



Avanços aplicados à reprodução de aves domésticas e silvestres

Progress towards reproduction of domestic and wild birds

Gabriel A. Novaes, Marcel H. Blank, Ricardo J. G. Pereira[‡]

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Resumo

Técnicas reprodutivas em aves de produção e silvestres possuem objetivos e desafios distintos, visto que um nicho visa resultados econômicos enquanto o outro almeja a conservação de espécies raras e ameaçadas. Por essa razão, as biotecnologias desenvolvidas e empregadas na avicultura industrial buscam melhorar a performance reprodutiva de linhas puras, bisavós, avós e matrizes (p.e. fertilidade, produção de ovos, eclodibilidade, etc.), além de métodos operáveis em larga escala para avaliação de reprodutores (ambos machos e fêmeas) e incubação de ovos. Em contraste, a principal meta daqueles que trabalham com aves selvagens é a formação e utilização de bancos de germoplasma, dado que aproximadamente 12% de todas as espécies aviárias do mundo encontram-se atualmente ameaçadas de extinção. Considerando ambos cenários, o objetivo deste trabalho foi descrever alguns dos principais desafios e avanços relacionados a reprodução de aves domésticas e selvagens, de aspectos pretensamente mais conhecidos como a coleta e análise seminal ou manejo de ovos em incubatórios industriais, até métodos mais inovadores como transplantes interespecíficos de células germinativas e transplantes de tecido ovariano.

Palavras-chave: aves, reprodução, biotécnicas, avicultura industrial, preservação.

Abstract

Reproductive techniques applied to poultry and wild birds have very different goals and challenges as one niche aims economical benefits while the other seeks to conserve rare and endangered species. Therefore, the development and application of biotechnologies in poultry industry strive to improve reproductive performance of pure lines, great grandparents, grandparents and parents (e.g. fertility, egg production, hatchability, etc.), in addition to feasible methods for large-scale operations with regard to breeders' assessment (both males and females) and egg incubation. Conversely, the ultimate goal of those who work with wild birds is the development and use of germplasm banks since about 12% of the bird species worldwide are considered endangered. Taking both scenarios into consideration, we attempted to outline some challenges and advances in breeding domestic and wild birds, from supposedly well-known aspects such as semen collection and analysis or egg incubation, to more innovative techniques such germ cell and tissue transplantation.

Keywords: Broiler breeding, biotechnology, poultry industry, bird preservation.

Introdução

As biotecnologias da reprodução são definidas como um conjunto de ferramentas utilizadas para maximizar o sucesso reprodutivo de uma espécie, seja ela doméstica ou selvagem (Hafez, 2004). As técnicas de reprodução assistida empregadas em aves, abrangem desde técnicas mais complexas e elaboradas tais como criopreservação de sêmen, manipulação de células e tecidos germinativos e sexagem *in ovo* de embriões, até técnicas mais simples como o controle do fotoperíodo (Tselutin et al., 1999; Peixoto, 2010; Silversides et al., 2012; Bongalhardo, 2013; Galli et al., 2016; Nakamura et al., 2016; Ribeiro, 2017; Galli et al., 2018; Lewis et al., 2010). Indiscutivelmente, as biotécnicas foram inicialmente desenvolvidas e empregadas em larga escala para espécies domésticas, devido ao interesse econômico envolvido na reprodução destes animais. Entretanto, os resultados obtidos com estas biotecnologias constituem um excelente modelo para sua utilização em aves silvestres, considerando sempre as particularidades anatômicas e fisiológicas. Independente da espécie, o sucesso reprodutivo advém do número de ovos produzidos pela fêmea, do sucesso na fertilização dos ovos pelo macho e dos cuidados dedicados ao manejo dos ovos para sobrevivência dos embriões (Ordas et al., 2015). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi discutir os principais avanços e desafios da reprodução assistida de aves domésticas e silvestres, com ênfase nas técnicas de manejo reprodutivo e nas biotecnologias aplicadas ao macho, à fêmea e ao manejo dos ovos nos incubatórios.

Avanços e desafios relacionados à reprodução de aves domésticas

Na avicultura industrial, algumas formas de se avaliar o desempenho reprodutivo e a qualidade dos reprodutores são número de ovos e pintinhos produzidos, capacidade fecundante dos espermatozoides,

