

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Medicina Veterinária
Curso de Pós-graduação Strito Senso

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE GALOS REPRODUTORES
DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM DIFERENTES
NÍVEIS DE ENERGIA METABOLIZÁVEL E PROTEÍNA BRUTA

Érica Crosara Ladir
Medica Veterinária

Uberlândia, Minas Gerais. Brasil.
Janeiro 2012.

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Medicina Veterinária
Curso de Pós-graduação Strito Senso

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE GALOS REPRODUTORES
DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM DIFERENTES
NÍVEIS DE ENERGIA METABOLIZÁVEL E PROTEÍNA BRUTA

Érica Crosara Ladir

Orientador: Prof. Dr. Paulo Lourenço Silva.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação Stricto-Senso da Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia, como requisito à
obtenção do grau de MESTRE.

Uberlândia, Minas Gerais. Brasil.

Janeiro 2012.

Érica Crosara Ladir

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Érica Crosara Ladir - Nascida em 06 de julho de 1984, na cidade de Uberlândia – MG. Em 2003, iniciou o Curso de Graduação em Medicina veterinária na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em Uberlândia-MG. Obteve o título de Médica Veterinária com a defesa da monografia desenvolvida na área de doenças bacterianas, intitulada “Prevalência de Lepstospirose em caprinos no distrito de Uberlândia”, em 2007. Em 2007, participou do projeto Rondon, do Ministério da Educação, em São Francisco Brejão, Maranhão. Em 2009, iniciou o Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, com ênfase em produção e reprodução animal. Trabalha desde 2007, na empresa Sadia S/A, atualmente Brasil Foods, na área de reprodutoras de corte, matriz de frango e atualmente com matriz de perus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial ao Ronald, pelo apoio em todos os momentos, e a minha mãe, Regina, pelo incentivo e exemplo. Agradeço ao Prof. Paulo Lourenço da Silva, por me orientar e compartilhar esta pesquisa desde quando ainda era um projeto até a concretização final, e ao Prof. Marcelo Emilio Beletti pelos ensinamentos e paciência. E agradeço muito a equipe da granja, e principalmente ao José Sebastião de Castro Junior e a Patrícia Alves Teixeira, que sem o apoio não seria possível a realização e execução deste trabalho. Agradeço também aos amigos, Ronald de Lucca e Paula Fernanda Braga que contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a morfometria e a compactação de cromatina em espermatozoides de reprodutores tratados com diferentes níveis de proteínas, e comparar as análises de compactação de cromatina com fertilidade e eclodibilidade, analisando a eficiência reprodutiva de galos reprodutores de corte. No tratamento um, os galos reprodutores pesados, foram alimentados com uma ração com 13,8% de Proteína Bruta (PB) e 2750 Kcal de EM/Kg, de 22 a 66 semanas de idade. No tratamento dois, os galos receberam a mesma ração fornecida para as fêmeas, sendo das 22 a 36 semanas de idade contendo 15% de PB, das 36 a 60 semanas, 15,2% de PB e das 60 a 66 semanas, 14% de PB, todas as dietas continham 2850 de Kcal de EM/Kg. No tratamento tres, os machos reprodutores foram alimentados com uma ração 15% de PB e 2700 Kcal de EM/Kg, de 22 a 66 semanas de idade. O sêmen de 16 galos foi coletado de cada tratamento, em três idades diferentes: 34, 38, 43, 48 e 51 semanas. O sêmen coletado foi submetido a protocolo de coloração com azul de toluidina, e posteriormente avaliado por análise de imagem computacional, com mensurações da área, perímetro, homogeneidade e intensidade da compactação da cromatina dentro de cada cabeça do espermatozóide. Os galos alimentados com elevado nível de proteína (15%) apresentaram melhores resultados em relação à compactação e a homogeneidade da cromatina das cabeças dos espermatozoides. Este mesmo grupo apresentou valores de tamanho de espermatozoides menores, o que indica menores alterações morfológicas. Não foi possível correlacionar a eclosão e fertilidade com os demais dados, pois neste estudo não houve diferença significativa entre os três tratamentos ($p > 0.05$). Em relação à idade do galo reprodutor, independente da dieta utilizada, todos os tratamentos apresentaram alterações na compactação da cromatina, sendo que os galos alimentados com 13,8% de proteína bruta e 2750 Kcal de EM/Kg, apresentaram maiores alterações na compactação da cromatina. O que pode explicar a queda na fertilidade, geralmente observada no campo, após este período, em plantéis de matrizes pesadas.

Palavras-chave: Cromatina, espermatozoides, fertilidade, galo, proteína.

Abstract

The present study was to evaluate the reproductive performance of broiler breeders fed different levels of protein and metabolizable energy treated with three different diets, varying amounts of metabolizable energy and crude protein. In one treatment, the heavy broiler breeders were fed a diet with 13.8% CP and 2750 Kcal / kg, 22 to 66 weeks of age. In treatment two, the roosters received the same ration provides for the females, being from 22 to 36 weeks of age containing 15% CP from 36 to 60 weeks, 15.2% CP and 60 to 66 weeks, 14% CP, all diets contained 2850 Kcal / kg. In treatment three, the breeding males fed a diet with 15% CP and 2700 Kcal / kg from 22 to 66 weeks is old. The semen was collected from 16 rooster each treatment in three different ages of week, 34, 38, 43, 48 and 51 weeks. The semen collected was subjected to staining protocol with toluidine blue and subsequently evaluated by computer image analysis, with measurements of area, perimeter, homogeneity and intensity of compaction of chromatin in each head of spermatozoa. The roosters fed with high protein (15%) showed improve results in terms of compression and density of the heads of sperm chromatin. This same group had values of spermatozoa size smaller, which indicates minor morphological changes. It wasn't possible to correlate the onset and fertility with other data, as in this study there was no significant difference between treatments ($p > 0.05$). Concerning the age of the rooster, regardless of the diet used, all treatments showed changes in chromatin compaction, and the roosters fed with 13.8% crude protein and 2750 Kcal / kg, showed greater changes in chromatin compaction. This can explain the decrease in fertility, usually observed in the field after this period, in flocks of broiler breeders.

Keywords: Chromatin, spermatozoa, fertility, rooster, protein.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
	2.1 Reprodução de galos.....	13
	2.1.1 Proteína e Energia.....	16
	2.1.2 Avaliação de fertilidade em galos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
	3.1 Delineamento	19
	3.2 Parâmetros analisados.....	21
	3.2.1 Coleta de sêmen e avaliação da Compactação da Cromatina	21
	3.2.2 Fertilidade e Eclosão.....	22
	3.2.3 Análise Estatística.....	23
4	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	23
	4.1 Consumo de Energia e Proteína	23
	4.2 Relação de proteína e energia na ração com qualidade de sêmen, fertilidade e eclosão.....	25
	4.3 Relação das variáveis analisadas computacionalmente na cabeça do espermatozóide com a idade	30
5	CONCLUSÃO.....	35
6	REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios padrão, relativos às medidas de proteínas e de Kcal, encontradas nos três tratamentos.....	25
Tabela 2. Médias e desvio padrão da área da cabeça dos espermatozóides dos galos do T1, T2 e T3.....	26
Tabela 3. Médias e desvio padrão do perímetro da cabeça dos espermatozóides dos galos do T1, T2 e T3.....	26
Tabela 4. Médias e desvio padrão do DIF da cabeça dos espermatozóides dos galos do T1, T2 e T3.....	27
Tabela 5. Médias e desvio padrão do CV da cabeça dos espermatozóides dos galos do T1, T2 e T3.....	28
Tabela 6. Médias e desvios padrão, relativos às medidas de fertilidade e de eclosão, encontradas nos três tratamentos.....	29
Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de área das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas, considerando o mesmo tratamento.....	30
Tabela 8. Valores médios e desvio padrão do perímetro das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas, considerando o mesmo tratamento.....	31
Tabela 9. Valores médios e desvio padrão do DIF das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas, considerando o mesmo tratamento.....	32
Tabela 10. Valores médios e desvio padrão do CV das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas, considerando o mesmo tratamento.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de espermatozoides das diferentes espécies.....	18
Figura 2. Consumo médio de energia (EM/ ave/dia) por semana, no período de 22 a 66 semanas de idade	24
Figura 3. Consumo médio de proteína (g/ave/dia) por semana, no período de 22 a 66 semanas de idade	24
Figura 4. Média dos valores de área durante as semanas de coletas e análises.....	30
Figura 5. Médias e desvio padrão do perímetro da cabeça dos espermatozoides dos galos no decorrer das coletas, considerando o mesmo tratamento.....	31
Figura 6. Medias e desvio padrão do DIF da cabeça dos espermatozoides dos galos no decorrer das coletas, considerando o mesmo tratamento.....	33
Figura 7. Médias e desvio padrão do CV da cabeça dos espermatozoides dos galos no decorrer das coletas, considerando o mesmo tratamento.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

