

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE MATRIZES DE FRANGO
DE CORTE SUPLEMENTADAS COM CANTAXANTINA

Érica Crosara Ladir de Lucca

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE MATRIZES DE FRANGO
DE CORTE SUPLEMENTADAS COM CANTAXANTINA

Érica Crosara Ladir de Lucca

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS - BRASIL
Julho de 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L934e Lucca, Érica Crosara Ladir de, 1984
2017 Eficiência reprodutiva de matrizes de frango de corte suplementadas
com cantaxantina / Érica Crosara Ladir de Lucca. - 2017.
85 p. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Frango de corte - Teses. 3. Cromatina -
Teses. 4. Carotenoides - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ÉRICA CROSARA LADIR DE LUCCA – nascida em 06 de julho de 1984, em Uberlândia – MG. Em 2008 concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia, e no mesmo ano concluiu o curso tecnólogo de Gestão em Agronegócio. Em 2007 iniciou seu estágio supervisionado na Sadia S/A, na área de matrizes de frango de corte e em abril de 2008 foi efetivada como médica veterinária sanitaria das granjas de matrizes de frango de corte. Trabalhou na Sadia S/A por 5 anos, e neste período atuou nas áreas de matrizes e incubatório de frango de corte, supervisora e sanitaria das granjas de matrizes perus e incubatório, e ainda teve experiência nas granjas de avós de frango, aves SPF, e integração de frango de perus de corte. Em 2012 concluiu o mestrado em Produção animal, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Lourenço, na Universidade Federal de Uberlândia. Em 2012, começou a dar aulas na Universidade Presidente Antônio Carlos em Uberlândia, para os cursos de Medicina Veterinária, Administração, Contabilidade e Gestão em Agronegócio. Em 2013, residiu na Espanha para trabalhar no Labdial, laboratório do grupo EW, em um projeto que teve duração de três meses, para implantação de melhorias nas técnicas de diagnóstico. Em abril de 2013, assumiu a função de coordenadora técnica de avicultura da empresa Farmabase Saúde Animal, e teve oportunidade de viajar por vários estados do Brasil, conhecendo a avicultura nacional. Em 2014, foi aprovada em concurso para professor de ensino básico, técnico e tecnológico no Instituto Federal de Triângulo Mineiro, Campus Uberaba, para assumir a disciplina de avicultura.

Ainda assim, quem bebe da fonte do conhecimento, permanece com sede!

Érica Crosara

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade diária de estar com minha família, amigos, no meu trabalho e desenvolvendo minhas atividades.

Aos meus Pais, Regina e Jamel, por toda os ensinamentos, princípios e pela luta. E aos meus irmãos Fernanda, pela singularidade de ser e pela amizade e ao Juliano, pela alegria de viver e por nos ter dado a Alice.

Ao meu marido Ronald pela compreensão, incentivo, parceria e por dividir comigo todos os momentos.

Aos meus avós Hermenegildo e Teresinha, que são mais do que presença física e por muitas vezes foram mais do que meus avós.

Às minhas amigas, Patrícia Calixto, Patrícia Teixeira, Paula Braga, por serem mais que amigas, e sim grandes parceiras profissionais.

Aos meus colegas do IFTM, por toda a compreensão e apoio nesta etapa a ser concluída.

Ao meu orientador Prof. Beletti, por todo o aprendizado, paciência, incentivo e parceria.

A Granja Regina, em especial ao Eduardo Butolo, pelo apoio e incentivo a pesquisas e melhorias no setor.

Ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Prof. Ednaldo, pela grande ajuda e pelos ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Sávio pela grande ajuda.

A Célia, pela sua excelência em atender-nos, mesmos nos momentos mais adversos.

Agradeço aos membros da banca, que se disponibilizaram a ler este trabalho e auxiliar com seus conhecimentos.

Aos que me inspiram. Não consigo citar todos, são muitos(as), e certamente eles(as) sabem que tenho como referência estes grandes mestres.

E por fim, agradeço a minha filha Antonela, que me deu um novo significado a vida!

Lucca, Érica Crosara Ladir, 2017. Eficiência reprodutiva de matrizes de frango de corte suplementadas com cantaxantina. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias. UFU. Uberlândia, MG.

RESUMO

A oferta da carne de frango no Brasil, tem acompanhado o crescimento da demanda interna e externa, graças ao aumento da competitividade e produtividade. Para atender aos mercados, as empresas de genética têm trabalhado a fim de melhorar os índices zootécnicos do setor, como os de fertilidade e eclosão das matrizes. Neste contexto, é fundamental atender ótimos padrões de fertilidade e eclosão. Os radicais livres, presentes no processo produtivo e reprodutivo pode causar danos através da oxidação de lipídeos e alterações no DNA, causando disfunção e morte celular. A inclusão de substâncias com propriedades antioxidantes na dieta de matrizes auxilia o sistema de defesa enzimática no controle dos danos causados pelos radicais livres nas células, como exemplo, os espermatozoides dos galos. Os carotenoides são um exemplo desse tipo de substância porque possuem atividades antioxidantes, pigmentares, provitamínicas e imunomoduladoras. A cantaxantina, pertencente ao grupo dos carotenoides desempenha um importante papel antioxidante porque remove os radicais livres, absorve e dissipa o excesso de energia e recicla a vitamina E. Estudos têm demonstrado que este aditivo pode ajudar a reduzir eficazmente a peroxidação lipídica em vários tecidos e em embriões de aves, melhorando também o índice de fertilidade em lotes de matrizes de frango de corte em idade avançada. Objetivou-se nesta pesquisa, estudar a ação da cantaxantina sobre a eficiência reprodutiva de matrizes de frango de corte. Avaliou-se as taxas de eclosão, fertilidade, número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínea dos ovos, desenvolvimento testicular através de mensurações dos túbulos seminíferos, e a compactação de cromatina dos espermatozoides dos galos. A pesquisa foi conduzida em galpão convencional de produção de matrizes pesadas, onde as rações experimentais foram ofertadas a partir da 22ª semana de vida. Para o experimento houve a suplementação ou não de 6ppm de cantaxantina, segundo os tratamentos: Tratamento 1 - 10.500 fêmeas e 1.500 machos, alojados em um galpão com suplementação de cantaxantina (6 ppm), a partir da 22ª semana de vida; Tratamento 2 - 10.500 fêmeas e 1.500 machos, alojados em um galpão sem suplementação de cantaxantina. Foram analisadas nas semanas 30, 40 e 50 de idade,

as taxas de eclosão e a taxa de perfuração espermática na membrana perivitelínea, nas semanas 30 e 50 foi analisado o grau de compactação de cromatina dos espermatozoides, na semana 40, o desenvolvimento testicular dos machos, e a fertilidade a partir das 50 semanas de vida do lote. Foram encontradas diferenças, entre o número de perfurações espermáticas, obtidos nas, 30, 40 e 50 semanas de idade, sendo que nas três idades observadas, a maior taxa de perfuração dos espermatozoides ocorreu no lote suplementado com cantaxantina. Também foi verificado, neste estudo, melhores taxas de eclosão na idade de 35 a 45 semanas de vida das aves, e maior taxa de fertilidade após as 50 semanas de vida, período em que a análise de fertilidade foi possível de ser realizada a campo. Com relação ao tempo de vida analisado, o comportamento da média de perfurações na membrana perivitelínea dos ovos foi semelhante, apresentando queda proporcional na última semana testada. Os resultados da compactação de cromatina dos espermatozoides indicaram maior grau de descompactação parcial ou total de galos não suplementados com a cantaxantina. Quando se analisou a idade, o tratamento que recebeu o antioxidante na dieta apresentou menores alterações na compactação de cromatina nas 50 semanas de vida, comparado a semana 30. Isto sugere que a adição do antioxidante foi importante para a proteção dos efeitos da idade sobre os padrões de eficiência reprodutiva. Na semana 30 de vida dos galos, a probabilidade de se observar alterações na compactação da cromatina de espermatozoides dos galos não suplementados com cantaxantina é de 1,82 vezes maior do que nos galos suplementados, já na semana 50, essa probabilidade aumenta para 5,78 vezes, sendo neste caso, maior a chance de se observar alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides de galos que não receberam o antioxidante na dieta. Concluiu-se que o uso da cantaxantina como agente antioxidante na dieta, pode minimizar os efeitos deletérios dos radicais livres sobre os espermatozoides, incluindo alterações na cromatina espermática.

Palavras-chave: Cantaxantina, Cromatina, Eclosão, Fertilidade, Matrizes frango de corte; reprodução.

Lucca, Érica Crosara Ladir, 2017. Reproductive efficiency of broilers breeders supplemented with canthaxanthin. Doctoral thesis in Veterinary Sciences. UFU. Uberlândia, MG.

ABSTRACT

The supply of chicken meat in Brazil has accompanied the growth of domestic and foreign demand to attend the increased competitiveness and productivity. In order to serve the markets, genetics companies have been working to improve the zootechnical indexes of the sector, such as fertility and hatching of the broilers breeders. In this context, it is essential to meet excellent standards of fertility and hatching. Free radicals, present in the productive and reproductive process can cause damage through the oxidation of lipids and DNA alterations, causing dysfunction and cell death. The inclusion of substances with antioxidant properties in the diet assists the enzyme defense system in controlling the damage caused by free radicals in cells, such as the spermatozoa of the male. Carotenoids are an example of this type of substance because they have antioxidant, pigmentary, provitamin and immunomodulatory activities. Canthaxanthin is a member of the carotenoid group and it is an important antioxidant because it removes free radicals, absorbs and dissipates excess energy, and recycles vitamin E. Studies have shown that this additive can help to effectively reduce lipid peroxidation in various tissues and In embryos of birds, also improving the fertility index in lots of broiler chicken matrices in old age. The objective of this research was to study the action of canthaxanthin on the reproductive efficiency of broiler breeders. The rates of hatching, fertility, number of sperm perforations in the peri-egg membrane of the eggs, testicular development through measurements of the seminiferous tubules, and the chromatin compaction of the spermatozoa of the male were evaluated. The research was carried out in a conventional house for the production of heavy breeders, where the experimental feeds were offered from the 22nd week of life. For the experiment, the following treatments were used: Treatment 1 - 10,500 females and 1,500 males, housed in a shed with canthaxanthin supplementation; Treatment 2 - 10,500 females and 1,500 males, housed in a shed without 6 ppm of canthaxanthin in the diet from 22 weeks of age. Hatching rates and sperm perforation rate in peri-egg membrane were analyzed at weeks 30, 40 and 50, at weeks 30 and 50 the degree of sperm chromatin compaction was analyzed, at 40 weeks the testicular development of males , And fertility after 50 weeks of batch life.

Differences were found between the number of sperm perforations at 30, 40 and 50 weeks of age, and at the three ages observed, the highest sperm perforation rate occurred in the batch supplemented with canthaxanthin. In this study, we also observed better hatch rates at the age of 35 to 45 weeks of bird life, and a higher fertility rate after 50 weeks of life, during which fertility analysis was possible to be performed in the field. Regarding the life time analyzed, the behavior of the mean perforations in the peri-egg membrane of the eggs was similar, presenting a proportional drop in the last week tested. The results of chromatin compaction of spermatozoa indicated a higher degree of partial or total decompression of roosters not supplemented with canthaxanthin. When analyzed for age, antioxidant treatment in the diet showed smaller changes in chromatin compaction at 50 weeks of age compared to week 30. This suggests that the addition of the antioxidant was important in protecting the effects of age on the Patterns of reproductive efficiency. At week 30 of rooster life, the probability of observing changes in sperm chromatin compaction of roosters not supplemented with canthaxanthin is 1.82 times higher than in supplemented roosters at week 50, this probability increases to 5, 78 times, in this case, the greater the chance of observing changes in the chromatin compaction of the spermatozoa of roosters that did not receive the antioxidant in the diet. It was concluded that the use of canthaxanthin as an antioxidant in the diet can minimize the deleterious effects of free radicals on spermatozoa, including changes in sperm chromatin.

Palavras-chave: Broiler Breeder, Canthaxanthin Chromatin, Fertility, Hatching, Reproduction.

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	11
II.	OBJETIVOS	15
III.	REVISÃO DE LITERATURA	16
IV.	MATERIAL E MÉTODOS	41
V.	RESULTADOS	47
VI.	DISCUSSÃO	54
VII.	CONCLUSÃO	63
VIII.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro cresce a cada ano, representando cerca de 23% do Produto Interno Bruto. De janeiro a setembro de 2016, por exemplo, acumulou crescimento de 4%, devido ao crescimento de alguns produtos como o frango abatido que cresceu em média 3,8%. A avicultura corresponde a 20% deste PIB do agronegócio brasileiro (CNA, 2017).