[‡]Correspondência: ricpereira@usp.br

Recebido: 11 de dezembro de 2018

Aceito: 25 de abril de 2019

sobrevivência dos embriões durante o período de incubação, entre outros (Ordas et al., 2015). Contudo, o envelhecimento exerce efeitos negativos na produção e aptidão das aves, sendo frequentemente correlacionadas com alterações nos padrões hormonais (Avital-Cohen et al., 2013), queda da qualidade do sêmen (Khan et al., 2012), redução de comportamentos sexuais (Mauldin, 1992), aumento do peso corporal e lesões musculoesqueléticas, assim como, queda na produção de ovos (Hocking; Duff, 1989; Robinson et al., 1991). Dessa maneira, técnicas de manejo têm sido aplicadas com o intuito de contornar tais problemas. Por exemplo, em matrizes pesadas a introdução de machos jovens em lotes com mais de 45 semanas é utilizada com o intuito de contornar os supostos efeitos do tempo de serviço (técnica conhecida como *'spiking'*), induzindo nos machos velhos a competição pelas fêmeas e a retomada do comportamento reprodutivo. Segundo Casanovas (2002), a introdução de outros machos interrompe a hierarquia estabelecida, causando um aumento na libido e no comportamento sexual. Mais recentemente alguns autores propuseram a realização do *'interspiking'* duplo, técnica que troca de 25-30% dos machos de um galpão para outro da mesma granja e do mesmo lote, em dois momentos diferentes (40 e 48 semanas de idade). Tal medida aparentemente aumenta a fertilidade dos machos submetidos ao *'interspiking'* duplo, no entanto nem a produção nem a eclodibilidade dos ovos foram afetadas por esta técnica de manejo (Chung et al., 2012).

Os principais parâmetros rotineiramente calculados para prever a performance reprodutiva de matrizes estão relacionados às fêmeas, dada a facilidade de se monitorar a produção de ovos (Wolc et al., 2009). No entanto, esta metodologia despreza componentes importantes na produção de ovos férteis tais como a capacidade reprodutiva de machos e a interação entre machos-fêmeas. Segundo Donoghue (1999), a qualidade do sêmen é um fator determinante para a manutenção da fertilidade do lote, portanto o emprego de análises seminais para a seleção de bons reprodutores é vital para a produção de pintinhos. Neste sentido, diversos parâmetros podem ser utilizados para avaliar a qualidade e a função dos espermatozoides incluindo métodos tradicionais como concentração, motilidade e morfologia, além de testes espermáticos funcionais (viabilidade, metabolismo, peroxidação lipídica, etc.) (Bakst e Cecil, 1997). Todavia, boa parte das técnicas utilizadas para avaliação do sêmen são laboriosas, demandam tempo e pessoas especializadas, ou exigem equipamentos caros, circunstâncias que inviabilizam sua aplicação na rotina industrial (Donoghue, 1999). Com o intuito de tornar algumas análises funcionais mais acessíveis a técnicos em matizeiros e avozeiros, Rui et al. (2017) validaram técnicas simples para análise de fragmentação de DNA, integridade acrossomal e atividade mitocondrial em espermatozoides de galos (Fig. 1).

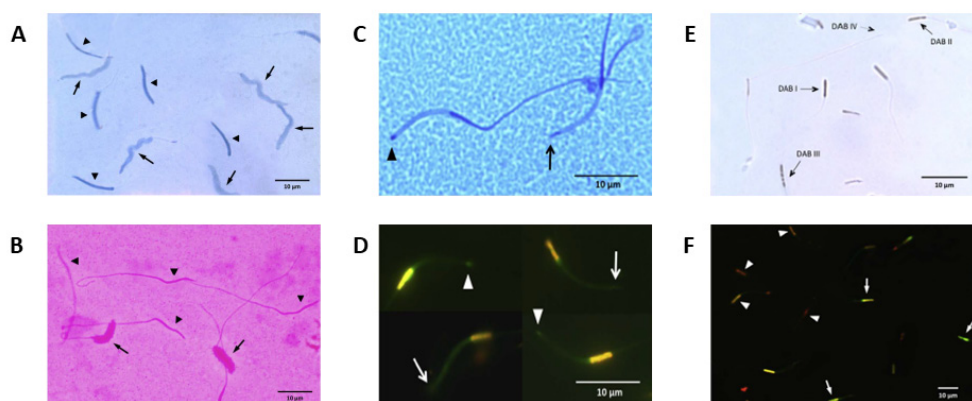


Figura 1. Técnicas para análise do sêmen de galos domésticos. (A) Fotomicrografia da integridade do DNA espermático acessado por Azul de Toluidina, onde os espermatozoides com DNA íntegro apresentam-se com a cabeça corada de azul claro (setas) e aqueles com DNA fragmentado coram-se de azul escuro (ponta de seta). (B) Integridade do DNA espermático acessado pela sonda SCD, onde os espermatozoides com DNA íntegro apresentam um grande ou médio halo de dispersão da cromatina ao redor da cabeça (seta) e aqueles com DNA fragmentado não apresentam ou apresentam um pequeno halo (ponta de seta). (C) Integridade acrossomal acessada por FG-RB, onde o acrossomo intacto dos espermatozoides coram-se de azul e apresentam-se com o formato cônico (seta), enquanto o acrossomo lesionado apresenta-se com o formato arredondado (ponta de seta). (D) Integridade acrossomal acessada pela sonda FITC-PSA, onde o acrossomo dos espermatozoides reagidos apresentam fluorescência (ponta de seta) e aqueles intactos não apresentam fluorescência (setas). (E) Atividade mitocondrial acessada por DAB, onde as categorias DAB I, II, III e IV apresentam 100%, mais de 50%, menos de 50% e 0% de mitocôndrias ativas, respectivamente. (F) Potencial de membrana mitocondrial (MMP) acessado pela sonda JC-1, onde os espermatozoides com alta e baixa MMP apresentam-se com fluorescência vermelho-alaranjada (ponta de seta) e verde (setas), respectivamente. Micrografias extraídas de Rui et al. (2017).