PB. Proteína Bruta

EM. Energia Metabolizável

PV. Peso Vivo

EM/KG. Energia metabolizável aparente por quilograma de ração

T1. Tratamento 1

T2. Tratamento 2

T3. Tratamento 3

AT. Azul de Toluidina

CV. Homogeneidade da coloração da cabeça dos espermatozoides

DIF. Diferença percentual do valor médio dos *pixels* que compõem a cabeça em relação ao valor médio dos *pixels* de cabeças padrão

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Quantidade de Proteína e Energia fornecida semanalmente nos
tratamento 1, 2 e 3 42

1. INTRODUÇÃO

Na avicultura, a avaliação de fertilidade em machos é de extrema importância, para garantir uma melhor produção de ovos férteis. As técnicas para diagnóstico de infertilidade em galos são pouco utilizadas. Os parâmetros fisiológicos como peso corporal, peso testicular, dieta alimentar e idade da ave são correlacionados a virilidade. Características morfofisiológicas facilmente evidenciadas na microscopia de luz em preparados de sêmen fresco e diretamente relacionadas com o espermatozóide, tais como motilidade, densidade, vitalidade são técnicas ainda pouco empregadas na rotina para avaliação de fertilidade. Mas é sabido que, em outras espécies, além de características morfofisiológicas, existem alterações intrínsecas ao espermatozóide, como a baixa compactação da cromatina, que pode levar a infertilidade ou subfertilidade, que na maioria das vezes não são diagnosticada (SOARES; BELETTI, 2006).

O melhor desempenho reprodutivo de matrizes pesadas ocorre quando essas aves ganham peso de forma contínua, porém controlada antes e depois do período produtivo (RUTZ et al, 2005).

Os galos são fundamentais para a fertilidade de um plantel de matrizes de frango e as informações sobre os fatores nutricionais que interferem no desempenho reprodutivo não estão de acordo com a importância dos machos no processo reprodutivo (DANIKOWSKI et al., 2002).

Na década de 80 adotou-se a prática do fornecimento de ração para fêmeas e machos separados na produção. Este manejo permite uma alimentação para galos reprodutores com base nas suas próprias exigências nutricionais, servindo para controlar o consumo alimentar e o peso corporal, evitando a obesidade do plantel de matrizes (BORGES et al, 2009).

Os testículos aumentam a taxa de espermatogênese no momento da puberdade e também produzem níveis mais elevados de andrógenos nas células de Leydig (RUTZ et al, 2005). Tendo em vista, que os principais hormônios da reprodução são moléculas glicoprotéicas e lipídicas, é fundamental o fornecimento de níveis satisfatórios de proteínas e energia, para garantir a síntese destes hormônios nos reprodutores.

Acredita-se que as aves que apresentam maior aporte nutricional na fase que antecede a reprodução, obtêm melhores resultados de índices zootécnicos, como fertilidade, produção e uniformidade.

Deve-se buscar um equilíbrio entre níveis de proteína que suprirão as necessidades estruturais, como formação de carcaça e peito, e também as necessidades de reprodução, como produção de sêmen de qualidade e desenvolvimento testicular.

Um importante fator que onera o custo de produção na indústria avícola de corte é a nutrição de machos e este custo está associado às necessidades de crescimento e de manutenção de machos reprodutores (BORGES et al., 2006).

A alimentação contribui com aproximadamente 70% do custo total de produção, sendo evidente a necessidade de estimar as reais exigências nutricionais dos galos nas diferentes fases de criação. Quanto mais informações disponíveis sobre as exigências nutricionais de galos reprodutores, mais a alimentação com excesso de determinados nutrientes será minimizada, resultando em economia de alimentos e significativa melhora na eficiência reprodutiva (BORGES et al., 2006).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a morfometria e a compactação de cromatina em espermatozoides de reprodutores de frango de corte tratados com diferentes níveis de proteínas, e comparar as análises de compactação de cromatina com fertilidade e eclodibilidade, analisando a eficiência reprodutiva de galos reprodutores de corte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. REPRODUÇÃO DE GALOS

A avicultura brasileira caracteriza-se por sua dinamicidade, eficiência e produtividade, entretanto, sua constante evolução não deve cessar, principalmente em se tratando de garantias de conformidades de seus processos e produtos. Os aspectos voltados ao processo reprodutivo são de grande importância, considerando que exercem influência não somente sobre a produtividade de reprodutores, mas também no desenvolvimento de futuras progênies. Assim, é importante ressaltar a

importância do macho sobre a fertilidade do lote, pois este é responsável pela fertilização dos ovos de 10 galinhas ou mais. O objetivo principal do macho matriz é fertilizar o óvulo e transferir seu potencial genético para a sua progênie. Portanto, na indústria avícola, o macho matriz é mais do que 50% responsável pela fertilização, sendo necessária atenção especial ao seu manejo de criação (MURAKAMI; GARCIA, 2005).

A fertilidade é uma das características econômicas mais importantes da criação de matrizes e, em sistemas de monta natural, está associada a vários fatores, incluindo os genéticos, fisiológicos, ambientais e sociais (EDENS, 1983).

Como a herdabilidade das características de eficiência reprodutiva é relativamente baixa, os fatores não-genéticos são importantes para o desempenho reprodutivo comercial das matrizes (BORGES et al., 2006).

O sucesso da fertilidade por monta natural está associado a vários fatores, incluindo os genéticos e os não-genéticos, como a temperatura e o fotoperíodo, os sociais e os nutricionais (RUTZ et al., 2005).

Os espermatozoides são células altamente especializadas consistindo de várias estruturas de membrana. Suas propriedades físicas e integridade funcional determinam funções fisiológicas importantes, incluindo motilidade e capacidade fertilizante. Assim, a composição lipídica do sêmen de aves é um fator determinante na sua qualidade (CEROLINI et al., 1997).

Espermatozoides de galos apresentam um alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (SURAI, 2002). Bongalhardo *et al.* (2002), avaliaram a estrutura, composição das membranas da cabeça e do corpo espermático de galos. A membrana plasmática da cabeça apresentou menos ácidos graxos poliinsaturados que o corpo espermático.

A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide contém maior conteúdo de esfingomielina e fosfatidilserina e menos fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina que a membrana do corpo espermático. A presença de tais ácidos graxos representa um risco para a ocorrência de peroxidação lipídica nas membranas espermáticas e é considerado causa de redução de fertilidade em machos (WISHART, 1984; AITKEN, 1994).

Um sistema antioxidante é crucial para a manutenção da integridade da membrana espermática e para as propriedades fisiológicas, incluindo fluidez de membrana, flexibilidade e permeabilidade necessária para o processo de fertilização.

Assim, um sistema antioxidante eficiente é necessário para proteger as membranas espermáticas da ação peroxidativa.

Surai (2002) sugeriu um sistema antioxidante para espermatozóides que inclui três níveis de defesa, responsáveis para manter as funções espermáticas em várias condições de estresse. A superóxido dismutase juntamente com a glutathione peroxidase e proteínas carreadoras de metais, compreende a primeira linha de defesa antioxidante, responsável por impedir a formação de radicais livres. Antioxidantes naturais, juntamente com a glutathione peroxidase perfazem a segunda linha de defesa antioxidante que atua na prevenção e neutralização da formação da cadeia e sua propagação. O terceiro nível de defesa é em um sistema enzimático responsável pela reparação e remoção de moléculas lesadas na célula.

Em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutathione, glutathione peroxidase e a superóxido dismutase. A mitocôndria é responsável pela produção de energia para manter a motilidade espermática. Durante este processo ocorre a formação de radicais livres. Assim, a presença de glutathione peroxidase nesta região auxilia na neutralização de radicais livres, impedindo a peroxidação lipídica e mantendo a qualidade espermática.