Neste contexto, temos o destaque para a cadeia de produção de carne de frango de corte brasileira como uma das mais importantes do mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, ficando atrás apenas dos EUA e da China. E, desde 2010, ocupa a liderança mundial na exportação de carne de frango. (ABPA, 2017).

A oferta de carne de frango brasileira tem acompanhado o crescimento da demanda interna e externa, graças ao aumento da competitividade e produtividade. Para atender aos mercados, as empresas de genética têm trabalhado a fim de melhorar os índices zootécnicos do setor, como os de fertilidade e eclosão das matrizes.

DUARTE et al (2015), afirmaram que para maximizar a rentabilidade da cadeia de produção de frangos de corte, é necessário aumentar a produção de ovos e as taxas de eclosão para obter descendentes mais viáveis.

Para a avicultura moderna, atender ótimos padrões de fertilidade é fundamental, pois uma das metas da indústria avícola é a produção de progênie de alta qualidade: tanto no setor de aves de corte quanto no de postura, pois cada pinto produzido possui grande valor econômico (BONGALHARDO, 2013).

Todo este avanço na avicultura industrial deve ser acompanhado por práticas adequadas de manejo, sanidade e nutrição, para que o máximo potencial genético seja expresso.

Quando se trata de manejo nutricional, a utilização de aditivos na ração é uma prática adotada e consolidada, visando o atendimento das exigências do alto valor genético. DUARTE et al (2015) citou que a inclusão de substâncias com propriedades antioxidantes na dieta de matrizes auxilia o sistema de defesa enzimática no controle dos danos causados pelos radicais livres nas células, como exemplo, os espermatozoides dos galos.

Os radicais livres são elementos presentes nos processos produtivos e reprodutivos da avicultura, podendo causar danos através do processo de oxidação dos sistemas biológicos. Os lipídeos presentes nos sistemas biológicos são oxidáveis em diferentes graus (NELSON & COX, 2006). Da mesma forma é importante salientar que os radicais livres podem causar danos diretos e indiretos à cromatina, variando desde alterações na compactação a alterações no DNA (OPUWARI e HENKEL, 2016).

As reações de oxidação de lipídeos em sistemas vivos, ocorrem principalmente em ácidos graxos que compõem os fosfolípidos presentes nas membranas e nas estruturas sub-celulares, levando ao seu rompimento e causando disfunções e morte celular (LAGUERRE et al. 2007; WÓJCIAK & DOLATOWSKI, 2012).

ROCHA et al, (2013), em sua pesquisa relatou que apesar dos ovos em casca serem considerados resistentes à oxidação lipídica, os lipídios da gema sofrem oxidação durante o período de armazenamento, podendo resultar em redução da energia disponível para o desenvolvimento do embrião, além de apresentar compostos tóxicos que poderia provocar a morte embrionária, fator este que impactou negativamente na taxa de eclosão dos ovos.

Outros autores também descrevem o efeito deletério nos ovos, no período de armazenamento, sendo quanto maior o período de armazenamento dos ovos, maior é a oxidação, tanto em condições refrigeradas (4°C) quanto em temperatura ambiente (25°C), sendo marcante o efeito da temperatura mais alta (FRANCHINI et al., 2002; CHERIAN et al., 2007; GIAMPIETRO et al., 2008).

OPUWARI e HENKEL (2016) que além das alterações nos lipídeos, os radicais livres podem causar danos diretos e indiretos no DNA de espermatozoides.

Tendo em vista que no processo de incubação artificial, que ocorre nas granjas de matrizes pesadas, uma prática de manejo comum é o armazenamento de ovos, para a formação dos lotes de incubação, se faz necessário uma atenção especial a práticas de manejo e nutrição que possam minimizar os efeitos negativos da prática de armazenamento, nos resultados de eclosão.

Em outro aspecto dos resultados reprodutivos, temos a fertilidade dos ovos. A infertilidade geralmente é medida como forma de se fazer gestão a campo e ainda experimentalmente, como resultado de testes de manejo ou nutrição que visam identificar oportunidades de melhoria na reprodução (TRIQUES, 2016).

Dentre os fatores intrínsecos ao espermatozoide que influenciam a

fertilidade, estão os lipídeos constituintes de sua membrana. Em todas as espécies, os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por conter grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados – PUFA, o que sugere que a composição de lipídios e ácidos graxos dos espermatozoides pode ser um fator determinante das taxas de fertilidade (MARTIN RILLO et al., 1996), uma vez que esse tipo de constituição favorece a peroxidação lipídica.

Quando se trata dos efeitos oxidantes na taxa de fertilidade, é sabido que o plasma seminal e os espermatozoides contêm enzimas e vitaminas antioxidantes que protegem a membrana espermática, rica em PUFA, da peroxidação (MAKKER et al., 2009). Já após ejaculado, as galinhas assumem o papel de proteção contra a oxidação, enquanto os espermatozoides permanecem estocados nos túbulos de estocagem seminal (BAKST et al., 2015). Esta atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides se torna menor com o envelhecimento dos galos e galinhas, o que pode contribuir para o declínio da fertilidade (ROCHA, 2013).

A presença de agentes oxidantes que podem ser deletérios aos processos de eclosão e fertilidade é conhecida (FERREIRA et al., 2010). Sendo assim, é ideal adotar práticas mitigatórias como a utilização de substâncias antioxidantes na dieta de reprodutores, para que, além de uma adequada transferência de nutrientes via ovo, a quantidade destes elementos, também, seja suficiente para reduzir os processos de oxidação em sistemas vivos (ROCHA et al., 2013), como o espermatozoide dos machos.

Os carotenoides são um exemplo desse tipo de substância porque possuem atividades antioxidantes, pigmentares, provitamínicas e imunomoduladoras (SURAI et al., 2003).

A cantaxantina, pertencente ao grupo dos carotenoides desempenham um importante papel antioxidante porque removem os radicais livres, absorvem e dissipam o excesso de energia e reciclam a vitamina E (ROCHA et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que a cantaxantina pode ajudar a reduzir eficazmente a peroxidação lipídica em vários tecidos e em embriões de aves (SURAI et al., 2003). Quando presente no ovo, ela é transferida para o embrião e pode protegê-lo contra o dano oxidativo durante os períodos de incubação e pós-eclosão (KARADAS et al., 2005).

O efeito da cantaxantina sobre a fertilidade é observado tanto na galinha quanto no galo. A melhoria na fertilidade por parte do galo pode ser devida a dois fatores: proteção antioxidante dos espermatozóides e aumento da vitamina A (RUTZ et al., 2007). Já nas galinhas auxilia o mecanismo antioxidante dos túbulos de estocagem seminal de armazenamento do esperma. (BAKST, 2011).

TRIQUES et al (2016), comprovou que a adição de cantaxantina na dieta de machos reprodutores de frango de corte na fase pós-pico pode ser uma ferramenta para melhorar o índice de fertilidade do lote de matrizes velhos, por proporcionar maior percentual de espermatozoides normais, além de características biométricas de crista, barbela e testículos serem superiores quando os machos receberam a suplementação.

Nesta perspectiva, o uso da cantaxantina adicionada à dieta de galos e galinhas, pode exercer seu papel antioxidante de três formas: 1) no embrião – protegendo os tecidos embrionários na incubação, 2) no ovo – protegendo os nutrientes da gema durante o armazenamento para o embrião em desenvolvimento e, 3) nas matrizes pesadas – auxiliando nos mecanismos antioxidantes do sêmen e oviduto e reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides (ROCHA et al, 2013).

Com base nas informações das pesquisas acima citadas, demonstrando o papel antioxidante da cantaxantina, e pelo fato desta ser um aditivo de possível comercialização na avicultura industrial, objetivou-se nesta pesquisa, estudar a sua ação sobre as taxas de eclosão e fertilidade de matrizes de frango de corte, utilizando técnicas de contagem de perfuração espermática, histomorfometria dos túbulos seminíferos e verificação do grau de compactação de cromatina dos espermatozoides.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência reprodutiva de matrizes de frango de corte suplementadas e não suplementadas com cantaxantina na dieta.

2.2 Objetivos específicos

Verificar o número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínea de ovos provenientes de lotes de matrizes pesadas suplementadas e não suplementadas com cantaxantina;

Quantificar alterações na compactação de cromatina dos espermatozoides de galos suplementados e não suplementados com cantaxantina, através das técnicas de microscopia eletrônica;

Analisar o desenvolvimento testicular através de mensurações do diâmetro e altura de epitélio dos túbulos seminíferos;

Observar as taxas de fertilidade e eclosão de lotes de matrizes de frango de corte suplementadas e não suplementadas com o aditivo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Reprodução na avicultura

O sistema reprodutivo das fêmeas é formado por ovário esquerdo desenvolvido, oviduto, que compreende as porções do infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina.

O ovário das aves difere dos mamíferos pelo seu tamanho e sua organização hierárquica. Nos mamíferos, diversos folículos podem ovular em um determinado momento dentro de um intervalo de vários dias ou semanas, enquanto que em aves um único folículo ovula e o óvulo é liberado dentro de um intervalo mais curto. Além disso, como as aves não sofrem gestação, o embrião deve obter todos os nutrientes para o seu desenvolvimento fora do corpo maternal. Este fato faz com que o óvulo maturo das aves seja muito maior que o de mamíferos, servindo como fonte energética e proteica durante o período inicial de desenvolvimento. Nas aves, os folículos grandes e amarelos, destinados a ovulação, estão organizados dentro de uma hierarquia (RUTZ et al., 2007).

Uma das principais funções dos ovários é a produção de hormônios esteroides, essenciais para o crescimento e função do trato reprodutivo. Dentre esses, está a progesterona, a qual estimula a secreção de albúmen no magno e indução do pico de LH. Os androgênios atuam em características sexuais secundárias (crista e barbeta). Os estrogênios desencadeiam a síntese da gema pelo fígado e a mobilização de cálcio dos ossos medulares para a formação da casca. Ao contrário de mamíferos, as células da granulosa são a principal fonte de progesterona e de pequenas quantidades de androgênios, enquanto que as células da teca produzem androgênios e estradiol. É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, pois não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, já que não há prenhes para manter (BAHR & JOHNSON, 1991).

Na ave em postura, o oviduto aparece como um tubo largo com dobras, altamente vascularizado e ocupa uma grande extensão na cavidade abdominal (MORENG & EVANS, 1990). Esta estrutura conduz o ovo fertilizado para a cloaca, adicionando a essas quantidades substanciais de nutrientes e, envolvendo o ovo com

membranas e casca, as quais conferem proteção ao embrião (DYCE, 1997). Esta estrutura também tem a função de transportar espermatozoides para a fertilização, podendo servir como local de armazenagem para estes, já que uma inseminação é suficiente para fertilizar os ovos liberados por até 21 dias (RODRIGUES et al., 2011).

Anatômica e funcionalmente o oviduto pode ser dividido em cinco regiões:

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

- Magno: Suas paredes apresentam pregas mucosas maciças, cobertas por glândulas que tem a função de adicionar cerca de metade do albúmen total ao ovo. Na extremidade distal do magno, as pregas mucosas são mais baixas, levando o ovo aproximadamente três horas para atravessar este segmento do magno (DYCE, 1997).

- Istmo: O istmo está situado entre o magno e o útero, é curto e estreito. Nesse segmento são secretadas as duas membranas da casca e o ovo permanece por cerca de uma hora e meia nesse local (BULL, 1994).

- Útero: O útero ou glândula da casca é uma região curta e dilatada em forma de bolsa. Sua parede mucosa apresenta pregas longitudinais e transversais que abrigam glândulas tubulares de estrutura semelhante às glândulas do magno (DYCE, 1997). É nessa porção que o ovo permanece o maior tempo, cerca de 20 horas. O processo mais importante que acontece nesta região é a calcificação da casca. O crescimento dos cristais de cálcio se dá a uma taxa de 300 mg de cálcio por hora. As tarefas finais do útero são a pigmentação e a formação da cutícula, camada externa à casca que tem função protetora (HAFEZ, 2004).

- Vagina: A vagina é um tubo muscular em forma de “S”, por onde o ovo passa rapidamente quando é expelido. Quando o ovo é posto, a abertura vaginal projeta-se

através do ânus, reduzindo o contato deste com as fezes (DYCE, 1997).