Após a adequada seleção de machos e fêmeas reprodutoras, o próximo desafio na produção de pintinhos

refere-se à incubação dos ovos. O sucesso em incubatórios industriais depende de uma conjunção de fatores que vão do controle e monitoramento das diversas condições de incubação (temperatura, umidade, viragem, ventilação, etc.) e da automação de diferentes processos (seleção, desinfecção, vacinação de ovos, entre outros), à constante preocupação com aspectos sanitários (Cobb, 2008; Leksrisompong et al., 2007). O ovo é uma estrutura que comporta aproximadamente 30.000-60.000 células vivas na oviposição e seu armazenamento por períodos superiores a 3-4 dias ou em condições inadequadas podem levar à queda da viabilidade embrionária ou perdas na qualidade dos pintinhos (Aviagen, 2014). Isto porque a estocagem prolongada dos ovos supostamente induz o estresse embrionário (manifestado por uma maior mortalidade das células embrionárias por necrose e apoptose) e a diminuição do metabolismo embrionário (Dymond et al., 2013). Visando mitigar esses efeitos da estocagem prolongada, incubatórios industriais tem aplicado a metodologia de incubação dos ovos por curtos períodos de tempo durante a armazenagem (SPIDES, do inglês Short Periods of Incubation During Egg Storage). O SPIDES consiste na incubação dos ovos até que a temperatura da casca alcance entre 32.0-38.3°C, condição que dependendo da máquina utilizada pode levar entre 2-8 horas de incubação (Aviagen, 2014). Os resultados obtidos com essa ferramenta comprovam a manutenção da eclobilidade de ovos armazenados de 7 a 14 dias, por mecanismos que envolvem possivelmente o resgate de células que morreriam durante a estocagem dos ovos ou o desenvolvimento embrionário a estágios mais resistentes às condições do armazenamento.

Outro problema da avicultura industrial que vem sendo intensivamente pesquisado relaciona-se ao descarte de machos de linhagens leves (Galli et al., 2017; Galli et al., 2018). Estima-se que são abatidos aproximadamente 370 milhões de machos de linhagem leve na América do Norte e 420 milhões na Europa a cada ano (Turner, 2010). Desse modo, a determinação do sexo de aves ainda no estágio embrionário apresenta-se como uma alternativa interessante para contornar a polêmica relativa sobre o abate em massa de pintinhos machos de postura. Atualmente dois métodos estão sendo estudados para sexagem *in ovo*: um óptico e outro não-óptico. Os métodos ópticos, por exemplo espectroscopia Raman (Harz et al., 2008) e espectroscopia de absorção de infravermelho de Fourier (Steiner et al., 2010) baseiam-se nas diferenças existentes entre o DNA de machos e fêmeas, e possuem as vantagens de serem pouco invasivos e disponibilizarem os resultados em tempo real (diferente das ferramentas químicas e genéticas que necessitam da coleta de amostras e da espera dos resultados laboratoriais) (Clinton et al., 2016; Galli et al., 2017). A espectroscopia Raman associada à fluorescência próxima ao infravermelho é empregada no quarto dia de incubação e garante uma sexagem precisa *in ovo* (acima de 90%) baseado na diferença do DNA de hemácias. No entanto, embora a luz não cause nenhum dano ao embrião, a necessidade de realizar uma janela na casca do ovo para acesso da circulação embrionária ocasiona uma redução na taxa de eclosão. No entanto, em estudo recente Galli et al. (2018) demonstraram que a espectroscopia pode ser realizada em vasos extraembrionários, mantendo a casca do ovo e suas membranas intactas. Já a espectroscopia de Fourier (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) constitui outra técnica óptica de sexagem *in ovo* que pode ser empregada inclusive em ovos não incubados (Steiner et al., 2011). A desvantagem desta técnica consiste na obrigatoriedade de realização da janela na casca do ovo.