Os espermatozoides de mamíferos contêm a cromatina em seu maior grau de compactação. O DNA é compactado pela substituição das proteínas histônicas, que participam da arquitetura molecular das fibras cromatínicas de células somáticas, por protaminas, que são proteínas ricas em arginina, resíduos de lisina e cisteína e pontos de ligações fosforiladas (BALHORN, 2007). Essa substituição das proteínas ocorre durante a espermatogênese e no trânsito epididimário. O DNA compactado tem forma toroidal, estabilizados por pontes dissulfeto entre as protaminas (SHAMAN et al. , 2007). As protaminas são importantes na condensação do material genético, tornando o núcleo mais compacto e hidrodinâmico. Além disso, devido à extrema condensação, o DNA fica protegido contra a ação de agentes mutagênicos, radicais livres e nucleases (OLIVA, 2006).

Alterações na compactação da cromatina espermática levam a problemas de fertilidade no macho. Gledhill (1966) foi o primeiro a identificar espermatozoides com cromatina malcompactada em touros subfêrteis, utilizando reação de Feulgen.

A condensação do material nuclear é um importante evento da diferenciação nuclear durante a espermatogênese. Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à

formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozoides que se torna frouxa, o que leva a consequências sobre a fertilidade (EVENSON et al., 1980; BELETTI; MELLO, 2003). No caso das aves, a protamina, presente no núcleo da célula espermática, é conhecida como *galline* (NAKANO et al., 1989; SOARES; BELETTI, 2006b).

2.1.2. Proteína e Energia

As proteínas apresentam as mais diversificadas funções no organismo. A falta de proteína prejudica a produtividade das aves, porém, o excesso reduz a eficiência devido ao incremento calórico. Dietas com 16% de proteína bruta (PB) são utilizadas na alimentação de fêmeas, e esta mesma ração é fornecida aos galos. Isso representa um custo 7 a 11% maior do que uma dieta específica com 12% de proteína para reprodutores de corte (TARDIN, 1990).

Joseph et al. (2000) estudaram o efeito da proteína (14%, 16% e 18%) da dieta para matrizes durante o período de transição, entre recria e postura. Um nível de 14% de proteína na dieta não foi suficiente para manter o peso e a produção de ovos. No entanto os níveis protéicos estudados não influenciaram na idade para alcançar a maturidade sexual.

Segundo Bertechini (1998), a elevação do nível de PB da dieta eleva os níveis de aminoácidos e, desse modo, supera as necessidades dos aminoácidos limitantes. Dietas com níveis protéicos elevados sobrecarregam os processos de digestão, absorção e eliminação do nitrogênio não aproveitável, afetando diretamente o fígado e os rins. Esses efeitos reduzem a eficiência dessas rações, além de elevar o custo.

Borges et al. (2006) recomendam rações com níveis de 13% de PB na fase de 21 a 61 semanas de idade.

Baixo nível protéico e de lisina, em dieta de matrizes pesadas durante a fase de recria, não influenciam a fertilidade e a eclodibilidade subsequente (MACARI et al, 2005).

Em dietas para reprodutores de corte, o nível de 12% de PB é suficiente para manter um bom desempenho reprodutivo (LUCCA et. al., 2009).

As matrizes precisam receber determinado nível protéico, na dieta, que atenda as necessidades de aminoácidos essenciais e não essenciais. Conforme a ave avança a idade, a proteína adicional serve para manter a uniformidade do lote e para assegurar a manutenção do estado corporal da ave. Um alto nível protéico na dieta, também maximiza a quantidade de proteína na carcaça disponível para a produção de ovos (MACARI et al, 2005).

O aumento de peso corporal decorrente do consumo de energia torna os machos mais sensíveis às desordens mecânicas como problemas de pés e pernas, interferindo na monta natural (HOCKING; DUFF, 1989). Além disso, segundo Borges et al. (2006a), o excesso de energia é armazenado principalmente na forma de gordura e resulta em aumento do peso corporal e redução da eclodibilidade e fertilidade.

Há autores que relatam alterações na qualidade de sêmen relacionadas com consumo de energia. Segundo trabalho realizado por Sexton et al.(1989) e Carolini et al. (1995), o baixo consumo de energia metabolizável (EM) durante o período de produção pode ser responsável por alterações as características do sêmen e fertilidade

Segundo trabalho realizado por Bramwell et al. (1996) houve efeito negativo significativo com o decréscimo de energia na dieta em relação a concentração espermática e espermatozoides vivos por mililitro de ejaculado.

2.1.2. Avaliação de fertilidade em galos

Os espermatozoides são geralmente células, muito menores que os óvulos e estão estruturados de modo a permitir o máximo de eficiência de deslocamento, o que aumenta a chance de eles chegarem ao óvulo. São células pequenas, alongadas com formato hidrodinâmico e com uma longa cauda que é utilizada na propulsão (SOBIOLOGIA, 2011). Os espermatozoides variam muito em tamanho e forma entre as diferentes espécies, sendo que o espermatozoide do galo apresenta uma cabeça alongada e fina, conforme representado na figura 1.

Figura 1. Morfologia de espermatozoides das diferentes espécies:



Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/embriologia/reproducao4.php>

A avaliação de fertilidade dos machos, assim como a busca de métodos mais precisos é de extrema importância, para garantir uma melhor produção de ovos férteis. As técnicas para diagnóstico de fertilidade em galos são pouco utilizadas (RODRIGUES, ROCHA; BELETTI, 2009). Características morfofisiológicas facilmente evidenciadas na microscopia de luz em preparados de sêmen fresco e diretamente relacionadas com o espermatozoide, tais como motilidade, concentração, vitalidade são técnicas ainda pouco empregadas na rotina para avaliação de fertilidade (SOARES; BELETTI, 2006).

A produção de espermatozoides no galo atinge seu máximo entre 24 e 30 semanas de idade, mantêm-se elevada até 40-45 semanas de idade e decresce a partir dessa idade (BRILLARD; MCDANIEL, 1985; ROSENTRAUCH et al., 1994). Na rotina, os parâmetros fisiológicos como peso corporal, peso testicular, dieta alimentar e idade da ave são correlacionados a virilidade. Mas é sabido que, em outras espécies, além de características morfofisiológicas, existem alterações intrínsecas ao espermatozoide, como a baixa compactação da cromatina, que pode levar a problemas de fertilidade, que na maioria das vezes não são diagnosticados (SOARES; BELETTI, 2006).

Em mamíferos, aves e muitos peixes nas fases finais da espermatogênese, as proteínas nucleares básicas, ricas em lisina, denominadas histonas, são

substituídas, total ou parcialmente, por nucleoproteínas denominadas protaminas, proteínas de caráter mais básico que as histonas e com abundância de arginina e cisteína oxidada. Os resíduos amina dessas proteínas interagem com a fita de DNA através de seus grupos fosfatos, neutralizando o esqueleto fosfodiéster, sendo esta interação denominada complexo DNA-proteína ou simplesmente cromatina. Assim, as protaminas dão origem a uma cromatina extremamente condensada e inerte. No caso das aves, a protamina presente no núcleo da célula espermática é conhecida como galline (SOARES E BELETTI, 2006). A cromatina apresenta maior ou menor grau de compactação, sendo esse fator de grande relevância, quando avaliamos células espermáticas e a fertilidade nos machos.

Lake (1989) e Sexton et al. (1989) relataram que a queda da fertilidade em galos a partir de 45ª semana de idade foi acompanhada de redução do número de espermatozoides no ejaculado. Hocking (1989) mostrou que a correlação entre volume de sêmen e idade é negativa. Rosenstrauch et al. (1994), ao avaliarem a fertilidade de galos nas 32, 48, 70 e 110 semanas de idade encontraram, respectivamente, valores de 95, 90, 75 e 15%. Observaram também redução na concentração espermática do sêmen. No entanto, em um trabalho mais recente, Rocha Júnior e Baião (2011) demonstraram que não houve diferença significativa nas características físicas espermáticas (motilidade, vigor e turbilhonamento) entre idades de 35 e 68 semanas, sugerindo que a queda de fertilidade em galos velhos deve ser causada por outros fatores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO

O estudo foi realizado em uma Granja de Matrizes de Frango de Corte, localizada no Município de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, no período de maio de 2010 a julho de 2011. As fêmeas e os machos foram criados em boxes separados desde o primeiro dia até as 22ª semanas de idade. No período de cria, até as aves atingirem 1 Kg de peso vivo (PV), foi fornecida ração à vontade com

uma dieta contendo 18% de proteína bruta (PB) e 2.800 kcal de energia metabolizável aparente por quilograma de ração (EM/kg).