As espécies avícolas apresentam semelhanças no trato reprodutivo com outras espécies animais (ex. répteis) devido a presença de sítios especializados no trato feminino, no qual os espermatozoides residem durante períodos prolongados após uma cópula. Existem dois sítios distintos nas espécies avícolas, um localizado na junção útero-vaginal e o outro na porção inferior do infundíbulo.

Os espermatozoides residem nestes Túbulos de Estocagem Seminal (TES), que é uma invaginação do epitélio que reveste a superfície do lúmen do oviduto (BAKST et al., 1994; BAKST, 2011; FROMAN, 2011). O período de armazenamento de espermatozoides em galinhas é de no mínimo 21 dias, como constatado por RODRIGUES et al. (2011).

Normalmente células espermáticas entram nos TES e se orientam paralelamente. A aglutinação de cabeça com cabeça dos espermatozoides é uma das possíveis explicações para a manutenção prolongada *in vivo* dos espermatozoides nos TES (TINGARI & LAKE, 1973). Essa afirmação foi comprovada recentemente por FROMAN (2013), que constatou que dentro dos TES, os aglomerados de espermatozoides apresentaram um movimento sincronizado e lento, provavelmente para manter a sua posição contra um fluido (flowdirected - para o orifício de TES), como também descrito por BAKST (1994). Esse fluido pode ser gerado por aquaporinas, que tenham sido imunocitoquimicamente localizada na zona apical das células epiteliais da TES (ZANIBONI, 2004).

Na figura 1, está representada a disposição dos espermatozoides nos TES das fêmeas.

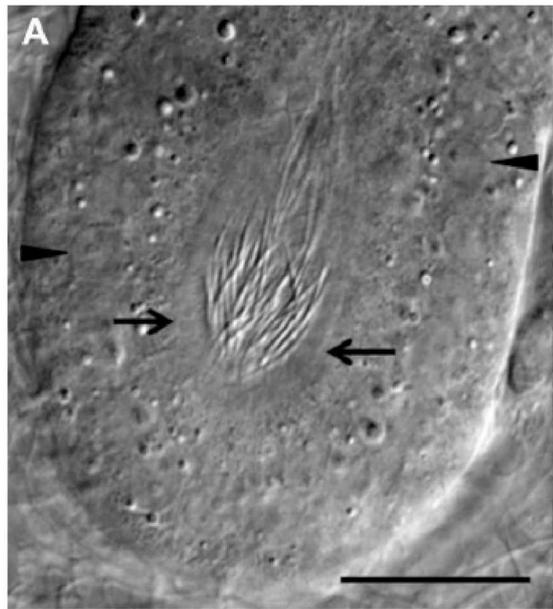


Figura 1. Junção útero-vaginal não fixada e analisada em microscópio de contraste, mostrando a porção final distal do TES com sptz no lúmen. O aglomerado de sptz está alinhado cabeça a cabeça conectado com a base da microvilosidadedos SST (setas). (Barra 20 mm). BAKST et al (2015).

Na figura 2, está ilustrada a fusão de macromoléculas presentes nos TES, que servem de suprimentos para o metabolismo dos espermatozoides dos galos, durante a sua permanência no oviduto da fêmea.

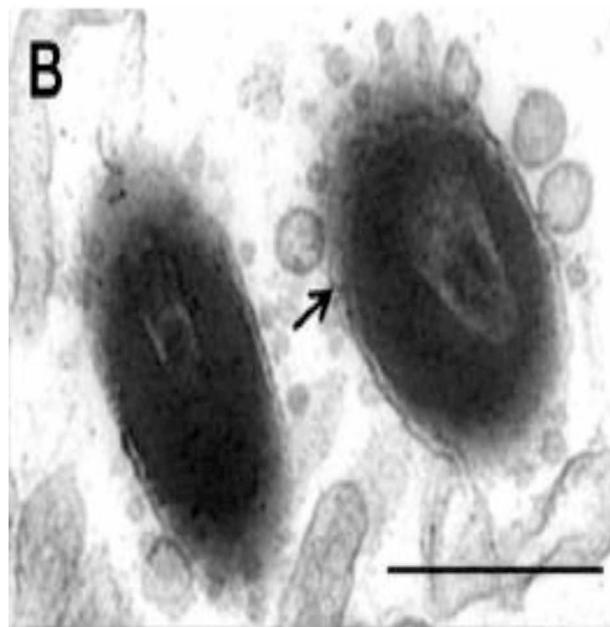


Figura 2. Vesículas que variam desde de 30-130 nm de diâmetro são observados se fundindo com a membrana plasmática acrossomal de dois sptz (seta). (barra 500 nm). (BAKST, et al, 2015).

Ao avançar a idade, a duração da fertilidade é reduzida após uma única inseminação ter sido realizada. No passado foi postulado que isto ocorria em função de uma redução na capacidade de armazenamento espermático nos TES (VAN KREY et al., 1967). Alternativamente, BRILLARD (1993) sugere que o declínio na duração da fertilidade com a idade resulta de uma maior facilidade da liberação dos espermatozoides dos TES.

O sistema reprodutivo dos galos é constituído por testículos, epidídimo, ductos deferentes, falos.

Os testículos de galos, em número de dois, correspondem a 1% do peso vivo das aves (STURKI & OPEL, 1976) e apresentam algumas particularidades que os diferem dos mamíferos. Eles estão localizados dentro da cavidade abdominal. Esta apresenta uma temperatura de 41-43°C e mesmo assim ocorre a espermatogênese. A hipótese que explica a formação espermatogênica nestas condições é a de que poderia haver um resfriamento dos testículos através dos sacos aéreos abdominais (RUTZ et al, 2007).

Diferente da disposição em mamíferos, os túbulos seminíferos não estão agrupados em lóbulos bem delineados circundados por tecido conjuntivo, mas sim ramificam-se e anastomosam-se livremente dentro da túnica albugínea. No galo adulto, extensões da túnica penetram entre os túbulos para agirem como estrutura de suporte. O tecido intersticial é desprezível, porém contém as células de Leydig, que são secretoras de androgênios. Os túbulos seminíferos de galos imaturos são alinhados por uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias. Já os machos maduros possuem túbulos de forma irregular alinhados por um epitélio germinativo de múltiplas camadas. As espermatogônias dão origem aos espermátócitos primários, secundários e espermátides. Estas últimas progressivamente se transformam em espermatozoides, por um processo denominado espermiogênese (BAKST & BAHR, 1995).

Os galos não possuem os epidídimos caracteristicamente enrolados e subdivididos como a maioria dos mamíferos. Os espermatozoides passam dos túbulos seminíferos, através dos túbulos retos, para os ductos eferentes. A partir dos dutos eferentes, os espermatozoides atravessam uma série de dutos conectados e são então transportados para o lúmen dos epidídimos. Em conjunto, estes dutos são denominados de região epididimária.

Assim, a região epididimária compreende os túbulos retos, dutos eferentes distais e proximais (dutos eferentes), um túbulo curto de conexão e o ducto do epidídimo (HESS et al., 1976). Em aves, ductos compõe mais do que 70% da região epididimária, sugerindo que os ductos eferentes representam um componente mais importante da região epididimária que o túbulo reto ou ducto epididimário (CLULOW & JONES, 1988). O epitélio dos dutos eferentes apresenta convoluções para aumentar a área de superfície do lúmen do ducto e consiste de células ciliadas e não ciliadas (ETCHES, 1996). As principais funções dos dutos eferentes em todas as espécies incluem reabsorção de fluido, transporte, concentração espermática e secreção proteica (ILIO & HESS, 1994).

O ducto do epidídimo abre-se dentro do ducto deferente o qual é o primeiro local de armazenamento de espermatozoides no galo. O ducto deferente é um tubo bastante enrolado, o qual na sua extremidade distal, torna-se reto e dilata-se levemente, passa através da parede da cloaca e termina como extensão semelhante a uma papila que se projeta dentro da cloaca.

Não existem órgãos acessórios tais como vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral associados ao ducto deferente. No galo que não tenha ejaculado, os espermatozoides atravessam o ducto deferente em cerca de 84 horas, ao passo que em machos que já ejacularam, os espermatozoides requerem 24 a 48 horas para atravessar (ETCHES, 1996).

O macho não tem um órgão penetrador (ex. pênis), porém um falo que faz contato com a vagina em eversão durante a cópula. A ereção do falo resulta em engurgitamento com um fluido semelhante a linfa derivado do corpo vascular paracloacal, uma extensão do falo localizado na parede da cloaca (ETCHES, 1996),

Endocrinologicamente, a espermatogênese e a esteroidogênese no testículo dependem de LH, FSH e androgênios (KIRBY, 1998). A puberdade é o período de produção de maiores taxas de espermatogênese e quando há maior produção de androgênios pelas células de Leydig. Estes eventos resultam da liberação de GnRH do hipotálamo, que faz com que a hipófise libere FSH e LH. Estas glicoproteínas se ligam a receptores, particularmente nas células de Sertoli e de Leydig. A sua ação ocorre através de quinases dependentes de AMPc, que regulam os eventos intracelulares. O FSH regula o número e a atividade das células de Sertoli, promove genes para a síntese de proteínas vitais e regula a produção de androgênios. A

inibina e activina são produzidas nos testículos e regulam a atividade do FSH através de feedback e ação parácrina. A inibina controla a ação de androgênios e inibe a secreção de FSH. A activina estimula a secreção de FSH (RUTZ et al., 2007). Ainda, a melatonina, hormônio produzido pela pineal, reduz a atividade gonadal ao inibir a secreção de LH, sugerindo a ação da melatonina no hipotálamo e/ou hipófise (ROZEMBOIM et al., 2002).

A formação do plasma seminal e a concentração do sêmen de galos resultam da reabsorção de líquidos no epidídimo, onde os espermatozoides permanecem por mais de 100 minutos (RITCHSON, 2013). Devido à ausência de glândulas acessórias, o ejaculado é composto por uma grande quantidade de células espermáticas suspensas em um pequeno volume de plasma seminal (WHITTOW, 2000), resultando em um sêmen muito concentrado, apresentando de um a cinco bilhões de espermatozoides por mL de ejaculado. Comparativamente, o suíno apresenta de 200 a 300 milhões de espermatozoides por mL, enquanto que no touro essa quantidade não passa de 1,2 milhões de espermatozoides por mL. O volume de sêmen produzido depende da linhagem e tamanho do galo, uma vez que, segundo Etches (1996), o volume de sêmen depende do tamanho do testículo e este, por sua vez, está relacionado com o peso corporal do galo.

3.2. Espermatozoides de galo e cromatina

O espermatozoide de galos é composto por acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (BURKE, 1996). A diferença dos espermatozoides de aves para os de mamíferos, segundo GILBERT (1982), é o fato de aqueles serem menores, com cabeças filamentosas e longas, e por não possuírem gota citoplasmática. Este autor descreve que a cabeça dos espermatozoides de galos é curva e mede de 12 a 13 μm de comprimento, e recoberta pelo capuchão do acrossoma (2 μm). A peça intermediária da cauda mede cerca de 4 μm de comprimento e o restante do comprimento do espermatozoide de 100 μm é composto pela peça principal da cauda. A porção mais larga do espermatozoide do galo mede aproximadamente 0,5 μm .

A morfologia espermática parece ser uma das mais importantes características qualitativas do sêmen (KUSTER et al., 2004). A avaliação pode ser um indicador básico para predizer a capacidade de fertilização do espermatozoide

(LUKASZEWICS, 1988), seleção de machos e também para definição de armazenamento em meios líquidos ou criopreservação para propósitos e inseminação artificial (DONOGUE & WISHART, 2000; LUKASZEWICS, 2002). A morfologia espermática pode também servir como um indicador de desordens na espermatogênese. No entanto, a avaliação da morfologia ainda não é utilizada como rotina de campo. Segundo Maciel (2006), as anomalias espermáticas são incompatíveis com a boa fertilidade e qualquer alteração nas características morfológicas dos espermatozoides pode comprometer a motilidade e sobrevivência espermática.

Segundo RUTZ et al (2007), os espermatozoides devem apresentar motilidade e sobreviver no ambiente vaginal para atravessar a vagina e alcançar as glândulas armazenadoras de espermatozoides, assegurando a disponibilidade espermática e a probabilidade de fertilização, fatores fundamentais para o sucesso da reprodução. Outros autores ratificam a importância da motilidade espermática para a fertilização (ALLEN & GRIG, 1957; FROMAN & FELTMAN, 1998; HOLSBERGER et al., 1998; KING et al., 2000). BOWLINGET al. (2003) correlacionaram a o menor percentual de anomalias espermáticas em galos com maior motilidade espermática.