Avanços e desafios relacionados à reprodução de aves silvestres

O fotoperíodo constitui um fator determinante na reprodução de aves domésticas e silvestres, sendo o estímulo externo de maior influência nas alterações do ritmo circadiano e o conseqüente início da estação reprodutiva (Pollock e Orosz, 2002; Pereira, 2014). Sabendo que variações do fotoperíodo são essenciais para a atividade reprodutiva das aves, uma ferramenta amplamente utilizada pela indústria avícola são os programas de luz, cujos resultados sobre a performance reprodutiva são relatados há décadas (Hall, 1946; Wilson et al., 1962; Leeson; Summers, 1988; Lewis; Goes, 2006; Lewis et al., 2010). No entanto, poucos zoológicos e criadores relatam o emprego de programas de luz na reprodução de aves selvagens, um hiato alarmante sob o ponto de vista técnico na propagação dessas espécies. Objetivando a melhor compreensão dessa metodologia em aves silvestres, Ribeiro (2017) analisou os efeitos de um programa de luz artificial sobre a endocrinologia e comportamento reprodutivos de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Seus achados demonstraram que o controle do fotoperíodo alterou os padrões hormonais de machos e fêmeas, levando o aumento no número de pareamentos, postura de ovos (férteis e inférteis), e nascimentos de filhotes (Fig. 2). Além disso, uma falha no equipamento de controle do fotoperíodo, demonstrou que mecanismo possivelmente é capaz de induzir estações fora de época ou até mesmo duas estações no ano. Esses resultados são similares aos de outros estudos com passeriformes (Dixit e Singh, 2011; Dixit e Sougrakpam, 2013), fato que reforça a potencial aplicação dos programas de luz em diversas espécies de aves selvagens. Porém, uma particularidade fisiológica das aves que deve ser levada em consideração é a fotorrefratariedade, condição em que o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal deixa de responder às elevações do comprimento do dia que eram inicialmente estimulatórias (Pereira, 2014). Apesar de ser importante para assegurar que a atividade reprodutiva em aves selvagens ocorrerão somente em épocas propícias para a sobrevivência da prole, este fenômeno pode levar a limitações na aplicabilidade dos programas de luz (Nicholls et al., 1988). Para contornar esta situação, injeções ou implantes hormonais podem ser utilizados em indivíduos não responsivos às alterações do fotoperíodo, como a aplicação de GnRH que pode trazer resultados variados dependendo da espécie e do protocolo (Jawor et al., 2006; Robbe et al., 2008; Constantini et al., 2009; Elnagar, 2009).

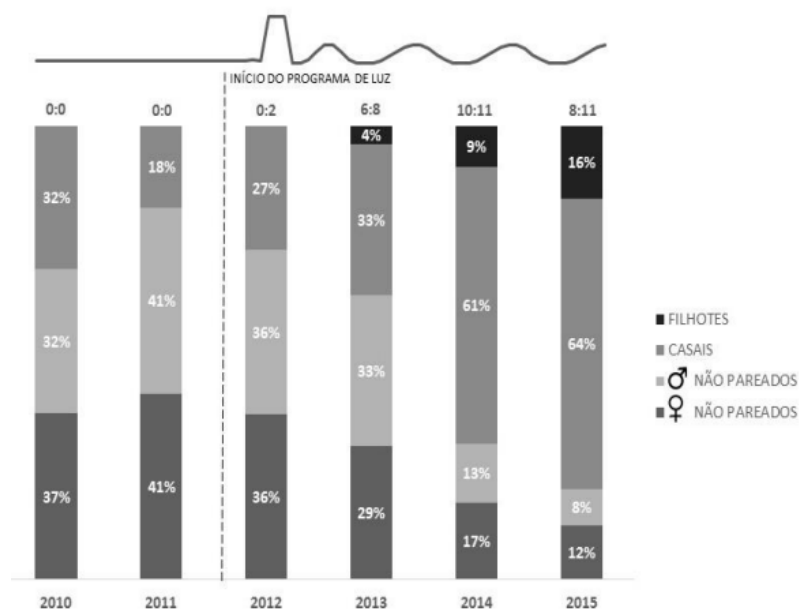


Figura 2. Perfil do comportamento reprodutivo de pinguins-de-magalhães submetidos ao controle do fotoperíodo. A linha acima do gráfico representa as oscilações do comprimento do dia ao longo do experimento. Os valores acima das colunas apresentam o número de ovos férteis em relação ao total de ovos nas temporadas reprodutivas de cada ano. Dados e gráficos extraídos de Ribeiro (2017).

Outro problema comumente enfrentado por programas de reprodução de aves selvagens *ex situ* é a alta proporção de ovos inférteis, fato que pode ser atribuído a não interação entre macho e fêmea, in experiência do casal, ou até mesmo subfertilidade ou infertilidade do macho. Neste último caso a análise minuciosa do sêmen é uma opção interessante pois permite a identificação e exclusão de indivíduos inférteis ou subférteis, bem como a seleção de machos com qualidade de sêmen superiores para sua utilização em programas de reprodução assistida (Lierz et al., 2013). Porém, um grande limitante para a aplicação de ambos, inseminação artificial e criopreservação de sêmen, na reprodução de aves selvagens é a obtenção de amostras seminais de boa qualidade. Neste sentido, três métodos são atualmente empregados para a coleta em aves selvagens: coleta cooperativa, massagem manual e eletroejaculação (Gee et al., 2004; Blanco et al., 2009). A coleta cooperativa depende do uso de machos criados na mão (conhecidos como *'imprintados'*, adequação do inglês *'imprinted'*), que por manterem uma relação estreita com os seres humanos, os reconhecem como parceiros sexuais (Pereira, 2014; Blanco et al., 2009). Esta técnica possui as vantagens de não causar estresse nem injúrias ao animal (pois não envolve contenção física) gerar um sêmen de excelente qualidade livre da contaminação por urina e fezes, mas demanda um manejo constante dos indivíduos exigindo uma grande mão-de-obra (Dhama et al., 2014). Já a massagem manual, primeiramente descrita em galos por Burrows e Quinn (1937), consiste na massagem rítmica e concomitante do abdômen e do ventre do animal, resultando em reflexo ejaculatório, representado pela elevação da cauda e intumescimento do falo. A maior vantagem desta técnica está na possibilidade de utilização em machos reprodutivamente ativos não necessariamente criados na mão, e sua maior desvantagem é a necessidade de condicionamento prévio, o que muitas vezes é dificultoso em aves silvestres (Paranzini et al., 2018). A eletroejaculação, apesar de comumente utilizada em mamíferos, não é frequente em aves em virtude de seus inconvenientes do alto grau de contaminação das amostras, sendo descrita apenas em Anseriformes, Columbiformes e Psitaciformes (Blanco et al., 2009; Gee e Temple, 1978; Gee et al., 2004; Bublat et al., 2017). Porém, alguns trabalhos recentes envolvendo psitaciformes descrevem uma técnica menos impactante que não inclui a contenção química (Lierz et al., 2013; Fisher et al., 2014). A vantagem desse método consiste na possibilidade de utilização em aves silvestres sem condicionamento prévio. Nosso grupo de pesquisa recentemente testou a eficácia da eletroejaculação em diversas ordens de aves (psitaciformes, piciformes, galiformes, anseriformes, accipitriformes, strigiformes e cathartiformes), e obteve êxito na coleta de sêmen de um grande número de espécies (Fig. 3 – Frediani, 2017; Frediani et al., 2019). Nossas taxas de sucesso variaram de 8.3% a 50% dependendo da espécie, índices que confirmam a aplicabilidade de nosso protocolo em diferentes grupos de aves.