No período de 5 a 15 semanas de idade, as aves foram submetidas à restrição alimentar, com água à vontade e ração quatro dias sim e três dias não; na fase de 16 a 19 semanas de idade, o fornecimento de ração foi alterado cinco dias sim e dois dias não. Após este período, as aves receberam a dieta diariamente, com quantidades controladas. Da 4^a à 24^a semana de idade, aproximadamente 10% dos galos foram semanalmente pesados para o controle do peso e do volume de ração. As exigências nutricionais e a quantidade de ração para os galos seguiram as recomendações do manual da linhagem ROSS-308® (AGROCERES, 2011).

Semanalmente o volume de ração era alterado seguindo avaliação de fertilidade e peso corporal. Os machos foram submetidos a cinco seleções por peso corporal, nas idades de 1, 7, 12, 15 e 20 semanas.

O acasalamento foi realizado quando as aves apresentarem 24 semanas de idade. As aves foram distribuídas em três galpões, com aproximadamente 13500 fêmeas e 1350 machos em cada galpão. Cada galpão foi dividido por categorias; pesadas, médias, leve e muito leve, visando um fornecimento da dieta mais uniforme para as aves.

As aves foram alojadas em piso de concreto coberto com cama de maravalha, com bebedouros pendulares e comedouros tipo calhas, sendo que os comedouros para os machos foram colocados mais altos, de modo a permitir o acesso somente dos mesmos.

O programa de iluminação utilizado seguiu a recomendação do manual da linhagem Ross 308® (AGROCERES, 2011).

Três dietas com diferentes níveis de PB e EM/Kg e variando volume semanalmente foram testados.

A dieta para a fase de recria e início de produção (5^a a 28^a semanas de idade) era composta de 15% de PB e 2.700 kcal EM/kg de ração.

- Tratamento 1 (T1): Arraçamento dos machos de 22^a às 66^a semanas de idade com 13,8% de PB e 2750 Kcal de EM/Kg e volume crescente de ração (ANEXO 1).
- Tratamento 2 (T2): Arraçamento dos machos com a mesma ração oferecida às fêmeas, de 22^a a 36^a semanas de idade, com 15% de PB, de 36^a a 60^a semanas de idade, com 15.2% de PB e de 60^a a 66^a semanas com 14% de PB.

Todas as rações com 2850 de Kcal de EM/Kg e volume crescente de ração (Anexo 1).

- Tratamento 3 (T3): Arraçoamento dos machos de 22^a às 66^a semanas de idade com 15% de PB, 2700 Kcal de EM/Kg e volume crescente de ração (Anexo 1).

Cada aviário recebeu um tratamento. Os machos foram submetidos às mesmas condições de ambiência e manejo, desde a fase de recria até a fase de produção.

De acordo com a análise de variância em delineamento casualizado com três tratamentos, utilizamos 16 repetições em cada tratamento.

Para análise dos espermatozoides foram utilizados 16 machos de cada tratamento, sendo quatro galos por categoria de peso (pesada, média, leve e super leve). As análises foram realizadas nas idades de 34, 38, 43, 48 e 51 semanas.

3.2. Parâmetros Analisados

3.2.1. Coleta de Sêmen e Avaliação da compactação da Cromatina

Para coleta de sêmen foi utilizada a técnica descrita por Wilson (1988), o qual recomenda suaves massagens abdominais na ave. O sêmen foi coletado em ependorfs e para conservação das amostras, foi colocada uma gota de sêmen em dois mL de formol citrato (Rodenas et al., 2005; Soares e Beletti, 2006a)

Foram coletado sêmen de 16 galos por tratamento/idade, divididos assim:

- 1 pool de sêmen de 4 galos da categoria pesada (T1, T2 e T3);
- 1 pool de 4 galos da categoria média (T1, T2 e T3);
- 1 pool de 4 galos da categoria leve (T1, T2 e T3);
- 1 pool de 4 galos da categoria super leve (T1, T2 e T3);

Após a coleta e fixação, foi realizado o esfregaço do sêmen, sendo uma lâmina para cada categoria de cada tratamento, total de quatro lâminas por tratamento.

As lâminas foram coradas utilizando protocolo de coloração com azul de toluidina (AT), descrito por Rodrigues, Rocha e Beletti (2009) como método mais adequado para análise computacional da compactação da cromatina em galos.

Neste protocolo foi realizado hidrólise com ácido clorídrico 1N por 10 minutos, coloração em cubeta com AT 0,025%, pH 4,0, por 20 minutos, desidratação em álcool, diafanização em xilol e montagem com bálsamo do Canadá.

Para a análise computacional, imagens digitais foram capturadas em microscópio binocular Olympus BX40 com objetiva de 100x (imersão), acoplado a câmera Olympus OLY-200, ligada a um computador PC por meio de placa digitalizadora Data Translation 3153. Deslocando-se a lâmina em ziguezague, foram capturadas imagens de forma aleatória em toda a extensão da lâmina. Posteriormente, estas imagens foram trabalhadas no programa Jasc Paint Shop Pro 8®, no qual foram primeiramente passadas para tons de cinza. Em seguida, as cabeças dos espermatozóides que não possuíam sobreposição de imagem foram cortadas e coladas em fundo branco, processo este denominado de segmentação.

Foram segmentadas 100 cabeças por lâmina, sendo 6000 cabeças no total do experimento. As cabeças dos espermatozóides foram analisadas em programa desenvolvido em ambiente de programação SCILAB no qual foram avaliados: área, perímetro (Beletti et al., 2005b), homogeneidade da coloração da cabeça (CV) e diferença percentual do valor médio dos *pixels* que compõem a cabeça em relação ao valor médio dos *pixels* de cabeças-padrão (Dif. %). Para se ter uma referência da coloração normal da cabeça do espermatozóide, foi selecionada visualmente em cada esfregaço seis cabeças desses com coloração homogênea e clara. A média dos valores de *pixel* dessas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozóides (cabeças-padrão) (Silva, 2006).

Para avaliar a homogeneidade da coloração da cabeça, foi calculado o coeficiente de variação (CV) dos valores dos *pixels* que a compõem (Beletti et al., 2005a; Silva, 2006).

3.2.2. Fertilidade e Eclosão

Para avaliação de fertilidade os ovos coletados provenientes de cada tratamento foram encaminhados para um incubatório, localizado na cidade de Uberlândia, estado de Minas Gerais. O período de estocagem variou de dois a cinco dias em todos os tratamentos.

Os ovos foram incubados em máquinas de incubação PETERSIME modelo VB504, de estágio múltiplo e submetido às mesmas condições do manejo de incubação padronizado.

A fertilidade foi avaliada pelo método de ovoscopia com amostragem de 450 ovos por tratamento semanalmente, no 9º dia de incubação.

A eclosão foi analisada através de pintos nascidos de todos os ovos férteis incubados durante a semana.

3.2.3. Análise Estatística

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças, estatisticamente significantes, entre as medidas de área, perímetro, largura, comprimento, DIF e CV, obtidas nas cinco coletas, foi aplicado o teste t de Student, (GRANER, 1966), considerando-se cada um dos três tratamentos. O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral.

Para verificar a existência ou não de diferenças, estatisticamente significantes, entre as medidas de fertilidade e eclosão, obtidas com os três tratamentos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975). O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral.

Com relação às medidas de proteína e energia, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral. Uma vez que o teste de Kruskal-Wallis não indica a direção das diferenças, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975), comparando-se as séries de dados, duas a duas. O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSUMO DE ENERGIA E PROTEÍNA

Para correlacionar os dados de compactação de cromatina com fertilidade e eclodibilidade foi analisada a quantidade de proteínas e energia ingeridas, por tratamento e por semana, pois os tratamentos variaram no volume e percentual de PB e EM/Kg, As quantidades de energia e proteína ingeridas semanalmente estão representadas nos gráficos um e dois, respectivamente.

Figura 2 – Consumo médio de energia (EM/ ave/dia) por semana, no período de 22 a 66 semanas de idade.