Um dos fatores que mais interferem nas características seminais é a idade. É muito comum em granjas comerciais observar declínio progressivo da fertilidade após as 40 semanas de idade. O avançar da idade em um macho é acompanhado por uma redução no número de espermatozoides no ejaculado e no volume de sêmen, além de redução da motilidade, viabilidade e integridade do espermatozoide. Conseqüentemente, essas mudanças levam a um declínio da capacidade fertilizante do macho e pode também afetar sua preservação durante o armazenamento (IAFFALDANO et al., 2003).

RUTZ et al. (2005) citam uma identificação de ovos férteis a olho nu. Segundo esses autores, no momento em que ocorre a oviposição o embrião em desenvolvimento possui de 30.000 a 60.000 células já formadas, possibilitando a identificação. Este método é muito utilizado em incubatórios comerciais com o objetivo de avaliar a condição dos machos das granjas fornecedoras de ovos. Outro método, citado por BAKST et al., (2002), consiste na avaliação microscópica da membrana perivitelínica que cobre o disco germinativo, verificando perfurações espermáticas na primeira estrutura. Essas perfurações, segundo WACLAWEKET

al. (1998) nada mais são que orifícios hidrolisados pelos quais os espermatozoides penetraram no ovócito. Esse método é importante para comparar a fertilidade em situações experimentais ou de campo submetidas a diferentes variáveis.

Medidas não tão diretas também costumam ser aplicadas no campo para verificar a eficiência reprodutiva dos lotes, como avaliação das características sexuais secundárias. MCGARYBROUGH et al. (2005), relacionando características sexuais secundárias a fatores como fertilidade, peso dos testículos e penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica concluíram que há correlação positiva entre peso testicular e área de crista, assim como altura de crista e comprimento de barbela com penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica.

Além dos fatores já citados que influenciam na fertilidade, como linhagem e idade, outros fatores correlacionam-se positivamente ou negativamente com a fertilidade. O peso corporal de machos tem influência negativa direta na fertilidade quando se encontra muito acima ou muito abaixo do padrão estabelecido pela linhagem (MCDANIEL et al., 1981; DUNCAN et al., 1990). A própria dificuldade em realizar a cópula devido ao peso corporal elevado é um fator que faz com que a fertilidade do lote seja ruim. Uma maneira eficiente de manter o peso do macho próximo ao preconizado pela linhagem é fornecer ao macho uma ração exclusiva (e não a mesma que da fêmea) e garantir os procedimentos de manejo de arraçamento, como fornecimento da quantidade ótima de alimento para os machos (BRANDALIZE, 2005) e espaço de comedouro para os machos em função da idade das aves (BITTAR FILHO & RIBEIRO, 2005). A alta temperatura ambiental também diminui a fertilidade do lote, seja causando morte espermática (HOOD, 1999), provocando alterações na qualidade seminal ou reduzindo a concentração intracelular de íons (KARACA et al., 2002).

A estrutura da cromatina das células espermáticas apresenta diferenças marcantes em relação à cromatina das células somáticas. As histonas, proteínas ligadas à fita de DNA das células somáticas, são totais ou parcialmente substituídas na espermiogênese de alguns peixes, aves e mamíferos por proteínas denominadas protaminas. As protaminas possuem caráter mais básico que as histonas, com abundância de arginina e cisteína oxidada (LEWIN et al., 1999). A presença da protamina leva a mudanças intensas na condensação da cromatina (BELETTI et al., 2004), que se torna extremamente condensada e inerte, pois os resíduos amina

dessas proteínas interagem com a fita de DNA através de seus grupos fosfatos, neutralizando o esqueleto fosfodiéster (LOIR; LINNEAU, 1978; EVENSON et al., 1980; COURTENS; LOIR, 1981; CHIVA et al., 1987; LEWIN et al., 1999; BELETTI; MELLO, 2004). No caso das aves, a protamina presente no núcleo da célula espermática é conhecida como galline (NAKANO et al., 1975 e 1989, SOARES; BELETTI, 2006b).

A condensação do material nuclear é um importante evento da diferenciação nuclear durante a espermatogênese. Acreditava-se que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas poderiam levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozoides, o que leva a consequências sobre a fertilidade (GLEDHILL, 1966; EVENSON et al. 1980; MELLO, 1982; BELETTI; MELLO, 1996; BELETTI; MELLO, 2004; BELETTI et al, 2004). Contudo, hoje sabe-se que existem regiões específicas da cromatina espermática de mamíferos que permanecem com histonas, contendo provavelmente sinais epigenéticos importantes para o desenvolvimento embrionário. Portanto, apenas quantidade e localização errôneas de histonas na cromatina espermática interfeririam na fertilidade (BELETTI, 2013)

Quando o dano no DNA é mais severo, este persiste durante o desenvolvimento embrionário, induzindo apoptose e fragmentação do embrião recente ou levando à morte mais tardiamente (TWIGG et al. 1998; ELLINGTON et al., 1998). Em estudo avaliando programas de inseminação artificial em equinos, WATSON (2000) apontou os espermatozoides apresentando DNA danificado como uma das causas do insucesso desta técnica. Em bovinos, DOBRINSKI et al. (1994) mostraram que reprodutores com baixa taxa de fertilidade possuíam altas taxas de espermatozoides com DNA danificado.

Em 1966, GLEDHILL verificou que alguns touros com distúrbios de fertilidade apresentavam parte de seus espermatozoides com maior intensidade na resposta à reação de Feulgen. Inicialmente a maior intensidade de coloração Feulgen positiva nas cabeças destes espermatozoides foi interpretada como um maior conteúdo de DNA presente nessas células. Mais tarde essa teoria foi substituída pelo uso de microespectrofotometria de ultravioleta, através da qual verificou-se que estes espermatozoides não possuíam conteúdo de DNA diferente. A diferença na resposta à reação de Feulgen foi então atribuída a uma alteração na cinética hidrolítica do DNA, devido à alteração no complexo DNA-proteína, tornando a cromatina mais frouxa e o

DNA mais sensível à hidrólise. Portanto, a reação de Feulgen consegue identificar os espermatozoides com cromatina mais frouxa, o que interfere na fertilidade do macho.

Vários outros estudos foram realizados na confirmação destes testes. Assim, BELETTI e MELLO (1996), estudando touros que apresentavam alta porcentagem de espermatozoides com patologia de cabeça do tipo “pouch formation” (touros subférteis), observaram que alguns destes animais apresentavam a frequência de espermatozoides com cromatinas anômalas semelhantes à de touros altamente férteis. Assim, embora o achado de níveis mais elevados de metacromasia induzida se associe a subfertilidade, nem toda situação de subfertilidade é caracterizada pela presença de núcleos com essa propriedade citoquímica.

MOSS et al. (1978), afirmam que todas as amostras de sêmen de diferentes espécies animais contêm uma proporção de células anormais. LUKASZEWICS (2008), avaliando diferentes métodos de coloração de diferentes aves, mostrou que o percentual médio de espermatozoides normais no sêmen é entre 70 e 80%.

A partir de estudos em microscopia eletrônica de transmissão, SOARES & BELETTI (2006b) observaram que o acrossoma dos espermatozoides de galo é composto por material homogêneo ou levemente granular. No interior do núcleo, a cromatina geralmente apresenta-se densa e levemente granular. Contudo, foram observados espermatozoides com cromatina apresentando vários tipos de granulação e tonalidades de cinza, ou seja, com várias intensidades de compactação. As células com deficiência de compactação da cromatina apresentavam todo o núcleo ou mesmo pequenos pontos mais claros.

As alterações morfológicas nos espermatozoides de galos dividem-se como em outras espécies, em defeitos de cabeça e de peça intermediária, sendo os mais frequentes descritos por JAENISH (1989): cabeça enrolada, cabeça grande, em anzol, tumefeita, zigue-zague, membrana irregular, acrossoma ausente e acrossoma dobrado. Os defeitos de cabeça espermática estão relacionados a transtornos na espermatogênese, decorrentes principalmente de processos degenerativos das gônadas. Os achados mais frequentes na peça intermediária espermática foram: peça intermediária dobrada e peça intermediária tumefeita. Já a detecção de anomalias na cromatina dos espermatozoides é frequentemente negligenciada, por falta de estudos (SOARES & BELETTI, 2006a).

SOARES & BELETTI (2006a) compararam as alterações morfológicas e de compactação de cromatina com a fertilidade de dois lotes de galos. Eles observaram

que no lote com os galos mais férteis foi encontrado maior número de espermatozoides com alterações morfológicas, enquanto no lote com menor fertilidade foi encontrado um maior número de alterações na compactação da cromatina, mostrando a importância da compactação cromatínica na fertilidade dos galos.

RODRIGUES et al. (2009) demonstraram que um dos fatores que podem influenciar a fertilidade de galos mais idosos são as alterações na compactação da cromatina espermática. Estes pesquisadores identificaram que os sêmens de galos velhos apresentam mais alterações na cromatina, tanto na homogeneidade como na intensidade de compactação, do que galos jovens. A condensação do material nuclear é um importante evento da diferenciação nuclear durante a espermatogênese.

ARAÚJO (2013) utilizou microscopia eletrônica de transmissão para avaliar alterações na cromatina de sêmen de perus, classificando estas alterações em fracas, médias e fortes. Ele concluiu que a microscopia eletrônica de transmissão é eficiente na avaliação de alterações de cromatina em espermatozoides de peru.

3.3. Radicais livres e Estresse oxidativo

Um radical livre nada mais é do que qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livres na sua órbita externa. Essas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados tem uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa, o que pode acontecer com qualquer composto que esteja próximo, a fim de captar um elétron desse composto para a sua estabilização, independentemente de ser uma molécula, uma célula, ou um tecido do organismo, partindo para uma reação em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante. O oxigênio tem a sua atividade fundamental no metabolismo celular aeróbico. Desta forma, a formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar energia (KUSS, 2005).

A peroxidação lipídica é uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados de membranas celulares,

levando a uma série de eventos que podem culminar com a morte celular (BENZIE, 1996).

SURAI (2002) relatou que os espermatozoides de galos apresentam um alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados (PUFA). Tal concentração de PUFA se dá principalmente na membrana plasmática da cabeça do espermatozoide (BONGALHARDO et al., 2002). Esta composição favorece a peroxidação lipídica, pois as duplas ligações dos PUFA formam radicais livres ao se juntarem ao oxigênio metabólico, caracterizando os PUFA como materiais oxidáveis (MCDOWELL, 1989). Segundo AITKEN (1995), a fluidez espermática e a capacidade fertilizante do galo diminuem no espermatozoide peroxidado.

Vários autores dividem a peroxidação lipídica em 3 fases bem definidas: iniciação, propagação e terminação (HSIEH et al., 1989; SPITELLER, 1998; LIMA et al., 2001; HALLIWELL, 2006) e ocorrem como cadeia. Na fase de iniciação, o PUFA sofre ataque de oxigênio reativo, que abstrai um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno, formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL, 2006). Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono, e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a peroxidação lipídica (LIMA, 2001).

A terceira etapa da reação (terminação) dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL, 2006). Os radicais peroxila e alcoxila também podem sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos; sofrer um rearranjo formando produtos secundários da peroxidação (SPITELLER, 1998). HOGG & KALYANARAMAN (1999) citam os alcanos, aldeídos, álcoois e hidroperóxidos como produtos resultantes da peroxidação lipídica.

De acordo com BILODEAU et al. (2002), os espermatozoides e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar espécies reativas ao oxigênio (ROS). Segundo esse autor, a susceptibilidade do espermatozoide aos danos

oxidativos causados pelas ROS decorrem da alta quantidade de PUFA presentes na sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios. O oxigênio é a maior fonte de ROS produzidas em reações metabólicas para as células obterem energia pela oxidação de nutrientes. As células possuem sistemas pró-oxidantes e antioxidantes que constantemente geram e detoxificam ROS durante metabolismo aeróbico. O estresse oxidativo pode ser causado quando o balanço de pró-oxidantes e antioxidantes está alterado em células com eventos oxidativos aumentados (ORTEGA, 2003). As ROS incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido, radical hidroxila, radical alquila, alcóxila e peróxila (BARBER et al., 1967; CHANGE et al., 1979; HALLIWELL, 2006).

A produção aumentada de oxidantes causa danos em ácidos nucleicos, PUFA de membranas, tióis em proteínas, podendo levar até a morte das células. A peroxidação lipídica pode causar injúrias às membranas celulares, a oxidação do DNA pode levar à mutações e a oxidação proteica pode levar a diminuição da atividade enzimática e aumentar o *turnover* proteico, o que em conjunto pode levar desde a disfunção até a morte celular. As células usam antioxidantes armazenados como a glutathiona e a vitamina E para remover oxidantes sob condições médias e crônicas de estresse oxidativo (KIM et al., 2010).

