental com gaiolas de arame individuais medindo 60x60x80

cm, altura, profundidade e largura respectivamente.

Fase pré-experimental:

Foram adquiridos galos reprodutores (machos), após serem criados e recriados na granja de origem, dentro de padrões zootécnicos e de normas sanitárias exigidas pelo Ministério da Agricultura para granjas de multiplicação animal.

Aves:

Foram utilizados 30 galos machos reprodutores (*Gallus gallus*) da linhagem Agro-ross. A idade experimental dos galos ficou entre 29^a até a 40^a semana (12 semanas experimentais). Todos os galos foram alimentados com ração balanceada com 2700 kcal.kg⁻¹, 13% proteína, 1% de cálcio e 0,45% de fósforo. Os galos receberam estímulo luminoso apenas da luz solar que na região do experimento era equivalente a 12-13 horas diárias.

Colheita de sêmen:

Os machos foram previamente condicionados à produção (liberar ejaculado) de esperma por ação mecânica. A coleta experimental foi executada uma vez por semana.

O galo era retirado da gaiola, contido pelos pés por ferrolho (tranqueta corrediça) e colocado com seu peito apoiado em uma plataforma acoplada a uma cadeira, onde ficava o operador sentado. O galo era massageado na região dorsal e abdominal com movimentos crânio-caudais e em seguida era aplicada leve pressão com os dedos polegar e indicador da mão esquerda do operador, próximo à cloaca da ave, expondo-se o falo e a gota de sêmen sobre este. A gota de sêmen era então colhida mecanicamente pelo operador por aspiração. Para tal, usou-se um sistema de colheita de fechamento hermético que possuía uma pipeta numa das extremidades direcionada para o falo do galo, a qual entrava em contato com o sêmen sobre o falo da ave que era sugado até o depósito de colheita. Em outra extremidade, havia uma mangueira, que seguia até a boca do operador, que aspirava o ar do interior do tubo de colheita, promovendo um vácuo, o que provocava o transporte do sêmen para seu interior.

Foi colhido sêmen de 5 galos formando um o *pool* de ejaculados, evitando o efeito macho, pois a mistura era bem homogeneizada através da pipetagem. Todas as análises dos ejaculados foram realizadas entre 2 e 3 horas após a coleta.

Diluyente

A ACP foi testada quanto à esterilidade para microorganismos aeróbios, anaeróbios, fungos e determinação de proteínas solúveis de acordo com protocolo de esterilidade preconizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para obtenção de meios

diluentes/conservantes de sêmen, livres de patógenos.

Avaliação da qualidade do sêmen:

O protocolo para análise *in vitro* do sêmen com adição da ACP -108 como meio de conservação ocorreu utilizando-se o sêmen e ACP (v:v): sem estocar; estocado por 1 hora a 5 °C; estocado por 24 horas a 5 °C; estocado por 48 horas a 5 °C; estocado por 72 horas a 5 °C e; estocado por 96 horas a 5 °C.

Amostras de ejaculados de todos os itens acima foram analisadas pelos aspectos macro e microscópicos como volume, através de observação direta do tubo de colheita graduado; pH, através de medidor de pH portátil a partir de 7 amostras coletadas; osmolaridade (mOsm/Kg de H₂O), foi tomada através de osmômetro biológico de pressão com sêmen puro; concentração obtida a partir do *pool* de 5 galos, sendo seis coletas com cinco repetições totalizando 30 *pools*, contados em câmara de Neubauer, através de microscopia de luz (400x); a motilidade espermática, foi medida observando-se as amostras em microscópio óptico (400x) a partir de 15 *pools*; motilidade progressiva (0-5 sendo 0 para células totalmente imóveis e 5 para movimento em grupo) e; morfologia espermática, obtida através de esfregaços em lâminas corados com eosina-nigrosina de acordo com o método IV estabelecido por Lukaszewicz et al., (2008) e adaptado para pH e osmolaridade do sêmen dos galos do experimento. A partir de 5 *pools* foram confeccionadas e 6 lâminas (repetições) e em cada lâmina foram contados 100 células (5 x 6 x 100).

Análise estatística

Os dados estão apresentados com médias \pm desvio padrão para volume, pH, osmolaridade, concentração, motilidade espermática, motilidade progressiva (0-5) e morfologia espermática, utilizando-se ANOVA e testando a normalidade dos dados usando o teste de Tukey (ASSISTAT, 2011).