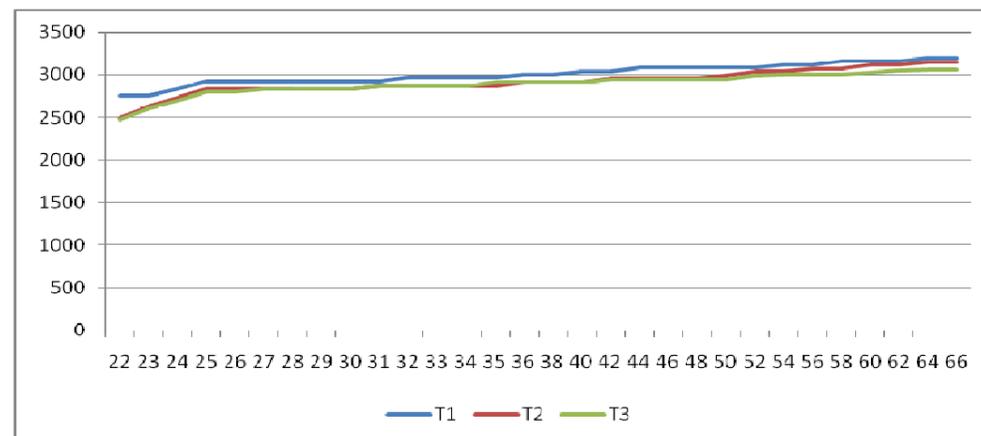
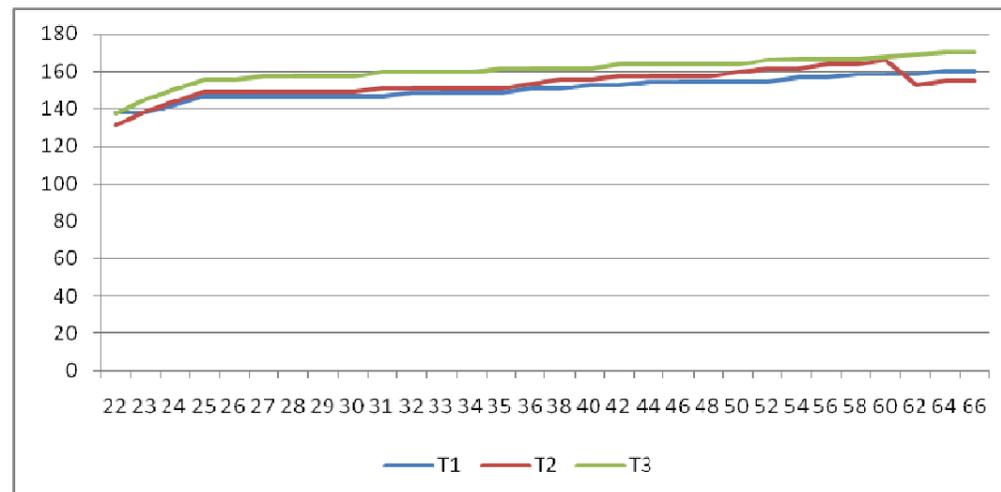


Figura 3 – Consumo médio de proteína (g/ ave/dia) por semana, no período de 22 a 66 semanas de idade.



Na tabela 1, estão demonstrados as médias e o desvio padrão, relativos às medidas de proteínas e de Kcal, encontradas nos três tratamentos.

Os valores das probabilidades encontradas foram: proteínas $p = 0^*$ e Kcal, $p = 0,001^*$, indicando que houve diferenças significativas ($p \leq 0.05$), entre os valores obtidos com os três tratamentos.

Tabela 1 – Médias e desvios padrão, relativos às medidas de proteínas e de Kcal, encontradas nos três tratamentos.

Tratamentos	Proteínas	Kcal
T1	150,98±5,94 a	3008,78±118,36 a
T2	156,01±5,48 b	2916,69±145,98 b
T3	160,72±7,18 c	2892,96±129,23 b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores ($p \leq 0,05$).

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, isto sugere que os níveis de proteína e energia metabolizável das dietas fornecidas, foram diferentes nos três tratamentos testados, durante o experimento.

Os galos do T1 ingeriram maior quantidade de energia e menor quantidade de proteína.

Os machos do T3 foram arraçoados com uma ração de menor valor energético e maior nível de proteína.

Os machos do T2 foram alimentados com uma ração de valores de energia e proteína intermediário entre os tratamentos 1 e 3.

4.2. RELAÇÃO DE PROTEÍNA E ENERGIA NA RAÇÃO COM QUALIDADE DE SÊMEN, FERTILIDADE E ECLOSÃO.

Na tabela 2, estão demonstradas as médias e o desvio padrão, relativos às medidas de área da cabeça do espermatozoide, considerando-se os três tratamentos e as cinco coletas efetuadas.

Tabela 2. Médias e desvio padrão da área da cabeça dos espermatozoides dos galos do T1, T2 e T3.

Tratamentos	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	6,45±2,68 a	5,41±1,71 a	4,93±1,33 a	5,59±1,38 a	5,69±1,46 a
T2	6,64±2,67 a	5,30±1,54 a	5,16±1,92 b	5,63±1,68 a	5,49±1,42 b
T3	5,79±2,02 b	4,95±1,54 b	4,75±1,16 c	5,63±1,36 a	5,75±1,36 a

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Na tabela 3, estão demonstrados as médias e os desvios padrão, relativos às medidas de perímetro da cabeça do espermatozoide, considerando-se os três tratamentos e as cinco coletas efetuadas.

Tabela 3. Médias e desvio padrão do perímetro da cabeça dos espermatozoides dos galos do T1, T2 e T3.

Tratamentos	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	18,42±1,49 a	16,86±1,61 a	16,48±1,13 a	14,44±1,81 a	14,99±2,62 a
T2	18,11±1,47 b	16,60±0,97 b	16,43±1,61 a	14,87±2,46 b	14,62±2,20 b
T3	16,85±1,46 c	16,63±0,95 b	16,03±1,04 b	15,38±2,32 c	14,47±2,28 b

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Analisando a área e o perímetro da cabeça dos espermatozóides dos galos, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os três tratamentos, sendo que o T1 apresentou valores médios de tamanho de cabeça de espermatozóides maiores que os demais tratamentos até as 43 semanas. No T3 obteve-se espermatozóide de tamanhos menores que T1 e T2, nas 34, 38, 43 e 51 semanas de idade e nas 48 semanas, o T1 apresentou valores médios menores que os demais tratamentos.

Estes dados concordam com os valores de tamanho de espermatozóide (área e perímetro), ou seja, cabeças de espermatozóides com menor grau de descompactação apresentaram tamanho menor. O que concorda com Beletti et al. (2005a), que as alterações morfológicas causadas por alterações na estrutura da cromatina deveriam aumentar o tamanho da cabeça do espermatozóide.

Na tabela 4, estão demonstrados as médias e o desvio padrão, relativos às medidas de DIF, que é a diferença percentual do valor médio dos *pixels* que compõem a cabeça em relação ao valor médio dos *pixels* de cabeças-padrão, considerando os três tratamentos e as cinco coletas efetuadas.

Tabela 4. Médias e desvio padrão do DIF da cabeça dos espermatozoides dos galos do T1, T2 e T3.

Tratamento	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	4,78±3,62 a	4,77±4,58 a	6,78±4,96 a	10,01±7,37 a	6,57±6,58 a
T2	4,84±3,92 a	4,52±3,41 a	7,79±5,99 b	6,53±5,53 b	8,89±6,77 b
T3	4,03±3,68 b	3,11±3,79 b	7,85±5,77 b	8,54±5,32 c	9,97±10,1 a

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Na tabela 5, estão demonstrados as médias e o desvio padrão, relativos às medidas de CV, que é a homogeneidade da coloração da cabeça, considerando os três tratamentos e as cinco coletas efetuadas.

Tabela 5. Médias e desvio padrão do CV da cabeça dos espermatozoides dos galos do T1, T2 e T3.

Tratamento	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	7,63±2,09 a	5,53±2,61 a	5,81±3,37 a	8,14±5,30 a	7,88±4,55 a
T2	7,96±3,38 b	7,50±2,87 b	6,55±3,05 a	5,96±3,29 b	6,58±2,69 b
T3	6,41±2,14 c	3,51±1,88 c	5,37±2,71 a	6,25±3,34 c	5,81±2,70 c

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Observamos que em todas as coletas, o T3 apresentou resultados menores de CV, o que significa que o T3 foi o mais homogêneo em relação à coloração da cabeça, demonstrando estar em menor nível de descompactação parcial da cromatina. Já com relação ao DIF, o melhor resultado foi encontrado no T2, nas 48 e 51 semanas, e assim como o CV, nas três primeiras coletas o T3 apresentou valores menores.

A alta correlação entre as anormalidades morfológicas primárias e alterações na cromatina já era esperado, uma vez que a cabeça do espermatozóide é quase totalmente composta de cromatina, conforme descrito por Beletti et al (2003).