LUCHESE et al. (2007), também comentam os efeitos da peroxidação lipídica, destacando que este processo oxidativo pode induzir dano ao DNA espermático, acelerando o processo de apoptose da célula germinativa, diminuindo a concentração de espermatozoides e deteriorando a qualidade seminal.

Os espermatozoides estão constantemente expostos a ambientes oxidativos desde o momento em que os espermatozoides são formados no testículo até a ejaculação e passagem pelo trato reprodutivo da fêmea (WEIR & ROBAIRE, 2007). Vários autores descrevem a importância de um sistema antioxidante no sêmen como forma de preservação da integridade espermática e manutenção da fertilidade do galo (AITKEN, 1995; SURAI, 2002; RUTZ et al., 2007; HAMMADEH et al., 2009; KIM et al., 2010). De acordo com RUTZ et al. (2007), a proteção antioxidante do sêmen confere manutenção da fluidez de membrana, além de flexibilidade e permeabilidade necessária para o processo de fertilização.

A Figura 3 mostra o esquema representativo dos efeitos dos radicais livres, causadores de peroxidação lipídica nos espermatozoides com conseqüência na

eficiência reprodutiva.

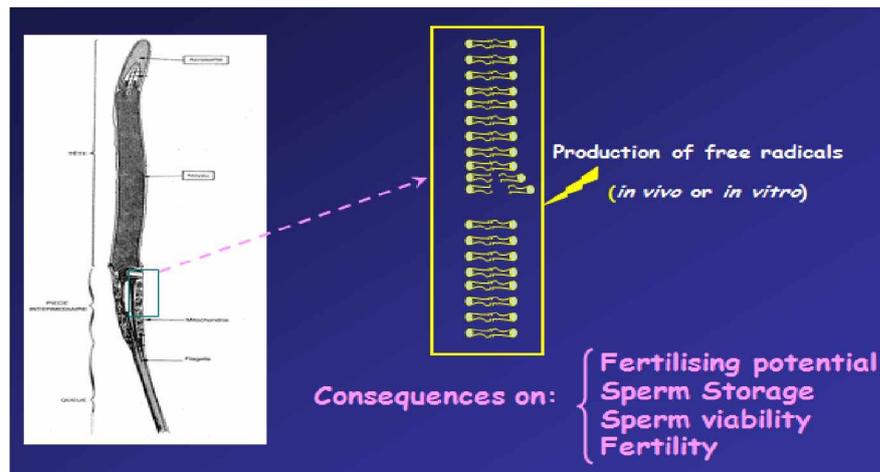


Figura 3. Esquema representativo dos efeitos dos radicais livres, causadores de peroxidação lipídica, com consequência na eficiência reprodutivas (BRILLARD, 2011).

Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático que pode atuar tanto removendo o agente antes que ele cause lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O espermatozoide conta com um sistema enzimático de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), bem como antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e α -tocoferol (AITKEN, 1995). No meio extracelular, ele é protegido pelo plasma seminal que contém redutores de ROS, enzimáticos e não enzimáticos, como: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathione e outros tiois, taurina, hipotaurina e vitamina E. Como a capacidade biosintética do espermatozoide é limitada, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozoide contra os danos causados pelas ROS geradas pelo próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (AITKEN, 1995).

A enzima superóxido dismutase (SOD) presente no citoplasma (Cu, Zn – SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD) é responsável pela dismutação de duas moléculas do ânion superóxido (O_2^-) em uma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) catalisam a

redução do H₂O₂ a água e O₂ (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Enzimas removedoras de ROS, como a superóxido dismutase, glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase ou catalase, já foram detectadas no espermatozoide e/ou no plasma seminal de várias espécies, incluindo ovinos (KASIMANICKAN et al., 2006; BUCAK et al., 2008; MARTÍ et al., 2008), caprinos (ATESSAHIN et al., 2008; BUCAK et al., 2009), bovinos (BILODEAU et al., 2000; O'FLAHERTY et al., 2003; SARIOZKAN et al., 2009) e homem (AITKEN et al., 1996; ZINI et al., 2000; MISRO et al., 2004).

A Figura 4 representa os níveis de defesa antioxidantes das células proposto por SURAI (1999).

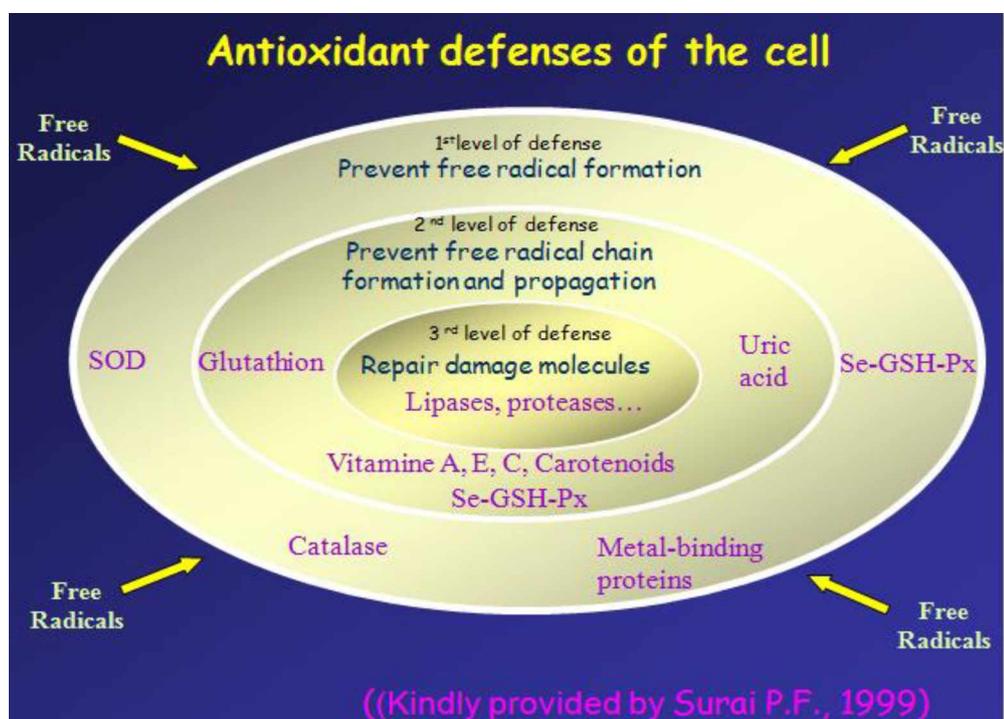


Figura 4. Esquema representativo de níveis de defesa antioxidante das células, indicando os carotenoides como sendo um dos elementos antioxidantes, proposto por SURAI (1999).

Em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutathiona, glutathionaperoxidase e a superóxido dismutase como elementos minimizadores da ação da peroxidação lipídica. A mitocôndria é responsável pela produção de energia para manter a motilidade espermática. Durante este processo ocorre a formação de radicais livres (FIGURA 1). Assim, a presença de antioxidantes nesta região auxilia na neutralização de radicais livres, impedindo a peroxidação lipídica e mantendo a qualidade espermática (RUTZ et al., 2007).

RUTZ et al. (2005) afirmou que esta proteção é temporária, uma vez que o plasma seminal é rapidamente substituído pelo fluido secretado pelo oviduto. Ainda assim, os espermatozoides continuam sob proteção de enzimas e vitaminas (C e E). WEIR & ROBAIRE (2007) compararam a atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides e a produção de ROS na maturação de espermatozoides de ratos velhos e novos e observaram queda na capacidade antioxidante associada ao aumento na produção de ROS com o envelhecimento dos animais. Os autores concluíram que a queda na qualidade espermática de animais velhos está associada à maior susceptibilidade dos espermatozoides aos danos oxidativos.

Contudo, uma vez que a quantidade de enzimas antioxidantes no citoplasma dos espermatozoides é limitada e a presença destes antioxidantes é fundamental para proteção espermática (HAMMADEH et al., 2009). MAKKER et al. (2009) e BANSAL & BILASPURI (2010) destacaram antioxidantes adicionados a dieta de machos com a finalidade de reduzir o estresse oxidativo dos espermatozoides. Dentre os antioxidantes citados, estão as vitaminas C e E, beta-carotenos, carotenoides e flavonoides.

A peroxidação lipídica nas aves é influenciada pela qualidade da matéria-prima (consumo de lipídios oxidados), alta presença de ácidos graxos insaturados nos tecidos e ingestão inadequada de nutrientes envolvidos no sistema de defesa antioxidante. Desta forma, a utilização de antioxidantes nos insumos e na ração das aves, visa preservar a qualidade e os níveis nutricionais do alimento e consequentemente proteger os tecidos da ave viva e o produto final das matrizes que são os ovos férteis e pintos (ROCHA et al, 2013).

Além dos danos já descritos, também é importante salientar que os radicais livres podem causar danos diretos e indiretos à cromatina, variando desde alterações na compactação até alterações no DNA levando à má formações (OPUWARI e HENKEL, 2016).

3.4 Cantaxantina

MAKKER et al. (2009) e BANSAL & BILASPURI (2010) destacaram os antioxidantes dietéticos na redução do estresse oxidativo dos espermatozoides, sendo estes constituídos pelas vitaminas C, E, beta-carotenos, carotenóides e flavonóides.

Vários autores descrevem a ingestão de antioxidantes, como os carotenoides e as vitaminas C e E, como maneira de auxiliar o sistema enzimático de proteção contra o ataque de radicais livres em diferentes espécies, como humanos (SOUTHON, 2000), aves (SURAI, 2002) e ratos (ARRUDA, 2004).

Os carotenoides são comumente associados com sua função pigmentante devido à sua ampla distribuição na natureza conferindo as cores laranja, amarela e vermelha em frutas, hortaliças, flores, algas, bactérias fungos, leveduras e animais (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). Avaliando o efeito de carotenoides na atividade avícola, Baião (1996) e ANGELES & SCHEIDELER (1998) perceberam diferenças significativas na pigmentação de gemas após o uso desses compostos. Contudo, há o conhecimento de que os carotenoides possuem outras propriedades além da pigmentante, como atividade pró-vitaminas (WILLIAMS et al., 1998) e antioxidantes (FOOTE et al., 1970; DI MASCIO et al., 1989; MCBRIDE, 1996; BÖHM et al., 1997; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Segundo MELÉNDEZ-MARTINEZ et al. (2004), os carotenoides α -caroteno, β -caroteno, e β -criptoxantina são carotenoides que possuem alta atividade pró- vitamina A, pois apresentam ao menos um anel ionona no final de sua estrutura. Enquanto isso, a luteína, o licopeno e a cantaxantina tem pouca ou nenhuma atividade pró-vitamina A, pois não apresentam o anel ionona nas suas estruturas químicas.

Nutricionalmente, estes podem ser classificados como pró- vitamínicos (aqueles com atividade pró-vitamina A) ou carotenoides inativos, quando apresentam apenas atividade antioxidante ou corante (OLSON, 1999). De acordo com o caráter químico, estes compostos são classificados em dois grupos: hidrocarbonados, denominados carotenos, e oxigenados, denominados xantofilas (GOODWIN, 1965). Estes dois grupos são subdivididos de acordo com sua estrutura, destacando-se o os subgrupos hidrocarbonetos (como o licopeno) e as cetonas (como a cantaxantina).

A propriedade antioxidante dos carotenoides foi descrita por SHAMI & MOREIRA (2004), que relataram a proteção proporcionada por esses compostos às células contra danos oxidativos, provocados por radicais livres e por ROS que podem

ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA. Os carotenoides são capazes de sequestrar as ROS, como o radical peroxil e o oxigênio singleto, estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância (FOOTE et al., 1970). Por conseguinte, os carotenoides são capazes de retirar do meio espécies altamente reativas (BURTON e INGOLD, 1984). Entretanto, a capacidade de interagir com o oxigênio e neutralizar os radicais livres varia entre os carotenoides, cuja atuação depende do tipo de carotenoide, da sua natureza, quantidade de oxigênio no meio e da interação com outros antioxidantes (ROCK et al., 1997; EDGE et al., 1997).

Dentre os carotenoides mais intensamente oxigenados destaca-se a cantaxantina pigmento das plumas do flamingo, do guará maranhense e do champignon (*Cantharellus cinnabarinus*). O consumo desses carotenoides está crescendo devido às atividades industriais de aquicultura e avicultura (FONTANA et al., 2000; GARCIA et al., 2002).