Outro aspecto fundamental em um programa de conservação *ex situ* é a formação de bancos de germoplasma, entretanto a ocorrência de ovos megalócitos (ou seja, com muito vitelo) nas aves limita o armazenamento de material apenas para machos (sêmen), um grande viés genético na manutenção de populações viáveis (Hagedorn, 2006; Long, 2006; Blesbois, 2011; Ehling et al., 2012; Silversides e Liu, 2012). Além disso, a criopreservação de sêmen de aves selvagens apresenta, muitas vezes, resultados insatisfatórios, situação que levou

pesquisadores a investigar o uso de técnicas alternativas, como a manipulação e transplante de células germinativas (PGCs, SSCs, etc.) (Russel e Griswold, 2000; Dobrinski, 2008; Silversides et al., 2012; Nakamura et al., 2013; Nakamura, 2016). O princípio dessa abordagem é produzir aves quiméricas (ou seja, aves formadas por dois tipos de células geneticamente distintas) que sejam capazes de gerar filhotes da espécie de interesse (Blesbois, 2007; Petite et al., 2004; Lavial e Pain, 2010). A produção de filhotes após o uso de transplantes interespecíficos (xenotransplantes) de células do blastoderma ou primordiais em embriões receptores de galinha já foi demonstrada tendo como espécies doadoras patos-reais (*Anus platyrhynchos*), faisões-comuns (*Phasianus colchicus*) e abetardas (*Chlamydotis undulata*) (Li et al., 2002; Kang et al., 2009; Wernery et al., 2010). Por essa razão, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de SSCs provenientes de machos adultos em transplantes interespecíficos entre codornas e galos. Nossos estudos demonstram essas células não apenas colonizam os túbulos seminíferos dos receptores, como também possuem a habilidade de produzir espermatozoides (Pereira et al., 2013). Essa metodologia amplia as opções de material a serem resgatados de aves ameaçadas inclusive de indivíduos post-mortem (p.e. coleta de testículos de embriões machos, machos adultos). Outra possibilidade para preservação de material genético de fêmeas de aves é a criopreservação e posterior enxertia de tecidos ovarianos (Silversides e Liu, 2012). Liu et al. (2010) e Liu et al. (2013) obtiveram sucesso no transplante de tecido ovariano criopreservado entre codornas, relatando inclusive crias descendentes da ave doadora. Song e Silversides (2008) transplantaram ortotopicamente tecido ovariano criopreservado entre galinhas e, além de obter sucesso no transplante, demonstraram que a ave receptora continuou gerando descendentes da doadora mesmo após 18 meses do procedimento cirúrgico. Estes resultados abrem caminho para o estudo da utilização de xenotransplantes ovarianos, visto que esta técnica associada à criopreservação de sêmen e posterior inseminação artificial pode representar um grande avanço na reprodução assistida de espécies em risco iminente de extinção.

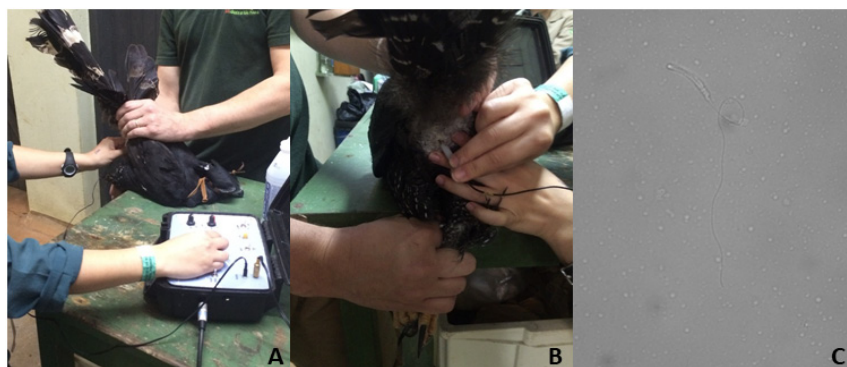


Figura 3. Fotos ilustrativas do método de eletroejaculação em macho adulto de gavião-pegamaco (*Spizaetus tyrannus*). (A) Representação da contenção física do animal. (B) Detalhe do posicionamento da probe na cloaca para a realização da eletroestimulação. (C) Fotomicrografia do espermatozoide de gavião-pegamaco, evidenciando o acrossomo, a peça intermediária e o flagelo. (Fotos Mayra H. Frediani).