Os melhores resultados observados na dieta com maior nível de proteína, podem ser explicados pelo alto requerimento de proteínas no processo de compactação, como citado por Beletti (2003), A substituição de histonas por protaminas que ocorre durante a espermiogênese é responsável pela alta compactação da cromatina de espermatozoides. Balhorn (1982) relatou que na ausência de tal processo, quando se considera a permanência da cromatina nucleosomal, a cabeça do espermatozóide do ser humano seria duas vezes seu tamanho normal. Portanto, alterações de cromatina, tendem a induzir alterações morfológicas da cabeça.

No entanto, estes resultados discordam de Borges et al. (2006) que recomendaram rações com percentual de PB de 13% para machos reprodutores na fase de 21 a 61 semanas de idade. Rostagno et al. (2005), preconizam níveis de PB próximo aos 12,6%.

Segundo Soares e Beletti (2006), sêmen de galos férteis possui uma pequena quantidade de espermatozoides com baixa compactação de cromatina e alterações morfológicas. Alterações na compactação da cromatina freqüentemente não são acompanhadas por alterações morfológicas, porém as alterações morfológicas geralmente são acompanhadas por alterações na compactação da cromatina.

Na tabela 6, estão demonstrados as médias e o desvio padrão, relativos às medidas de fertilidade e de eclosão, encontradas nos três tratamentos.

Tabela 6 – Médias e desvios padrão, relativos às medidas de fertilidade e de eclosão, encontradas nos três tratamentos.

Tratamentos	Fertilidade	Eclosão
T1	93,61±4,15 a	86,27±2,95 a
T2	94,72±3,01 a	88,27±0,97 a
T3	95,22±3,17 a	88,07±1,17 a

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

O valor da probabilidade encontrada para a fertilidade, foi $p = 0,816$, e para a eclosão, foi $p = 0,645$, indicando que não houve diferença, estatisticamente significativa ($p > 0,05$), entre as séries de medidas analisadas.

Concordando com o resultado desta pesquisa, Fontana, Weaver e Van Krey (1990) mostraram que dietas de 12% e 14% de proteína bruta não apresentaram diferenças em concentração espermática, nem em fertilidade.

De acordo com Spratt e Leeson (1987) galos alimentados com 325, 385 ou 450 Kcal de energia/ave/dia não tiveram alterações de fertilidade, eclodibilidade e mortalidade embrionária. Segundo Attia et al. (1995) não houve efeito significativo das variações de consumo de energia sobre fertilidade e eclodibilidade.

Um estudo na Holanda, utilizando três níveis de PB (13,1; 14,2; e 15,2%) a um mesmo nível de energia (2700 kcal/kg), a melhor persistência da fertilidade foi observada com nível de 13,1% de proteína (FRENCH, 2010).

Soares e Beletti (2006) verificaram alta correlação entre cromatina frouxa e baixa fertilidade. E também encontraram altas taxas de espermatozoides com baixa compactação de cromatina em sêmen de galos altamente férteis. Desenvolveram então uma hipótese de que isso poderia ser explicado por uma continuidade na compactação da cromatina dos espermatozoides durante seu armazenamento na espermateca das galinhas.

4.3. RELAÇÃO DAS VARIÁVEIS ANALISADAS COMPUTACIONALMENTE NA CABEÇA DO ESPERMATOZÓIDE COM A IDADE

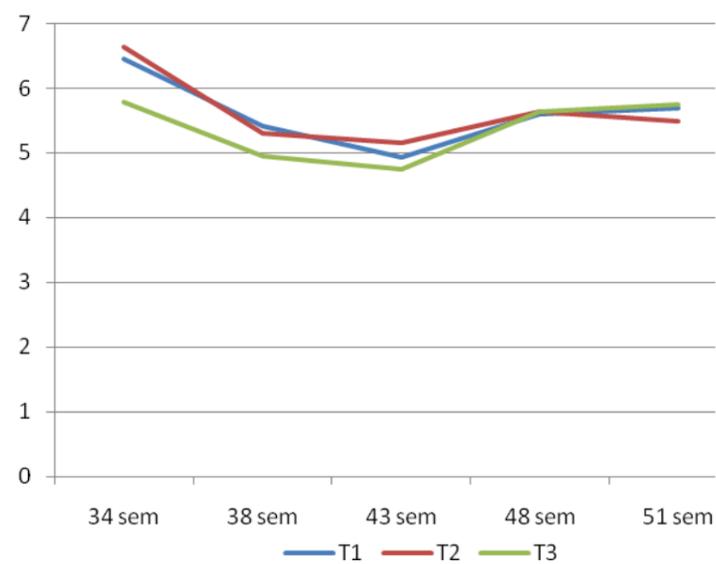
Na tabela 7, estão demonstrados as médias e os desvios padrão, relativos às medidas de área, considerando-se as cinco coletas e o mesmo tratamento.

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de área das cabeças dos espermatozoides durante as cinco semanas analisadas no mesmo tratamento.

Tratamentos	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	6,45±2,68 a	5,41±1,71 b	4,93±1,33 c	5,59±1,38 d	5,69±1,46 e
T2	6,64±2,67 a	5,30±1,54 b	5,16±1,92 bc	5,63±1,68 d	5,49±1,42 cd
T3	5,79±2,02 a	4,95±1,54 b	4,75±1,16 c	5,63±1,36 a	5,75±1,36 a

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Figura 4 – Média dos valores de área durante as semanas de coletas e análises.



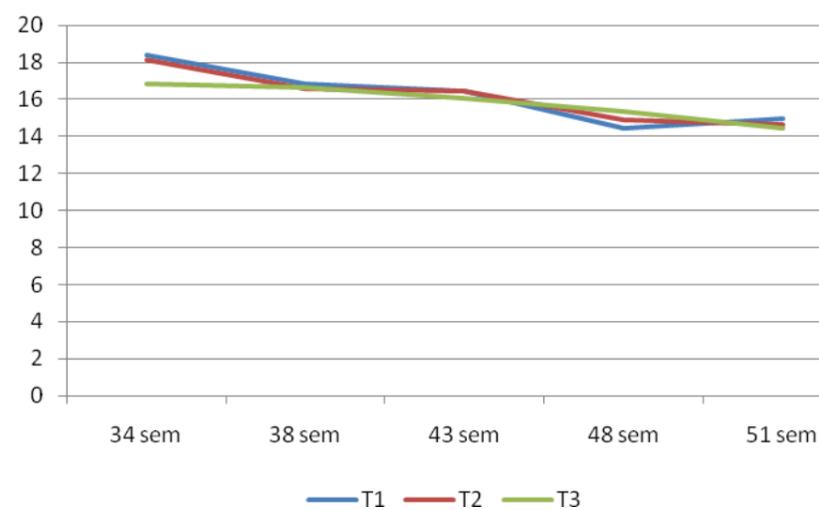
Na tabela 8, estão demonstrados as médias e os desvios padrão do perímetro analisados nas cinco coletas dentro do mesmo tratamento.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão do perímetro das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas no mesmo tratamento.

Tratamentos	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	18,42±1,49 a	16,86±1,61 b	16,48±1,13 c	14,44±1,81 d	14,99±2,62 e
T2	18,11±1,47 a	16,60±0,97 b	16,43±1,61 b	14,87±2,46 c	14,62±2,20 c
T3	16,85±1,46 a	16,63±0,95 b	16,03±1,04 c	15,38±2,32 d	14,47±2,28 e

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Figura 5 – Médias e desvio padrão do perímetro da cabeça dos espermatozóides dos galos no decorrer das coletas no mesmo tratamento.



Os resultados da figura 4 mostram que os valores de área da cabeça dos espermatozoides foram maiores na primeira coleta, diminuindo na segunda e terceira coletas, e aumentaram novamente na quarta e quinta coleta, após as 48 semanas.

Na figura 5, podemos observar que o perímetro da cabeça dos espermatozóides foi decrescendo conforme a idade.

Os resultados de área e perímetro concordam com um estudo de Rodrigues, Rocha e Beletti (2009), que afirmaram que galos novos apresentaram as variáveis de tamanho de cabeça maiores que os galos velhos. Essa diferença pode ser justificada pela presença de um maior número de alterações morfológicas, independentes das alterações de cromatina nos espermatozoides dos galos jovens.

O tamanho da cabeça dos espermatozóides interfere na fertilidade, pelo fato de que os espermatozóides com cabeças maiores são mais vulneráveis a sofrerem lesões no momento em que estão armazenados na espermateca da fêmea, durante a oviposição. Isto ocorre, pois as cabeças dos espermatozóides maiores ficam mais evidentes e sobressalentes durante a passagem do ovo.