Em relação à utilização da cantaxantina na atividade avícola, como agente antioxidante, alguns estudos sugerem que esses compostos são capazes de funcionar eficazmente como antioxidantes durante a incubação, mesmo na presença de oxigênio atmosférico. Em experimentos com matrizes de corte onde todas as aves foram alimentadas com dietas ricas em vitamina E, observou-se que os efeitos antioxidantes podem ser alcançados através de interações entre carotenoides e vitamina E (EDGE et al., 1997). O nível de vitamina E no fígado de pintos de um dia foi também significativamente elevado quando as matrizes receberam alta quantidade de carotenoides na dieta. Sendo reflexo das propriedades antioxidantes dos carotenoides, impedindo a depressão de níveis de vitamina E durante períodos de estresse oxidativo, tais como o processo incubação (SURAI et al., 1999). Trabalhando com pintos provenientes de ovos incubados enriquecidos com carotenoides, SURAI & SPEAKE (1998), observaram uma maior resistência à peroxidação lipídica nos tecidos dessas aves.

No que tange o macho e suas características espermáticas, FERREIRA (2010) verificou influência nesses parâmetros após a adição de cantaxantina na ração de machos. A autora atribuiu o aumento de motilidade e concentração espermáticas e a redução nas alterações morfológicas espermáticas à proteção antioxidante da cantaxantina dos ácidos graxos dos espermatozoides.

Em relação ao papel dos carotenóides como substâncias pró-vitamina A, SURAI et al. (2001) afirmaram que menos de 10% desses podem ser convertidos em vitamina A, sendo que nas aves somente o alfa e beta-carotenos e a criptoxantina presentes nos alimentos naturais são capazes de contribuir com o suprimento desta vitamina, portanto a cantaxantina não está incluída neste grupo provitamínico. Ainda segundo estes autores, uma porção dos carotenóides com atividade pró-vitamina A é convertida em vitamina A na mucosa intestinal e uma pequena parte escapa à conversão e entra na corrente sanguínea para ser depositada na gema ou na pele.

De acordo com EUROPEAN COMMISSION (2002), a cantaxantina é absorvida no intestino delgado e transportada pelo sangue ao fígado, onde parte é transformada em substâncias intermediárias precursoras de vitamina A, como 4-oxoretinol, e o restante permanece íntegro transportado pelas lipoproteínas aos depósitos alvos.

BEARDSWORTH & HENÁNDEZ (2003) relataram que a atividade pró-vitamina A da cantaxantina tem sido reconhecida e que esta pode ser transformada em vitamina A nas aves quando o nível desta última é limitado na dieta.

A cantaxantina e a vitamina E também podem ser sintéticas. No caso da vitamina E, a diferença entre a forma natural e a sintética está na sua origem. Para diferenciá-las, os nomes comerciais das vitaminas E iniciam com “d” ou “dl”, que referem-se a diferenças na estrutura química, e representam a forma natural e sintética, respectivamente. A forma natural é mais ativa e melhor absorvida. Segundo ACUFF et al. (1994), a forma sintética precisa ser primeiramente hidrolisada no lúmen intestinal, para então ser absorvida. Diferentemente da forma natural, a vitamina E sintética só é encontrada na estrutura alfa.

ROCHA et al (2013), afirmou que na avicultura, a utilização dos antioxidantes como BHT, BHA, etoxiquim e galato, é limitada aos ingredientes das rações, para garantir sua conservação durante o armazenamento, e quando utilizados na dieta das aves, geralmente são adicionados às rações dos frangos de corte. Em matrizes pesadas e poedeiras comerciais, prefere-se utilizar antioxidantes como vitamina E e cantaxantina.

3.5. Perfuração espermática

O processo de fertilização, que pode ser resumido como a entrada do gameta masculino no ovócito feminino, é composto por vários passos que incluem: o contato ou a interação entre as membranas do ovócito e do espermatozoide; a entrada do espermatozoide no ovócito, a ativação metabólica do ovócito, o reinício da meiose no ovócito e a formação e fusão dos pró-núcleos masculino e feminino (HAFEZ 2004). O encontro entre os gametas acontece na região afunilada do infundíbulo onde, um ou vários espermatozoides atravessam a membrana perivitelínica externa, preferencialmente na região do disco germinativo, e digerem um orifício de 10-20 μm , penetrando no ovócito feminino (BAKST & HOWARTH, 1977). No momento da ovulação, o pró-núcleo feminino está na fase de metáfase, da segunda divisão meiótica (ETCHES, 1998).

Após 15 minutos da ovulação, os espermatozoides penetram na membrana perivitelínica externa (BAKST & HOWARTH, 1977). A ligação do espermatozoide com a membrana perivitelínica (MP) do ovócito e a subsequente reação acrossômica é um importante evento que define o sucesso da fertilização em aves. O resultado desta interação é um orifício hidrolizado pelo qual o espermatozoide penetrou no ovócito. (BAKST & HOWARTH, 1977; WACLAWEK et al., 1998).

O espermatozoide das aves penetra na membrana perivitelínica do ovócito de forma digestiva (BELLAIRS et al., 1963; FUGII, 1976), assim como acontece nos mamíferos. OKAMURA & NISHIYAMA (1978) relataram que no momento em que o espermatozoide das aves entra em contato com a membrana perivitelínica, ele é submetido a uma reação acrossomal, resultando na fusão da membrana acrossomal externa do espermatozoide, do plasmalema, sua vesiculação e posterior liberação das enzimas acrossomais, principalmente a acrosina. Esta reação permite a digestão de um caminho ou orifício na membrana preivitelínica pelo qual o espermatozoide entrará.

Após a fusão com a membrana plasmática do ovócito, o envelope nuclear do espermatozoide se desintegra e o material de cromatina liberado sofre uma descondensação. Uma vez que os pró-núcleos masculino/feminino estejam em íntima proximidade, os envelopes nucleares se dispersam propiciando uma intermistura dos cromossomos (ETCHES, 1998).

Nas aves, a polispermia, ou seja, a penetração de mais de um espermatozoide na membrana perivitelínica, é um evento fisiológico. As aves não possuem o mecanismo dos mamíferos em que, imediatamente após a fertilização, a superfície do ovócito sofre modificações que impedem a penetração de espermatozoides adicionais (ETCHES, 1998).

A ocorrência de múltiplas penetrações e a formação de vários orifícios na membrana perivitelínica do ovócito recém fertilizado é normal. A maioria desses orifícios estão concentrados em uma área circular de 2,6 mm ao redor do disco germinativo. Uma possível atração quimiostática dos espermatozoides para essa área foi discutida por ROTHSCHILD (1956) em seus escritos sobre as regras quimiotáticas do processo de fertilização. Outros autores sugerem que este fato se deve à ausência de cálcio na região do disco germinativo.

Embora o cálcio não seja o responsável pela atração dos espermatozoides para esta área, ele é necessário a ativação do espermatozoide, possivelmente induzindo a reação acrossoma do espermatozoide com o ovócito (HOLM et al. 2000). BAKST (1988) utilizando a microscopia eletrônica, encontrou diferença no tamanho e no número de vilosidades na área ao redor do disco germinativo e nas áreas adjacentes a esta estrutura. Isso sugere que as vilosidades na região do disco germinativo estejam associadas a ligação espermática nas aves. Ao redor do disco germinativo há, aproximadamente, 20-25 vezes mais perfurações que nas outras áreas da membrana perivitelínica (BRANWELL et al., 1995; WISHART, 1997), sendo esta uma relação linear.

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

Também existe correlação entre o número de perfurações na membrana perivitelínica encontradas ao redor do disco germinativo, o número de perfurações na membrana perivitelínica encontradas em outras regiões do ovo fora do disco germinativo e; o número de espermatozoides encontrados na membrana perivitelínica externa (BRANWELL et al., 1995; WISHART, 1997). Pesquisas foram realizadas a fim

de determinar a possível correlação entre esses parâmetros e a probabilidade de um ovo de galinha estar fertilizado.

Dentre essas, WISHART (1997) relata que um ovo tem 50% de probabilidade de estar fertilizado se possuir mais que 0,1 espermatozoides na membrana perivitelínica externa por mm^2 . Em adição, o autor concluiu que um ovo tem 50% de chance de estar fértil se, no mínimo, três espermatozoides penetrarem na membrana perivitelínica sobre o disco germinativo, sendo que as maiores taxas de fertilidade foram obtidas quando houve seis perfurações nesta mesma região. Resultados semelhantes foram encontrados por BRANWELL et al. (1995) ao pesquisarem a frequência de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, sobre o disco germinativo.

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

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

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

Segundo ROBERTSON et al. (1997), para que os espermatozoides realizem as perfurações é necessária complexa interação de parâmetros regulatórios hormonais e metabólicos aliada a fatores como: motilidade espermática, ligação entre o ovócito e o espermatozoide, indução da reação acrossomal e da hidrólise da membrana perivitelínica. Portanto, a técnica de contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica avalia o resultado da soma de todos os

eventos citados acima, o que confere ao teste ampla capacidade de avaliação da fertilização aviária.

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

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

Em pesquisas realizadas foi possível determinar a correlação entre o número de perfurações espermáticas e a probabilidade de um ovo de galinha estar fertilizado. WISHART (1997) relatou que um ovo tem 50% de probabilidade de estar fertilizado se possuir mais que 0,1 espermatozoides na membrana perivitelínica externa por mm². Em adição, o autor concluiu que um ovo tem 50% de chance de estar fértil se, no mínimo, três espermatozoides penetrarem na membrana perivitelínica sobre o disco germinativo, sendo que as maiores taxas de fertilidade foram obtidas quando houve seis perfurações nesta mesma região.

Estes resultados foram semelhantes a uma pesquisa anterior, onde BRANWELL et al. (1995) pesquisaram a frequência de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, sobre o disco germinativo e correlacionaram com a fertilidade.

Nas aves, os espermatozoides que transpõem a vagina são armazenados em modificações da membrana do trato reprodutivo da fêmea chamadas de túbulos de

estocagem seminal, localizados na junção útero-vaginal (BOBR et al., 1964) e podem permanecer viáveis por períodos de até 32 dias, sendo em peruas, este tempo pode chegar a 70 dias (HAFEZ, 2004). Os espermatozoides são expostos a vários fatores, nos túbulos de estocagem seminal, que suprimem a motilidade, o metabolismo espermático, a enzima acrosina, a imunogenicidade espermática e estabilizam as membranas plasmáticas. Acredita-se que possa haver influência do zinco, cálcio e do ácido glutâmico nestas mudanças fisiológicas dos espermatozoides nesse local.

Ao contrário da fertilização nos mamíferos, o espermatozoide das aves não necessita passar pelo processo de capacitação no oviduto. Esse fato foi comprovado por meio de experimentos, nos quais foram realizadas inseminações com espermatozoides coletados diretamente do ducto deferente de galos. Nesses estudos foram encontrados resultados semelhantes a inseminação comumente utilizada, com coleta por massagem abdominal (BAKST & CECIL, 1981). Entretanto, um processo semelhante ao processo de capacitação nos mamíferos acontece no infundíbulo das aves. Quando os espermatozoides que estão armazenados nos túbulos de estocagem seminal são lançados para realizar a fertilização de um óvulo, existe aumento na motilidade, metabolismo e desestabilização da membrana plasmática (BAKST et al., 1994).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em galpão convencional de produção de matrizes pesadas, da empresa Pole Alimentos, localizada no Município de Uberlândia, Minas Gerais. As coletas ocorreram entre os meses de Janeiro a Julho de 2015.

A metodologia utilizada foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFU, e o número do certificado do protocolo CEUA é 012/15.

Neste experimento, foram alojados no total 24.000 pintinhos de um dia da linhagem Ross® AP95, sendo 20.500 fêmeas e 3.500 machos, que permaneceram no período de recria em dois galpões blackout, de pressão negativa, em boxes separados específicos para fêmeas e machos.

No momento em que as aves atingiram a idade reprodutiva, por volta da 22ª semana de vida, as mesmas foram transferidas para os galpões convencionais de produção, de pressão positiva, com cortinas amarelas e ninhos convencionais.