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do GEMA (Grupo de Estudos para Multiplicação de Aves – FMVZ – USP) e aos diversos parceiros de pesquisa: Aviagen América Latina Ltda, Fundação Zoológico de São Paulo, CRAX Sociedade de Pesquisa em Fauna Silvestre, e Laboratório de Andrologia da FMVZ-USP. Agradecemos à FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro a nossos projetos de pesquisa.

Referências

- AVIAGEN.** How to Improve Hatchability Stored Eggs. 2014, 8p. Disponível em: <http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/09HowTo9ImproveHatchabilityStoredEggs-PT.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2018.
- Avital-Cohen N, Heiblum R, Argov-Argaman N, Rosenstrauch A, Chaiseha Y, Mobarkey N, Rozenboim I.** Agerelated Changes in Gonadal and Serotonergic Axes of Broiler Breeder Roosters. *Domest Anim Endocrinol*, v.44, n.3, p.145-150, 2013.
- Bakst MR, Cecil HC.** Techniques for Semen Evaluation, Semen Storage, and Fertility Determination, 2nd ed. *Poult Sci Assoc*, 1997.
- Blanco JM, Wildt DE, Höfle U, Voelker W, Donoghue AM.** Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, v.71, n.1, p.200-213, 2009.
- Blesbois E.** Current status in avian semen cryopreservation. *Poult Sci*, v.63, p.213-222, 2007.