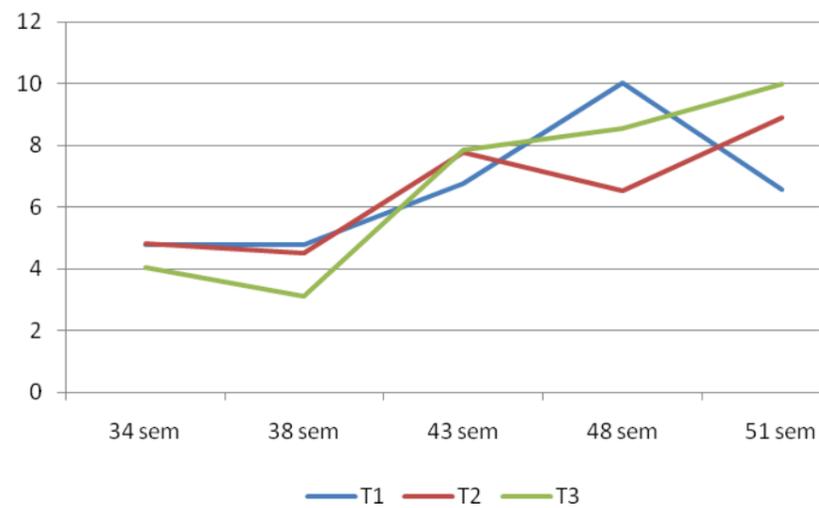
Na tabela 9, estão demonstrados as médias e os desvios padrão, relativos ao DIF, considerando-se as cinco coletas dentro do mesmo tratamento.

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão do DIF das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas, considerando o mesmo tratamento.

Tratamentos	Idade (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	4,78±3,62 a	4,77±4,58 a	6,78±4,96 b	10,01±7,37 c	6,57±6,58 b
T2	4,84±3,92 a	4,52±3,41 a	7,79±5,99 b	6,53±5,53 c	8,89±6,77 d
T3	4,03±3,68 a	3,11±3,79 b	7,85±5,77 c	8,54±5,32 c	9,97±10,1 d

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Figura 6 – Médias e desvio padrão do DIF da cabeça dos espermatozóides dos galos no decorrer das coletas, considerando o mesmo tratamento.



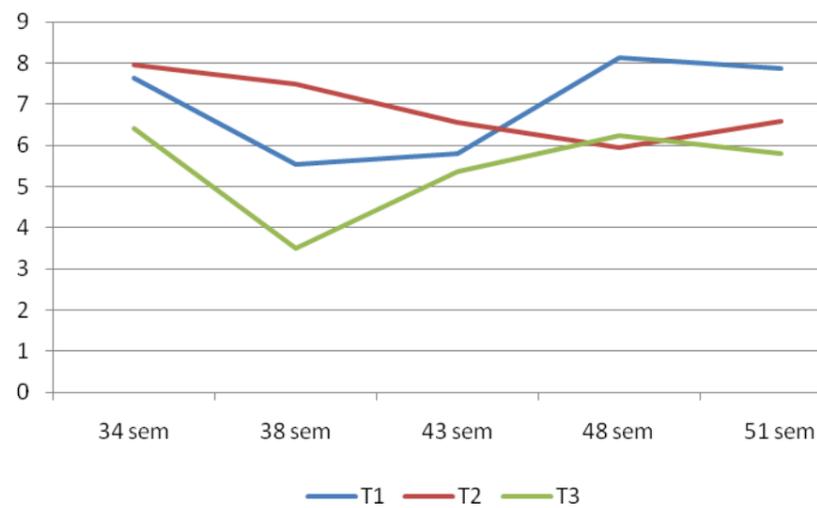
Na tabela 10, estão demonstrados as médias e os desvios padrão, relativos às medidas de CV, considerando-se as cinco coletas dentro do mesmo tratamento.

Tabela 10. Valores médios e desvio padrão do CV das cabeças dos espermatozóides durante as cinco semanas analisadas, considerando o mesmo tratamento.

Tratamentos	Idades (Semanas)				
	34 sem	38 sem	43 sem	48 sem	51 sem
T1	7,63±2,09 a	5,53±2,61 b	5,81±3,37 b	8,14±5,30 a	7,88±4,55 a
T2	7,96±3,38 a	7,50±2,87 b	6,55±3,05 c	5,96±3,29 d	6,58±2,69 c
T3	6,41±2,14 a	3,51±1,88 b	5,37±2,71 c	6,25±3,34 a	5,81±2,70 d

Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre valores, segundo teste t de Student ($p \leq 0,05$).

Figura 7 – Médias e desvio padrão do CV da cabeça dos espermatozoides dos galos no decorrer das coletas, considerando o mesmo tratamento.



Foram observadas diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$), com relação à idade entre todas variáveis analisadas.

Conforme mostrado nas figuras seis e sete, independente da dieta utilizada, os galos apresentaram alterações na compactação da cromatina com o decorrer da idade.

Segundo este estudo, quanto mais velhos os galos, maiores os valores de Dif% e CV, ou seja, maior a diferença da coloração das cabeças analisadas em relação a coloração das cabeças consideradas padrão e pior a homogeneidade da coloração das cabeças. Porém, para o T2 os valores de CV diminuíram com o aumento da idade dos galos. Estes dados mostram que os galos que se alimentaram com maior nível de energia metabolizável e 15% de PB em media, apresentaram menores alterações que desuniformizassem a coloração da cabeça dos espermatozoides.

Quanto ao tamanho da cabeça dos espermatozoides, conforme os galos ficaram mais velhos o perímetro da cabeça dos mesmos diminuiu já a área da cabeça foi menor para os animais com 38 a 43 semanas, voltando a aumentar com 48 semanas.

A fertilidade e eclosão foram menores com o avanço das idades dos galos, estes resultados confirmam a hipótese de que galos mais velhos possuem maiores

alterações intrínsecas ao espermatozóide, fertilidade diminuída com conseqüente diminuição da eclosão.

Os resultados mostrados neste trabalho concordam com trabalhos realizados por outros autores em relação às variáveis tamanho (área e perímetro) da cabeça e Dif.% (RODRIGUES et al, 2009). Galos mais jovens apresentam tamanho da cabeça maior que galos velhos.

Essa diferença encontrada do tamanho da cabeça do espermatozóide pode ser justificada pela presença de maior número de alterações morfológicas, e que estas são independentes das alterações na compactação de cromatina dos espermatozoides dos galos mais jovens (SOARES E BELETTI, 2006).

No caso do T1 e T2, os galos mais velhos apresentaram maiores valores de Dif%, sendo que no T1 as alterações nos espermatozoides com relação a uniformidade da coloração das cabeças dos mesmos (CV) foram maiores do que as observadas no T3.

Comparando as alterações de compactação de cromatina com fertilidade e eclosão de todas as coletas, quanto mais velhos os galos menor fertilidade, menor eclosão e maior número de espermatozoides com alterações de Dif% e CV. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores (RODRIGUES et al, 2009), mostrando a importância desta característica na fertilidade dos galos.

É importante ressaltar que além de características intrínsecas ao espermatozóide, características extrínsecas relacionadas a fertilidade com baixa mortalidade, turbilhonamento e vigor dos espermatozoides também influenciam para queda de fertilidade (ROCHA JUNIOR e BAIÃO, 2011). Assim, para a avaliação da fertilidade diversos fatores devem ser analisados até chegar a um diagnóstico conclusivo.

5. CONCLUSÃO

Os galos alimentados com maior nível de proteína (15%) apresentam melhores resultados em relação à compactação e a densidade da cromatina das cabeças dos espermatozoides. Este mesmo grupo apresenta valores de tamanho de espermatozoides menores, o que indica menores alterações morfológicas.

Não foi possível correlacionar a eclosão e fertilidade com os demais dados, pois neste estudo não houve diferença significativa entre os três tratamentos.

Independente da dieta utilizada, os galos apresentam alterações na compactação da cromatina com o decorrer da idade, sendo que os galos alimentados com 13.8% de proteína bruta e 2750 Kcal de EM/Kg, apresentam maiores alterações na cromatina compactada.

Galos mais velhos possuem maiores alterações da cromatina, que não foram acompanhadas pelo aumento do tamanho da cabeça dos espermatozoides. Essas alterações estão relacionadas com queda de fertilidade e eclosão. O método de análise da morfometria das cabeças de espermatozoides é um método confiável, pois exclui a subjetividade do avaliador, porém sua utilização a campo deve ser sempre associada a fatores extrínsecos como manejo com o galo e sanidade do plantel.

REFERÊNCIAS

AITKEN R.J. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.19-24, 1994.