Resultados e discussão:

Imediatamente após a colheita de sêmen, avaliou-se o volume das amostras, estabelecendo-se o valor médio de $316,00 \pm 68,79 \mu\text{L}$, com faixa de variação de 150 a 450 μL , estando dentro do padrão de volume de 100-900 μL e 200-1500 μL encontrado em trabalhos de Etches, (1996) e Blesbois e Brillard, (2005) respectivamente, como também compartilha com dados da Russian Academy of Agricultural Science (2000) que recomenda como índice padrão o volume de ejaculado de galo entre 190 e 400 μL ; e ainda com o trabalho de Mal'tsev e Dymkov (2008) que encontraram em duas linhagens Russas de galos volume médio de 340-430 μL e 530-700 μL .

O pH, do sêmen foi analisado, apresentando valor médio de $8,41 \pm 0,28$, que é próximo do

valor máximo do pH de sêmen de galos que segundo Correia e Correia (1985) apresentam concentração de íons de hidrogênio (pH) entre 6,3 e 8,4; mais distante ficou a média de 7,04 encontrada segundo Wheeler e Andrews (1943) e também a média de 7,27 de acordo com Parker et al., (1942); média de 7,71 de amostras de sêmen não diluído segundo Parker e McDaniel (2006); Blanco et al., (2000) encontraram pH médio de 6,85; Zheng et al., (2007) encontraram pH médio de $7,02 \pm 0,06$ e $6,83 \pm 0,06$ em galos normais e em galos anões respectivamente.

Tabela 01: Média \pm desvio padrão do volume, pH, osmolaridade, concentração espermática, motilidade espermática (ME%) e motilidade progressiva (MP 0-5) de ejaculados frescos de galos (*Gallus gallus*).

Descrição	n	Médias \pm Desvio padrão	CV%
Volume do ejaculado (μ L)	25	316,00 \pm 68,79	21,77
pH do sêmen puro	07	8,41 \pm 0,28	3,37
Osmolaridade sêmen puro (mOsm/Kg de H ₂ O)	07	365,42 \pm 27,48	7,52
Concentração espermática ($\times 10^9$ spz/mL)	30	5,642 \pm 1,63	29,01
Motilidade espermática (%)	15	88,93 \pm 5,06	5,69
Motilidade progressiva (0-5)	15	4,46 \pm 0,35	7,87

A osmolaridade, apresentou média de $365,42 \pm 27,48$ mOsm/Kg. Sauveur (1992b) relata que o pH do sêmen com pequenos desvios é normalmente neutro, e a pressão osmótica (325 mOsm/L) que são estáveis no plasma seminal fresco de galos, mas existe variabilidade entre ejaculados e/ou entre galos; Blanco et al., (2000) encontraram 313 mOsm de média em galos; Latif et al., (2005) concluíram que um extensor experimental com 375 mOsm de pressão foi satisfatório e melhorou a capacidade fertilizadora dos espermatozoides de galo.

Clarke et al. (1982) relata que a diluição de sêmen de galo incrementa a motilidade espermática. Este incremento é possível devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes, como a frutose do BPSE (KAMAR e RISIK, 1972) e glicose (PARKER e McDANIEL, 2006).

Douard et al. (2005) encontraram em sêmen de perus estocados *in vitro*, decréscimo na motilidade quando estocados até 48 horas em temperatura de 4 °C. Penfold et al. (2001) analisaram o efeito do sêmen fresco de patos (*Anas acuta*), sem diluir e diluído em diluente comercial em duas temperaturas (4 e 24 °C) e verificaram os melhores índices de motilidade e motilidade progressiva em sêmen diluído à temperatura de 4 °C. Holm et al. (1998), usando 5 extensores, ajustando a concentração para 1 bilhão de espermatozoides/mL e o pH entre 5 e 9 analisaram a motilidade do sêmen de galos perus e codornas em temperaturas de 30 °C e 40 °C e concluíram que a alcalinização do pH incrementa a motilidade espermática nessas três espécies. Wishart e Wilson (1999), estudando a inibição da motilidade espermática pela dependência da temperatura em *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo*, *Anas platyrhynchos*, *Coturnix japônica* e *Chlamydotis undulata undulata*

encontraram o acréscimo de motilidade na presença NaCl (30 °C) e na presença de 5 mM de cálcio (40 °C), exceto na codorna que demonstrou inibição pelo cálcio.