As rações experimentais foram ofertadas a partir da 22ª semana de vida. A formulação nutricional da dieta foi a de rotina da granja para machos e fêmeas, de acordo com a tabela de recomendação da linhagem (ANEXO 1 e 2). Para o experimento houve a suplementação ou não de 6ppm de cantaxantina, segundo os tratamentos:

Tratamento 1 - 10.500 fêmeas e 1.500 machos, alojados em um galpão com suplementação de cantaxantina (6ppm), a partir da 22 semana de vida;

Tratamento 2 - 10.500 fêmeas e 1.500 machos, alojados em um galpão sem cantaxantina na ração;

A ração fornecida para ambos os tratamentos era produzida na mesma fábrica de ração. Portanto, a única variável entre os tratamentos foi a suplementação com 6 ppm de cantaxantina nas partidas que se destinaram ao lote teste.

Os galpões tanto da recria, quanto da produção eram iguais em estrutura, equipamentos, tratadores e estavam localizados na mesma granja.

As coletas se iniciaram na 30ª semana de vida do lote e se repetiram nas semanas 40 e 50 de vida das aves.

A cada idade referida foram coletados ovos para a realização das análises de contagem da perfuração espermática da membrana perivitelínea; testículos para mensuração dos túbulos seminíferos; sêmen para análise da compactação de

cromatina dos espermatozoides, além de também, serem obtidas as taxas de eclosão e fertilidade como medidas de rotina da granja.

4.1. Contagem da Perfuração espermática da membrana perivitelínea

Para a realização do teste de contagem das perfurações da membrana perivitelínea, foram coletados cerca de 60 ovos, em cada uma das idades de coleta (30, 40 e 50 semanas de vida das aves). Dos 60 ovos coletados, foi esperado obter-se uma média de resultado de 10 ovos, devido ao alto índice de perdas no processamento das amostras para esta técnica. Portanto, o n amostral para esta análise foi de 10 ovos, por tratamento e por idade.

Portanto, ao final do processamento os resultados contaram com dois tratamentos (T1 – sem cantaxantina e T2 – com cantaxantina), sendo 10 repetições cada, em três idades distintas: 30, 40 e 50 semanas de vida.

Os ovos foram retirados de forma aleatória da segunda coleta de ovos do dia. Após a coleta, foram encaminhados ao laboratório onde se iniciava o processamento.

A técnica para contagem das perfurações utilizada no experimento foi descrita inicialmente por BRANWELL (1992) e modificado em alguns aspectos por DONOGHUE (1996).

Cada ovo teve sua gema cuidadosamente separada da clara. Uma porção de aproximadamente 1 cm² da membrana perivitelínica na região do disco germinativo foi retirada e imersa em PBS para remoção do restante de albúmem e gema. O pedaço da membrana foi colocado e posicionado esticado sobre uma lâmina com auxílio de pinça e fixado com formalina 20%. Posteriormente foi utilizado como corante algumas gotas do reativo de Schiff. Colocou-se lamínula sobre a membrana corada e fixada e seguiu-se para a análise em microscópio de luz em aumento de 100 vezes.

De cada lâmina foi localizada a região onde havia ocorrido as perfurações espermáticas e a contagem no número de perfurações foi realizada.

4.2. Mensurações de túbulos seminíferos de testículos de galos

Para a análise do desenvolvimento testicular, foi coletado de maneira aleatória 10 galos de cada tratamento, na idade intermediária do teste (40 semanas).

Fragmentos de 0,5 cm³ foram obtidos do testículo, de cada galo, e fixados em solução de formol 10% por no mínimo 24 horas.

Após este período foram submetidos às técnicas histológicas de rotina (desidratação, diafanização e inclusão em parafina), seguindo metodologia proposta por MAIA (1979). Cortes de 5µm foram preparados em micrótomo antes de serem submetidos à coloração por hematoxilina-eosina.

Posteriormente as lâminas confeccionadas foram observadas ao microscópio de luz, e microfotografadas para análises e mensurações do diâmetro total e da altura do epitélio dos túbulos seminíferos, utilizando-se o software HL Image[®]. Foram fotografados e medidos em média doze túbulos seminíferos por animal.

4.3. Análise da compactação da cromatina dos espermatozoides

Nas idades de 30, 40 e 50 semanas, foi selecionado de maneira aleatória cerca de 20 galos de cada tratamento. Estes galos eram colocados em boxes separados das fêmeas, por 3 dias antes da coleta de sêmen.

O sêmen foi coletado conforme descrito por BURROWS & QUINN (1937), com o método de massagens abdominais, conforme representado na Figura 5.



Figura 5. Coleta de sêmen de machos matrizes de frango de corte.

Para avaliação em microscopia eletrônica de transmissão, aproximadamente 0,5 mL de sêmen de cada amostra foi colocado em microtubo de 2 mL e o volume foi completado com a solução fixadora Glutaraldeído 5%. Estas amostras foram centrifugadas (100 x g) por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, descartando-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes para eliminar o máximo de resíduo de glutaraldeído. O pellet da última centrifugação foi ressuspensionado em 300 µL de agar 4% liquefeito a 55°C. Após o resfriamento em temperatura ambiente o agar tornou-se sólido e foi retirado do tubo e recortado em fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Esses fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos e em de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% por mais de 30 minutos. Estes fragmentos foram desidratados em séries crescentes de acetona a 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100% e 100% ficando 5 minutos nos cinco primeiros banhos e 10 minutos nos três últimos. Posteriormente, o material foi colocado em solução de resina Epon e acetona na proporção 1:1 por 12 horas. Após esse período, a solução contendo o material foi colocada na estufa a 37°C por 12 e posteriormente em solução pura por mais 4 horas. Em seguida os blocos foram incluídos em resina pura e mantidos durante 2 dias em estufa a 60°C. Finalmente, os blocos foram submetidos a cortes ultrafinos em ultra-micrótomo, os quais foram colocados em telas de cobre de 200 mesh e contrastados com acetato de uranila e nitrato de chumbo (BOZZOLA; RUSSELL, 1998).

Todas as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV, quando foram avaliadas 80 cabeças de espermatozoides de cada amostra.

As cabeças que possuísem os núcleos homoganeamente escuros (eletrodensos) foram consideradas possuidoras de cromatina com compactação normal. As cabeças que possuísem o núcleo claro (eletrolúcidos) ou de coloração heterogênea foram consideradas possuidoras de cromatina com alterações e foram classificadas de acordo com níveis de descompactação da cromatina: fraco, o qual apresenta na estrutura cromatínica um pequeno ponto de descompactação; médio, onde a cromatina apresenta entre um e três pontos de descompactação; forte, presença acima de três pontos de descompactação ou apresentação bastante heterogênea em mais de um ponto da cabeça do espermatozoide.

4.4. Eclosão e Fertilidade

Os dados de eclosão foram obtidos pela empresa Pole Alimentos, responsável pela incubação dos ovos, de acordo com a fórmula de eclosão:

$$\text{Eclosão} = \frac{\text{n}^\circ \text{pintos nascidos} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ovos incubados total}}$$

Os ovos foram incubados em máquinas do modelo de estágio múltiplo, com período de estocagem médio de sete dias. No 19º dia de incubação, ocorreu a transferência dos ovos para nascedouros, onde permaneceram até completarem 21 dias.

Para a análise de fertilidade, os ovos foram submetidos a quebra e análise visual do disco germinativo e classificados como fértil ou não fértil, no segundo dia de estocagem, após as 50 semanas de idade, semanalmente, 50 ovos por tratamento, conforme padrão da empresa.

$$\text{Fertilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{de ovos férteis} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ovos avaliados}}$$

4.5. Análise estatística

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (*outliers*).

Os dados referentes aos testes de perfuração espermática da membrana perivitelínea, e eclosão, foram submetidos ao teste de normalidade e homocedasticidade de variância e posteriormente ao teste de Kruskal – Wallis (RODRIGUES, 2016).

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral.

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças, estatisticamente significantes, entre as taxas de fertilidade foi aplicado após a verificação da normalidade dos dados, o teste T, aos dados em questão.

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 testiculares, foi também aplicado após a verificação da normalidade dos dados, o teste T para duas médias.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em um teste bilateral.

Para os dados de compactação de cromatina foi aplicado o teste binomial para duas proporções (BIASE & FERREIRA, 2009), com nível de significância estabelecido em 0,05. Também para estes dados foi aplicado o teste de Odds Ratio, que compara a taxa de relação entre duas medidas (RUMEL, 1986).

5. RESULTADOS

Os resultados do teste de perfuração espermática na membrana perivitelínea (PEMP) estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 – Número médio de perfurações espermáticas na membrana perivitelínea de ovos provenientes de lote suplementado com cantaxantina (T1) e não suplementado com cantaxantina (T2) em três idades distintas.

Semana	T1	T2	p valor
30	266 a	71 b	0.049*
40	344 a	114 b	0.041*
50	190 a	75 b	0.021*

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

De acordo com os resultados demonstrados na tabela 1, foram encontradas diferenças, entre o número de perfurações espermáticas, obtidos nas, 30, 40 e 50 semanas de idade, sendo que nas três idades observadas, a maior taxa de perfuração dos espermatozoides ocorreu no lote suplementado com cantaxantina.

O grupo que recebeu o aditivo antioxidante apresentou maior quantidade de perfurações espermáticas na membrana perivitelínea, indicando também possíveis melhorias nas taxas de fertilidade e eclosão.

Os resultados do teste estatístico para verificar ou não a diferença entre o número de PEMP com relação a idade dos lotes está representada na tabela 2.

Tabela 2. Teste de probabilidades para as variáveis tempo de análise – 30, 40 e 50 semanas - e tratamento, com cantaxantina (T1) e sem cantaxantina (T2), para o teste de perfuração da membrana perivitelínea.

Tratamentos	Semanas		P valor
T1	30 a	50 a	0.42
T2	30 a	50 a	0.96

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

Com relação ao tempo de vida analisado, 30, 40 e 50 semanas, não se observou diferenças entre os tratamentos. Isto quer dizer que em ambos os tratamentos, o comportamento da média de perfurações na membrana perivitelínea dos ovos foi semelhante, apresentando queda proporcional na última semana testada.

Na Figura 6 está a ilustração das perfurações espermáticas na membrana perivitelínea.

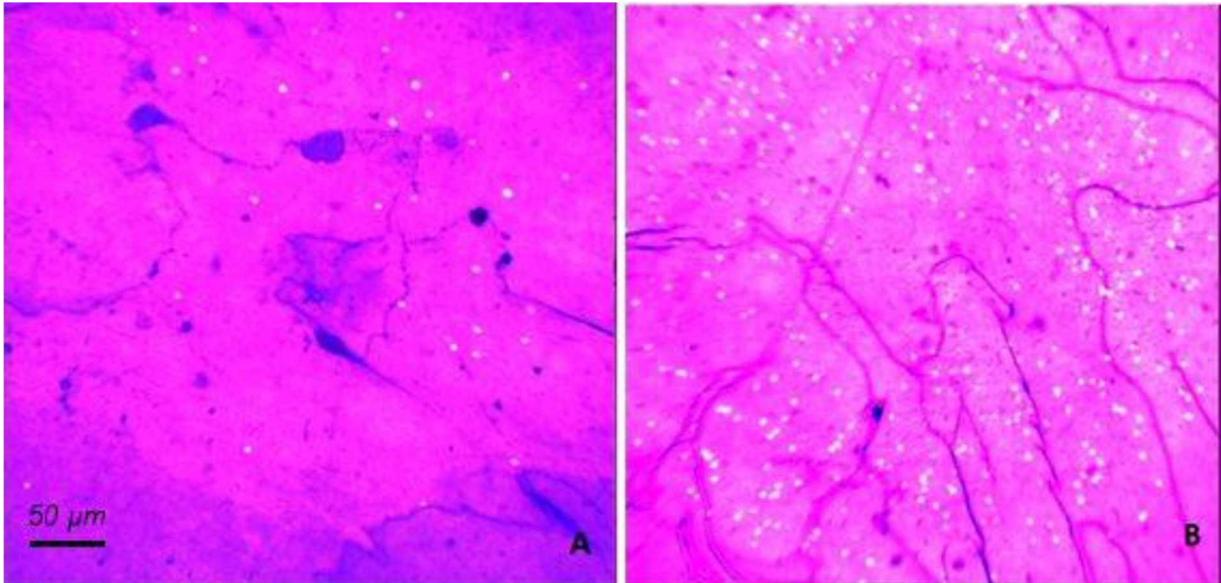


Figura 6. Membrana perivitelínea com baixa quantidade de perfurações espermáticas (A), e com grande quantidade de perfurações na membrana espermática (B).

Os resultados das mensurações dos túbulos seminíferos dos testículos dos galos estão representados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados da mensuração testicular, diâmetro total e altura de epitélio dos túbulos seminíferos de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, nas 40 semanas de vida.