AGROCERES. *Manual de manejo de matrizes agross 308*. <http://pt.aviagen.com/assets/TechCenter/Ross_PS/ROSS_308_Manual.pdf> Acesso em 15 de setembro 2011.

BALHORN R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journey of Cell Biology*, 93:298–305, 1982.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.*, v.8, p.227-235, 2007.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*, v.62, p.398-402, 2004.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.22, p.85-90, 2005a.

BERTECHINI, A.G. *Nutrição de monogástricos*. Lavras: UFLA/ FAEPE, 1998. 193p.

BONGALHARDO D.C. et al. Isolation and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. *Poultry Science*, v.81, p.1877-1883, 2002.

BORGES, C.A.Q. et al. Exigência de proteína e composição da carcaça de galos reprodutores de 27 a 61 semanas de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.35, n.5, p. 1971 – 1977, 2006.

BORGES, C. A. Q. et al . Exigências de energia e composição da carcaça de galos reprodutores pesados em função do consumo energético na fase de reprodução. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 35, n. 5, Oct. 2006.

BRAMWELL, R.K., McDANIEL, C.D., BURKE, W.H. et al. Influence of male broiler breeder dietary energy intake on reproduction and progeny growth. *Poultry Science*, v.75, p.767-775, 1996.

BRILLARD, J.P., McDANIEL, G.R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poultry Science*, v.64, p.155-158, 1985.

BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, v.16, n.1, p.19-24. 1937.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Avaliação das características seminais de galos selecionados para a reprodução pelo desenvolvimento da crista. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.38, n.4, p.177-183, 2001.

CEROLINI, S. et al. Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol Reprod* v.57, p.976-980, 1997.

DANIKOWSKI, S.; SALLMANN, H.P.; HALLE, I. et al. Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.86, p.376-382, 2002.

DUNCAN I. J. H. et al. Sexual behaviour and fertility in broiler breeder domestic fowl. *Applied Animal Behavior Science* 1990; 26: 201-203.

EDENS, F.W. Effect of environmental stressors on male reproduction. *Poultry Science*, v.62, p.1676-1689. 1983.

EVENSON, D.P. et al. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v.210, p.1131-1133, 1980.

GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. *Acta Vet. Scand.*, v.7, p.1-20, 1966.

GRANER, E. A. *Estatística*. Ed Melhoramentos. São Paulo, 1966, 187 p.

HOCKING, P.M. Effect of dietary crude protein concentration on semen yield and quality in male broiler breeder fowls. *British Poultry Science*, v.30, p.935-945, 1989.

JOSEPH N. S. et al. Effect of dietary protein intake during the pullet to breeder transition period on early egg weight and production in broiler breeders. *Poultry Science* 2000; 79: 1790 – 1796.

LAKE, P. E. Recent progress in poultry reproduction. *World's Poultry Science Journal*, v.45, p.53-59, 1989.

LUCCA, W. et al . Efeito de dois níveis de proteína para machos reprodutores de corte com e sem retirada da crista. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 39, n. 1, fev. 2009 .

MACARI, M. et al.. MANEJO DE MATRIZES PESADAS, *Facta*. Edição: 2ª/2005; Capítulo 5: 78 – 105.

MURAKAMI, A.E.; GERCIA, E. R. M. Importância da reprodução das aves no sistema produtivo brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. *Anais...* Goiânia: CBRA, 2005.

NAKANO, M. et al. Conformation of the fowl protamine, galline, and its binding properties to DNA. *J. Biochem.*, v.105, p.133-137, 1989.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update*, v.13, p.417-435, 2006.

ROCHA JÚNIOR, J.M.; BAIÃO, N.C. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, p.683-685, 2011

RODRIGUES, A. C. N. et al. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.61, n.6, p.1302-1307, 2009.

ROSENSTRAUCH, A., EGEN, A.A., FRIEDLÄNDER, M. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. *Biology of Reproduction*, v.50, p.129-136, 1994.

RODENAS, C.E.O. et al. Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. *Cienc. Agrotec.*, v.29, p.160-167, 2005

RUTZ, F. et al. MANEJO DE MATRIZES PESADAS, *Facta*. Edição: 2ª/2005; Capítulo 6 pagina 106.

SHAMAN, J.A. et al. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch. Androl.*, v.53, p.135-140, 2007.

SCHEUERMANN, G. N. et al., Níveis de proteína em dietas de galos de matrizes de frango de corte. Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola. 1998, Campinas *Anais...Campinas*– SP, 1998.

SEXTON, K.J., RENDEN, J.A., MARPLE, D.N. et al. Effect of dietary energy on semen production, fertility, plasma testosterone, and carcass composition of broiler breeder males in cages. *Poultry Science*, v.68, p.1688-1694, 1989.

SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica*, para as ciências do comportamento. Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, 1975. 350 p.

SILVA, R.T. Correlação da morfometria e da compactação da cromatina de espermatozoides de touro zebuino sobre a taxa de clivagem e formação de blastocistos em programas de produção "in vitro". 2006. 37f. *Dissertação* (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada de duas idades. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 543-553, 2006a.

SOARES, J.M., BELETTI, M. E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* .São Paulo, v. 43, n. 4, p. 554-560, 2006b.

SOBIOLOGIA. *Espermatozoides*. Acessado em: 29/10/2011
<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/embriologia/reproducao4.php>

SURAI, P.F. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. 16th European Symposium on Poultry Nutrition Surai PF. Nottingham University. UK, 2002.

TARDIN, A.C. Novos conceitos de alimentação de matrizes pesadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.27, p.36-70, 1990.

WILSON, H.R. PIESCO, N.P. MILLER, E.R. et al. Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. *World's Poultry Science Journal*, v.35, p.95-118, 1979.

WILSON, J.L. Métodos para valorar la capacidad reproductiva en gallos reproductores. *Avic. Prof.*, v.6, p.76-81, 1988.

WISHART G.J. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. *Jorney Reproductive Fertility*, v.71, p.113-118, 1984.

**ANEXO A – QUANTIDADE DE PROTEÍNA E ENERGIA FORNECIDA
SEMANTALMENTE NOS TRATAMENTO 1, 2 E 3.**

TRATAMENTO 1

Semana	Gramas/Ave/Dia	Proteína (grs/semana)	Energia (Kcal/semana)
22	143	138	2753
23	143	138	2753
24	147	142	2830
25	152	147	2926
26	152	147	2926
27	152	147	2926
28	152	147	2926
29	152	147	2926
30	152	147	2926
31	152	147	2926
32	154	149	2965
33	154	149	2965
34	154	149	2965
35	154	149	2965
36	156	151	3003
38	156	151	3003
40	158	153	3042
42	158	153	3042
44	160	155	3080
46	160	155	3080
48	160	155	3080
50	160	155	3080
52	160	155	3080
54	162	156	3119
56	162	156	3119
58	164	158	3157
60	164	158	3157
62	164	158	3157
64	166	160	3196
66	166	160	3196

TRATAMIENTO 2

Semana	Gramas/Ave/Dia	Proteina (grs/semana)	Energia (Kcal/semana)
22	125	131	2494
23	132	139	2633
24	137	144	2733
25	142	149	2833
26	142	149	2833
27	142	149	2833
28	142	149	2833
29	142	149	2833
30	142	149	2833
31	144	151	2873
32	144	151	2873
33	144	151	2873
34	144	151	2873
35	144	151	2873
36	146	153	2913
38	146	155	2913
40	146	155	2913
42	148	157	2953
44	148	157	2953
46	148	157	2953
48	148	157	2953
50	150	160	2993
52	152	162	3032
54	152	162	3032
56	154	164	3072
58	154	164	3072
60	156	166	3112
62	156	153	3112
64	158	155	3152
66	158	155	3152

TRATAMIENTO 3

Semana	Gramas/Ave/Dia	Proteina (grs/semana)	Energia (Kcal/semana)
22	131	138	2476
23	138	145	2608
24	143	150	2703
25	148	155	2797
26	148	155	2797
27	150	158	2835
28	150	158	2835
29	150	158	2835
30	150	158	2835
31	152	160	2873
32	152	160	2873
33	152	160	2873
34	152	160	2873
35	154	162	2911
36	154	162	2911
38	154	162	2911
40	154	162	2911
42	156	164	2948
44	156	164	2948
46	156	164	2948
48	156	164	2948
50	156	164	2948
52	158	166	2986
54	159	167	3005
56	159	167	3005
58	159	167	3005
60	160	168	3024
62	161	169	3043
64	162	170	3062
66	162	170	3062