- Blesbois E.** Gamètes et fécondation chez les oiseaux. *INRA Prod Anim*, v.24, p.259-272, 2011.
- Bongalharo DC.** Produção e Preservação do Sêmen de Galos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.37, n.2, p.131-135, 2013.
- Bublat A, Fischer D, Bruslund S, Schneider H, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M.** Seasonal and genera-specific variations in semen availability and semen characteristics in large parrots. *Theriogenology*, v.91, p.82-89, 2017.
- Burrows WH, Quinn JP.** The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult Sci*, v.16, n.1, p.19-24, 1937.
- Casanovas P.** Management techniques to improve male mating activity and compensate for the age-related decline in broiler breeder fertility: Intra-spiking. *The Poultry Informed Professional*, v.63, p.1-9, 2002.
- COBB.** Guia de Manejo de Incubação da Cobb-Vantress, São Paulo: Cobb-Vantress, 2008. 46p.
- Costantini, V, Carraro C, Bucci F; Simontacchi C, Lacalandra G, Minoia P.** Influence of a new slow-release GnRH analogue implant on reproduction in the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*, Shaw 1805). *Anim Reprod sci*, v.111, n.2, p.289-301, 2009.
- Chung KM, Smith MO, Kattesh HG.** The influence of double interspiking on production and behavior in broiler breeder flocks in elevated temperature conditions. *J Appl Poult Res*, v.21, n.1, p. 63-69, 2012.
- Clinton M, Nandi S, Zhao D, Olson S, Peterson P, Burdon T, McBride D.** Real-Time Sexing of Chicken Embryos and Compatibility with in ovo Protocols. *Sex Dev*, v.10, n.4, p.210-216, 2016.
- Dhama K, Singh R, Karthik K, Chakraborty, Tiwari R, Wani M, Mohan J.** Artificial insemination in poultry and possible transmission of infectious pathogens: A review. *Asian J Anim Vet Adv*, v.9, n.4, p.211-228, 2014.
- Dymond J, Vinyard B, Nicholson AD, French NA, Bakst MR.** Short periods of incubation during egg storage increase hatchability and chick quality in long-stored broiler eggs. *Poult Sci*, v.92, n.11, p.2977-2987, 2013.
- Dixit AS, Singh NS.** Photoperiod as a proximate factor in control of seasonality in the subtropical male Tree Sparrow, *Passer montanus*. *Front Zool*, v.8, n.1, p.1, 2011.
- Dixit AS, Sougrakpam R.** Photoperiodic regulation of seasonal reproduction, molt and body weight in the migratory male yellow-breasted bunting (*Emberiza aureola*). *Anim Reprod Sci*, v.141, n.1-2, p.98-108, 2013.
- Dobrinski I.** Male germ cell transplantation. *Reprod Domestic Anim*, v.43, p.288-294, 2008.
- Donoghue AM.** Prospective approaches to avoid flock fertility problems: predictive assessment of sperm function traits in poultry. *Poult Sci*, v.78, p.437-443, 1999.
- Elnagar SA.** Response of Alexandria cockerels reproductive status to GnRH (Receptal) injection. *Int J Poul Sci*, v.8, n.3, p.242-246, 2009.
- Ehling C, Taylor U, Baulain U, Weigend S, Henning M, Rat D.** Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agric Forest Res*, v.62, p.151-158, 2012.
- Fischer D, Neumann D, Purchase C, Bouts T, Meinecke-Tillmann S, Wehrend A, Lierz M.** The Use of Semen Evaluation and Assisted Reproduction in Spix's Macaws in Terms of Species Conservation. *Zoo Biol*, v.33, p.234-244, 2014.
- Frediani MH.** Avaliação da técnica de eletroestimulação para colheita de sêmen em diversas ordens de aves, 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- Frediani MH, Guida FJ, Salgado PA, Gonçalves DR, Blank MH, Novaes GA, Pereira RJ.** Semen collection by electro-stimulation in a variety of bird orders. *Theriogenology*, v.125, p.140-151, 2019.
- Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Steiner G.** In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy. *Anal Chem*, v.88, n.17, p.8657-8663, 2016.
- Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, Steiner G.** In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, v.409, n.5, p.1185-1194, 2017.
- Galli R, Preusse G, Schnabel C, Bartels T, Cramer K, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, Steiner G.** Sexing of Chicken Eggs by Fluorescence and Raman Spectroscopy Through the Shell Membrane. *Plos One*, v.13, n.2, p.1-14, 2018.
- Gee GF, Temple SA.** Artificial insemination for breeding non-domestic birds. *Symposia of the Zoological Society of London*, v.43, p.51-72, 1978.
- Gee GF, Bertschinger H, Donoghue AM, Blanco J, Soley J.** Reproduction in Nondomestic Birds: Physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. *Avian Poul Biol Rev*, v.15, p.47-101, 2004.
- Hafez ESE, Hafez B.** Reprodução Animal. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.
- Hagedorn M.** Avian genetic resource banking: Can fish embryos yield any clues for bird embryos? *Poult Sci*, v.85, p.251-254, 2006.
- Hall, GO.** The artificial control of egg production. *Poult Sci*, v.25, n.1, p.3-12, 1946.
- Harz M, Krause M, Bartels T, Cramer K, Rosch P, Popp J.** Minimal invasive gender determination of birds by means of UV-resonance Raman spectroscopy. *Anal Chem*, v.80, n.4, p.1080-1086, 2008.
- Hocking PM, Duff SRI.** Musculo-Skeletal Lesions in Adult Male Broiler Breeder Fowls and their Relationships with Body Weight and Fertility at 60 Weeks of Age. *Brit Poult Sci*, v.30, n.4, p.777-784, 1989.
- Jawor JM, Mcglathlin JW, Casto JM, Greives TJ, Snajdr EA, Bentley GE, Ketterson ED.** Seasonal and individual variation in response to GnRH challenge in male dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *Gen Comp Endocrinol*, v.149, n.2, p.182-189, 2006.
- Kang SJ, Choi JW, Park KJ, Lee YM, Kim TM, Sohn SH, Lim JM, Han JY.** Development of a pheasant



- interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: effect of donor cell sex, on chimeric semen production. *Theriogenology*, v.72, p.519-527, 2009.
- Khan RU, Laudadio V, Tufarelli V.** Semen Traits and Seminal Plasma Biochemical Parameters in White Leghorn Layer Breeders. *Reprod Domest Anim*, v.47, n.2, p.190-195, 2012.
- Lavial F, Pain B.** Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Dev Growth Differ*, v.52, p.101-114, 2010.
- Leeson S, Summers JD.** Significance of Growing Photoperiod and Light Stimulation at Various Ages for Leghorn Pullets Subjected to Regular or Ahemeral Photoperiods. *Poult Sci*, v.67, n.3, p.391-398, 1988.
- Leksrisompong N, Romero-Sanchez H, Plumstead PW.** Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poult Sci*, v.86, p.2685-2691, 2007.
- Lewis PD, Danisman R, Gous RM.** Photoperiods for Broiler Breeder Females During the Laying Period. *Poult Sci*, v.89, n.1, p.108-114, 2010.
- Lewis PD, Gous RM.** Effect of final photoperiod and twenty-week body weight on sexual maturity and early egg production in broiler breeders. *Poult Sci*, v.85, n.3, p.377-383, 2006.
- Li ZD, Deng H, Liu CH, Song YH, Sha J, Wang N, Wei H.** Production of duck- chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. *Poult Sci*, v.81, p.1360-1364, 2002.
- Lierz M, Reinshmidt M, Müller H, Wink M, Neumann, D.** A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes). *Sci Rep*, v.2066, p.1-8, 2013.
- Liu J, Cheng KM, Silversides FG.** A model for cryobanking female germplasm in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Poult Sci*, v.92, n.10, p.2772-2775, 2013.
- Liu JY, Song YH, Cheng KM, Silversides FG.** Production of donor-derived offspring from cryopreserved ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Biol Reprod*, v.83, p.15-19, 2010.
- Long JA.** Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poult Sci*, v.85, p.232-236, 2006.
- Mauldin JM.** Applications of Behavior to Poultry Management. *Poult Sci*, v.71, n.4, p.634-642, 1992.
- Nakamura Y, Kagami H, Tagami T.** Development, differentiation and manipulation of chicken germ cell. *Develop. Growth Differ*, v.55, p.20-40, 2013.
- Nakamura Y.** Poultry Genetic Resource Conservation Using Primordial Germ Cells. *J Reprod Dev*, v.62, n.5, p.431-437, 2016.
- Nicholls TJ, Goldsmith AR, Dawson A.** Photorefractoriness in birds and comparison with mammals. *Physiol Rev*, v.68, n.1, p.133-175, 1988.
- Ordas B, Vahedi S, Seidavi A, Rahati M, Laudadio V, Tufarelli V.** Effect of Testosterone Administration and Spiking on Reproductive Success of Broiler Breeder flocks. *Reprod Domest Anim*, v.50, n.5, p.820-825, 2015.
- Paranzini CS, Correia, LECS, Camargo LS, Silva KM, França TM, Silva JAV, Veiga N, Souza FF.** Feasibility of semen collection in red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*) by manual stimulation and sazonality implications. *Theriogenology*, v.107, p.36-40, 2018.
- Peixoto JV.** Criopreservação de Sêmen e Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Periquitos Australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). 2010. 92f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.
- Pereira RJG.** Reprodução das Aves. In: CUBAS, Zalmir Silvino; SILVA, Jean Carlos Ramos; CATÃO-DIAS, José Luiz (Org.). Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap. 120. p.2235-2269.
- Pereira RJG, Napolitano A, Garcia-Pereira FL, Baldo CF, Suhr ST, King LE, Jose B, Cibelli JB, Karcher DM, McNeil EA, Perez GI.** Conservation of avian germplasm by xenogeneic transplantation of spermatogonia from sexually mature donors. *Stem Cells and Develop*, v.22, p.735-749, 2013.
- Petitte JN, Liu G, Yang Z.** Avian pluripotent stem cells. *Mech Dev*, v.121, p.1159-1168, 2004.
- Pollock CG, Orosz SE.** Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *Vet Clin Exot Anim*, v.5. p.441-474, 2002.
- Ribeiro JD.** Estudo Endócrino Comportamental da Reprodução de Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) Mantidos em Cativeiro, 2017. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- Robbe D, Todisco G, Giammarino A, Pennelli M, Manera M.** Use of a synthetic GnRH analog to induce reproductive activity in canaries (*Serinus canaria*). *J Avian Med Surg*, v.22, n.2, p.123-126, 2008.
- Robinson FE, Robinson NA, Scott TA.** Reproductive Performance, Growth and Body Composition of Full-Fed Versus Feed-Restricted Broiler Breeder Hens. *Can J Anim Sci*, v.71, p.549-556, 1991.
- Rui BR, Angrimani DSR, Losano JDA, Bicudo LC, Nichi M, Pereira RJG.** Validation of simple and cost-effective stains to assess acrosomal status, DNA damage and mitochondrial activity in rooster spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.187, p.133-140, 2017.
- Russel LD, Griswold MD.** Spermatogonial transplantation - an update for the Millennium. *Mol Cell Endocrinol*, v.161, p.117-120, 2000.
- Silversides FG, Purdy PH, Blackburn HD.** Comparative Costs of Programmes to Conserve Chicken Genetic Variation Based on Maintaining Living Populations or Storing Cryopreserved Material. *Br Poult Sci*, v.53, n.5, p.599-607, 2012.



- Silversides F, Liu J.** Novel techniques for preserving genetic diversity in poultry germplasm. *Anim Sci Rev*, p.207-214, 2012.
- Song Y, Silversides FG.** Long-term production of donor-derived offspring from chicken ovarian transplants. *Poult Sci*, v.87, n.9, p.1818-1822, 2008.
- Steiner G, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Boos A, Koch E.** Sexing of turkey poults by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, v.396, n.1, p.465-470, 2010.
- Steiner G, Bartels T, Stelling A, Krautwald-Junghanns ME, Fuhrmann H, Sablinskas V, Koch E.** Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem*, v.400, n.9, p.2775-2782, 2011.
- Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E.** Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. *Poult Sci*, v.78, n.4, p.586-590, 1999.
- Turner J.** Animal reproduction, human control. In: Bekoff M, editora: *Encyclopedia of animal rights and animal welfare*. 2 ed. Santa Barbara: ABC-CLIO, LLC; p.30-36, 2010.
- Wernery U, Liu C, Baskar V, Guerineche Z, Khazanehdari KA, Saleem S, Kinne J, Wernery R, Griffin DK, Chang IK.** Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara Bustard offspring: potential for repopulating an endangered species. *PLoS One*, v.5, p.e15824, 2010.
- Wilson WO, Abplanalp H, Arrington L.** Sexual development of Coturnix as affected by changes in photoperiods. *Poult Sci*, v.41, n.1, p.17-22, 1962.
- Wolc A, White IMS, Olori VE, Hill WG.** Inheritance of Fertility in Broiler Chickens. *Genet Sel Evol*, v.41, n.1, p.47, 2009.
-