Quando o sêmen é diluído excessivamente, ocorre um efeito de diluição e a motilidade dos espermatozoides é alterada (MANN, 1964). Fatores como a adenosina trifosfato (ATP), O₂ e as concentrações de íons seminais (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻) estão associadas com a motilidade espermática (WISHART, 1984; NEVO, 1965, THOMSON e WISHART, 1991). Froman e Feltmann (1998) atribuíram diferenças fenotípicas na motilidade de sêmen de galos para diferentes taxas de síntese de ATP mitocondrial.

Fatores que são conhecidos por impactos na motilidade do espermatozoide, tais como a troca gasosa, ATP e a utilização dos íons, também são alterados quando o sêmen é diluído (PARKER e Mc DANIEL, 2006). Parker e Mc Daniel (2006) relataram que sêmen puro recém ejaculado não tem O₂ livre, e ainda que o O₂ está amplamente disponível no diluente. Parker e Mc Daniel (2006) também relataram um incremento na motilidade quando os íons seminais foram utilizados pelos espermatozoides. Consequentemente o O₂ do diluente pode ter um impacto na utilização dos íons seminais pelo espermatozoide (PARKER e Mc DANIEL, 2007).

Inúmeros trabalhos são desenvolvidos, usando diluentes, para tentar estender, preservar e proteger o sêmen das aves, com uso dos mais variados diluidores e nesses experimentos muitas vezes se analisa o percentual de espermatozoides vivos, mortos e os defeitos mais recorrentes provocados pela adição dessas substâncias. A qualidade do sêmen é um fator importante que afeta a fertilidade. Há a necessidade de seleção de machos com base na capacidade de fertilização do sêmen (Mc DANIEL, 1995; DONOGHUE, 1999; MELLOR, 2001). A fecundação de ovos, em uma sequência cronológica de ovulação, na fêmea avícola depende da capacidade dessa fêmea armazenar células viáveis nas glândulas de estocagem espermática e suprir o infundíbulo com espermatozoides morfológicamente normais, os quais são capazes de migrar no oviduto até a região onde se encontram essas glândulas (BAKST et al., 1994)

A avaliação da estrutura morfológica e da integridade da membrana dos espermatozoides foi examinada, por um único operador, sendo os espermatozoides classificados como íntegros (89,54% ± 10,13) ou não íntegros (10,46%) diferenciando-os pelos defeitos relacionados: Defeito de cabeça (cabeça curvada 0,40% ± 1,32; macrocefalia 0,07% ± 0,36; acefalia 0,13% ± 0,57). Defeito de cauda (peça intermediária: espermatozoide desconjuntado 0,26% ± 0,73; peça principal: cauda cortada 0,73% ± 1,91; cauda enrolada 0,10% ± 0,54). Defeitos múltiplos (gota citoplasmática 7,33% ± 8,97; gota acrossômica 1,37% ± 1,47) como consta na Tabela 04 e Figura 01.

Tabela 04: Incidência (%) do aspecto normal e defeituoso da estrutura morfológica de espermatozoides de galos diluídos em ACP-108 em temperatura ambiente.

Morfologia	n	Média %	± Desvio padrão
• Espermatozoide normal	30	89,54	10,13
Defeito de cabeça			
• Cabeça curvada	30	0,40	1,32
• Macrocefalia	30	0,07	0,36
• Acefalia	30	0,13	0,57
Defeito de cauda			
Peça intermediária			
• Espermatozoide desconjuntado	30	0,26	0,73
Peça principal			
• Cauda cortada	30	0,73	1,91
• Cauda enrolada	30	0,10	0,54
Defeitos múltiplos			
• Gota citoplasmática	30	7,33	8,97
• Gota acrossomica	30	1,37	1,47
Total de defeitos	30	10,46	-

Tselutin et al. (1999), testaram in vitro a capacidade protetora do diluente LAKE sobre espermatozoides de galos, frente aos crioprotetores glicerol, dimetilacetamida - DMA e dimetilsulfoxido - DMSO em quatro concentrações diferentes concluindo que esse diluente não protege as células contra injúrias morfológicas a medida que se aumenta o nível do crioprotetor. Penfold et al., (2001) analisaram o percentual morfológico de espermatozoides de patos (*Anas acuta*) diluídos em BPSE, mantidos a 4 °C, a 24 °C e encontraram índices menores de células normais que os desse trabalho. Lukaszewicz et al., (2008), resolveram avaliar a eficácia da morfologia espermática de quatro linhagens de galos usando quatro diferentes métodos de coloração em esfregaços, para facilitar a prática diária de análise espermática antes da inseminação artificial. Esses autores utilizaram o sêmen puro adicionado aos corantes e obtiveram bons resultados (% morfológicos normais), mas não melhor que o desse experimento que adotou um dos quatro métodos deles, modificando apenas o uso do sêmen que ao invés de puro foi diluído em ACP-108. Malecki e Martin (2000); Du Plessis e Soley (2010) enfatizam a necessidade de análise da morfologia espermática em aves (trabalhos em produções comerciais de emu *Dromaius novaehollandiae*) com uso de técnicas simples porém confiáveis.

A osmolaridade do diluente está associada a mudanças morfológicas da estrutura espermática e variações desta podem apresentar-se durante o esfriamento do sêmen. O intervalo ideal para espermatozoides de aves está entre 250 a 460 mOsm Kg⁻¹ H₂O e se deve manter a temperatura de 5-7 °C (BAKST, 1990; ETCHES, 1996). Nesse trabalho se estabilizou a pressão osmótica da ACP-108 com margem a maior e a menor de 365,40 mOsm Kg⁻¹ H₂O (média de

osmolaridade do sêmen das aves desse experimento) e não foi atribuída mudança morfológica nos espermatozoides ao adicionar ACP-108 no sêmen.

Conclusões:

A ACP-108 adicionada ao sêmen de galo ainda fresco e após uma hora de resfriado mostrou bons índices de motilidade e motilidade progressiva. No entanto, após 24 horas e até 96 horas com o sêmen resfriado a 5 °C os índices declinaram.

A morfologia espermática normal apresentou bom índice percentual, mostrando que a membrana plasmática do espermatozoide foi preservada após a adição da ACP-108.

Referências Bibliográficas

ASSISTAT, Versão 7.6 beta 2011 Disponível em: <<http://www.assistat.com>> Silva, F. de A. S. e Azevedo, C. A. V. Acesso em mar. 2011.

BAKST, M. R. Preservation of avian cells. In Poultry Breeding and Genetics. p. 91–108 Ed. RD Crawford. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1990.

BAKST, M. R.; WISAHRT, G.; BRILLARD, J. P. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. Poultry Science Review, Amsterdam, v. 5, p. 117-143, 1994.

BLANCO, J. M.; GEE, G.; WILDT, D. E.; DONOGHUE, A. M. Species Variation in Osmotic, Cryoprotectant, and Cooling Rate Tolerance in Poultry, Eagle, and Peregrine Falcon Spermatozoa. Biology of Reproduction. 63: 1164-1171, 2000.

BLESBOIS, E.; BRILLARD, J. P. L'anatomie et la physiologie de l'appareil genital male des oiseaux. Chapitre 15 Partie 3 - La reproduction des oiseaux. In.: Reproduction des animaux d'élevage. Educagri éditions, Dijon-Fr. pp. 358-369, 2005.

BURROWS, W. H.; QUINN. J. P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. Poultry Science. 26: 19–24, 1937.

CLARKE, R. N.; SEXTON, T. J.; OTTINGER, M.A. Effect of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility, and fertility of chicken and turkey semen. Poultry Science, 61: 1912-1917, 1982.

CORREIA, A. A. D.; CORREIA, J. H. R. D. Bioquímica animal. 2. ed. Ed. Fundação Galouste Gulbenkian. Lisboa. 1985. 1254 p.

DONOGHUE, A. M. Prospective approaches to avoid flock fertility problems: Predictive assessment of sperm function traits in poultry. Poultry Science. 78: 437-443, 1999.

DOUARD, V.; HERMIER, D.; LABBE, C.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Role of seminal plasma in damage to turkey spermatozoa during *in vitro* storage Theriogenology. 63: 126-137, 2005.

DUMPALA, P. R.; PARKER, H. M.; Mc DANIEL, C. D. The effect of semen storage temperature and diluent type on the Sperm Quality Index of broiler breeder semen. International Journal of

Poultry Science. v. 5 n. 9 p. 838-845, 2006.

Du PLESSIS, L.; JOHN T.; SOLEY, J. T. Incidence, structure and morphological classification of abnormal sperm in the emu (*Dromaius novaehollandiae*) Theriogenology. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.021. 13 p, 2010.

ETCHES, R. J. The male. Chapter 8. In: Reproduction in Poultry. Cambridge: University Press, Oxon U. K. 1996. pp. 208-233.

FROMAN, D. P.; FELTMANN, A. J. Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Biology of Reproduction. 58, 376-384, 1998.

HOLM, L. Y.; WISHART, G. J. The effect of pH on the motility of spermatozoa from chicken, turkey and quail. Animal Reproduction Science. 54: 45-54, 1998.

HOWARTH, B. Preservation of the fertilizing capacity of cock semen incubated in vitro at 41°C. Poultry Science. 60: 1075-1078, 1981.

LATIF, A.; IJAZ, A.; ALEEM, M.; MAHMUD, A. Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm. Pakistan Veterinary Journal. 25 (4): 2005.

LUKASZEWICZ, E.; JERYSZ, A.; PARTYKA, A.; SIUDZINSKA, A. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different straining methods. Research in Veterinary Science. 85: 583-588, 2008.

KAMAR, G. A.; RISIK, M. A. Semen characteristics of two breeds of turkey. Journal of Reproductive Fertility. 29: 317-325, 1972.

MAL'TSEV, A. B.; DYMKOV, A. B. Use of cryopreserved rooster sperm in breeding. Russian Agricultural Science. v. 34, n. 2, p. 128-131, 2008.

MANN, T. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen & Co Ltd, London, 493 p, 1964.

MALECKI, I. A.; MARTIN, G. B. Emu farming. Reproductive technology. Publication n. 00/37. Project. N. UWA-39A. 2000. Disponível em: <<http://www.rirdc.gov.au>> Acesso em: mai, 2011.

McDANIEL, C. D.; BRAMWELL, R. K.; HOWARTH, B. Jr. 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. 74: (suplement 1), p. 71, 1995.

MELLOR, S. Selecting males by sperm quality. World Poultry 3, 32-34, 2001.

MOREIRA-NETO, J. J. S., GONDIM, J. O., RADDI, M. S. G., PANSANI, C. A. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. International Endodontic Journal. v. 42, n. 9, p. 827-830, 2009.

PARKER, H. M.; McDANIEL, C. D. The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange and ionic balance of broiler breeder sperm. Journal of Poultry Science. 85: 106-116, 2006.

- PARKER, H. M.; McDANIEL, C. D. Correlation of the sperm quality index with ATP utilization, gas exchange and ionic balance of broiler breeder semen. *International Journal of Poultry Science*. 6 (12) p. 928-932, 2007.
- PARKER, J. E.; MCKENZIE, F. F.; KEMPSTER, H. L. Fertility in the male domestic fowl. *Research Bulletin*. 347, 1-50, 1942.
- PENFOLD, L. M.; HARNAL, V.; LYNCH, W.; BIRD, D.; DERRICKSON, S. R.; WILDT, D. E. Characterization of Northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. *Journal of Reproduction and Fertility*. 121: p. 267-275, 2001.
- RUSSIAN ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES. *Voprosy iskusstvennogo osemneniya domashnei ptsity. Metodicheskie rekomendatsii (Problems of Artificial Insemination of Domestic Poultry. Methodological Recommendations)*. St.-Peterburg-Pushkin, 2000.
- RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 307-317, 2007.
- SAUVEUR, B., Appareil génital masculin et production de spermatozoïdes. Chapitre VII. En: *La Reproduction des Volailles et Production d'œufs*. INRA, Paris, France. p. 191 – 237, 1992.
- THOMSON, M.F. AND G.J. WISHART. Temperaturemediated regulation of calcium flux and motility in fowl spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 93: 385-391, 1991.
- TSELUTIN K, SEIGNEURIN F Y BLESBOIS E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*. 78: 586-590, 1999.
- WHEELER, N. C.; ANDREWS, F. N. The influence of season on semen production in the domestic fowl. *Poultry Science*. 22: 361, 1943.
- WISHART, G. J. The effect of anoxia on fowl spermatozoa: recovery of fertilizing ability, motility and cellular concentrations of potassium and ATP. *Gamete Research*., 10: 83-89, 1984.
- WISHART, G. J.; WILSON, Y. I. Temperature-dependent inhibition of motility in spermatozoa from different avian species. *Animal Reproduction Science*. 57: 229-235, 1999.
- ZHENG, J. X.; LIU, Z. Z.; YANG, N. Deficiency of growth hormone receptor does not affect male reproduction in dwarf chickens. *Poultry Science*. 86: 112-117, 2007.