Medida	T1	T2	p valor
Diâmetro (μm)	232.58 a	207.49 a	0.06
Epitélio (μm)	67.83 a	61.54 a	0.22

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

Não foi observado diferenças entre as medidas de diâmetro total e altura de epitélio dos túbulos seminíferos nos diferentes tratamentos.

Nas tabelas 4, 5, 6 e 7 estão os resultados da análise da compactação de cromatina através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

Tabela 4. Grau de descompactação de cromatina observado em espermatozoides de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, nas 30 semanas de vida.

	Normal	Grau de descompactação de sptz		
		Fraco	Médio	Forte
Controle	67,96 a	15,49 a	5,99 a	10,56 a
Cantaxantina	79,45 b	3,08 b	5,82 a	11,64 a
P valor	0.00*	0.00*	0.99	0.98

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

Houve diferença entre os tratamentos na semana 30 de vida, sendo que os galos que receberam a cantaxantina apresentaram maior quantidade de espermatozoides normais.

Quanto ao grau de descompactação, nesta idade, foi possível observar diferenças quanto ao nível de classificação fraco, ou seja, os galos não suplementados apresentavam maior quantidade de espermatozoides com apenas um ponto de descompactação, em toda a extensão de sua cabeça.

Tabela 5. Grau de descompactação de cromatina observado em espermatozoides de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, nas 50 semanas de vida.

	Normal	Grau de descompactação de sptz		
		Fraco	Médio	Forte
Controle	59,11 a	7,73 a	17,68 a	15,47 a
Cantaxantina	89,31 b	0,85 b	5,98 b	3,85 b
P valor	0.00*	0.00*	0.00*	0.00*

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

Na semana 50, também foi possível observar maior quantidade de espermatozoides normais nos galos que receberam a cantaxantina.

Em todos os graus de descompactação de cromatina, houveram diferenças indicando que os galos que não receberam o antioxidante na dieta apresentaram maior quantidade de espermatozoides com descompactação parcial ou total da cromatina.

Tabela 6. Quantidade de espermatozoides de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, que apresentaram anormalidade na compactação de cromatina, nas 30 e 50 semanas de vida.

Semana	T1	T2	P valor
30	20,54 a	32,04 b	0.01*
50	10,68 a	40,88 b	0.00*

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

Os dados da Tabela 6 nos permite observar que no T2 a quantidade de espermatozoides com algum grau de descompactação da cromatina aumentou com relação ao tempo de vida dos galos, ou seja, galos mais velhos apresentaram maiores quantidades de descompactação parcial ou total da cromatina.

Já no T1, o grau de descompactação foi menor, ou seja, os galos que receberam na dieta o antioxidante apresentaram menor quantidade de alteração na cromatina ao longo das semanas de vida.

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 estão ilustrados os diferentes graus de descompactação da cromatina dos espermatozoides dos galos.

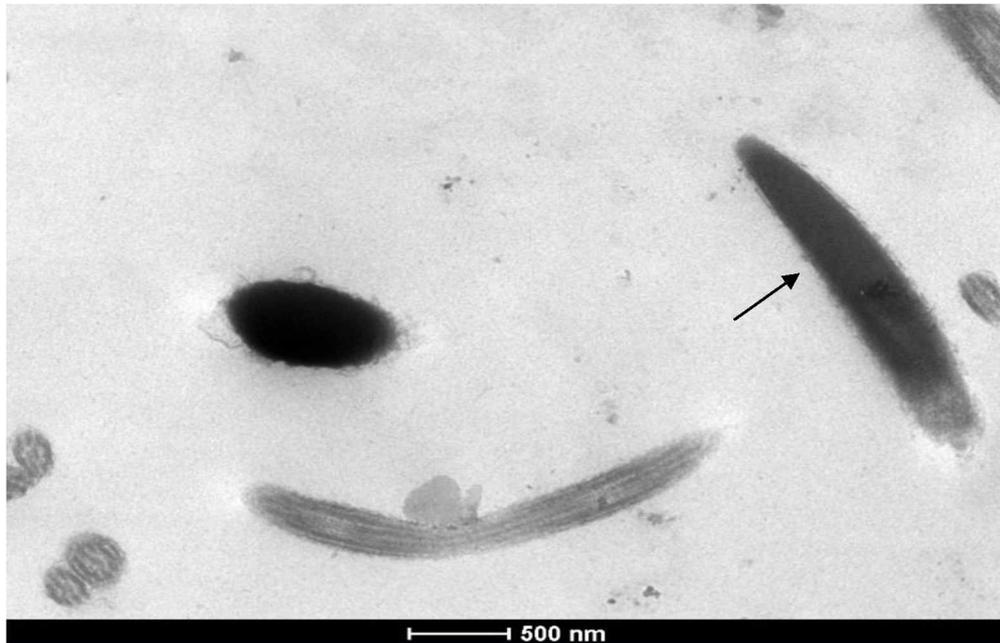


Figura 7. Foto de eletromicrografia eletrônica de cabeças de espermatozoides de galos. Observamos um espermatozoide com descompactação classificada como forte (seta).



Figura 8. Foto de eletromicrografia eletrônica de espermatozoide grau médio de descompactação da cromatina (seta).

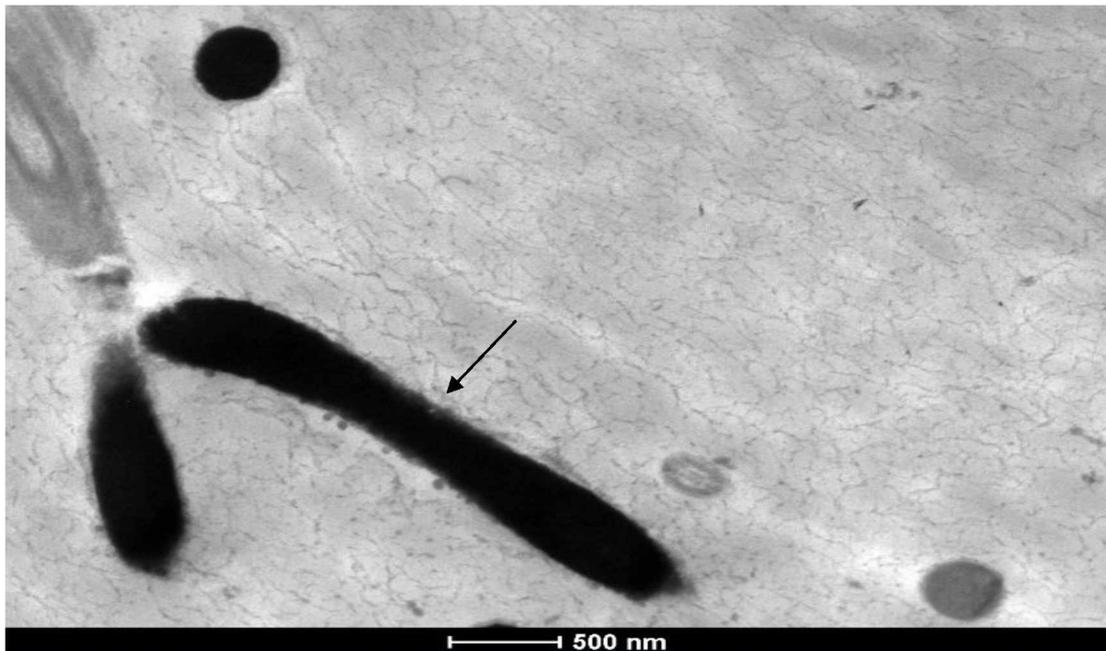


Figura 9. Foto de eletromicrografia eletrônica de espermatozoide com grau fraco de descompactação de cromatina (seta).

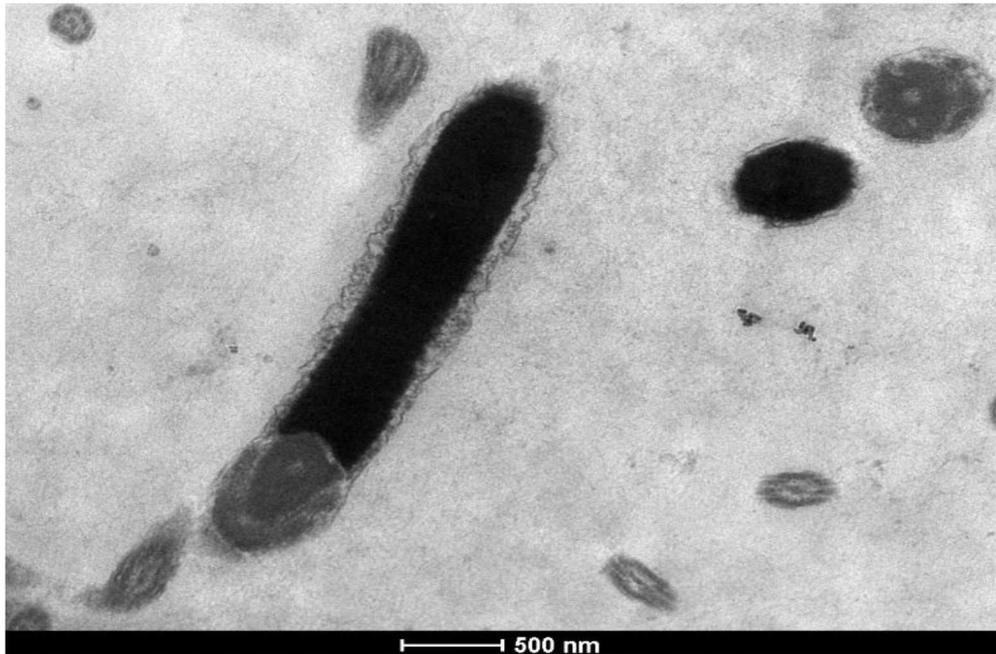


Figura 10. Foto de eletromicrografia eletrônica de espermatozoide com compactação normal de cromatina.

Tabela 7. Taxa de relação Oddis Ratio, entre número de alterações na compactação da cromatina dos tratamentos 1 e 2, nas idades de 30 e 50 semanas.

Semana	T1:T2	p valor
30	1,82	0.00*
50	5,78	0.00*

(*) $p \leq 0.05$

A Tabela 7 indica que na semana 30 de vida dos galos, a probabilidade de se observar alterações na compactação da cromatina de espermatozoides dos galos não suplementados com cantaxantina (T2), é de 1,82 vezes maior do que nos galos suplementados.

Já na semana 50, essa probabilidade aumenta para 5,78 vezes, sendo neste caso, maior a chance de se observar alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides de galos que não receberam o antioxidante na dieta.

Na Tabela 8, estão os resultados da eclosão dos lotes testados.

Tabela 8. Eclosão média analisada em três períodos, dos ovos de matrizes suplementadas (T1) e não suplementadas (T2) com cantaxantina.

Período (semanas)	T1	T2	p valor
29 - 35	83.12 a	79.37 a	0.14
35 – 45	86.16 a	82.66 b	0.00*
45 – 55	77.85 a	73.86 a	0.17

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

Observamos diferenças na taxa de eclosão no período que corresponde às semanas de 35 a 45 semanas, ou seja, para estas idades, as taxas de eclosões semanais apresentaram melhoria nos lotes que receberam na dieta o antioxidante.

Na Tabela 9, estão representados os resultados da fertilidade dos lotes testados.

Tabela 9. Fertilidade média analisada em um período, dos ovos de matrizes suplementadas (T1) e não suplementadas (T2) com cantaxantina.

Período (semanas)	T1	T2	p valor
50 – 60	91.54 a	88.36 b	0.02*

Letras distintas indicam diferenças significativas entre os valores ($p \leq 0.05$).

No período analisado, foi possível observar diferenças entre as taxas de fertilidade, sendo que o lote que foi arraçoado com adição da cantaxantina apresentou maiores taxas de fertilidade.

6. DISCUSSÃO

As matrizes que receberam em sua dieta a cantaxantina apresentaram melhoria na eficiência reprodutiva, com melhores taxas de eclosão na idade de 35 a 45 semanas de vida das aves, e maior taxa de fertilidade após as 50 semanas de vida, período em que a análise de fertilidade foi possível ser realizada a campo.

A melhoria dos índices reprodutivos do lote que recebeu a cantaxantina, pode ser explicada pelo efeito antioxidante que o aditivo promoveu, reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides.

A peroxidação lipídica é uma das principais causas de danos à morfologia espermática, podendo influenciar na motilidade e penetração do espermatozoide na membrana perivitelínica, comprometendo a fertilidade do lote (MACIEL, 2006). Sendo que para uma adequada fertilização do óvulo, os espermatozoides devem ser capazes de penetrar a membrana perivitelínica (RUTZ et al 2007).

FERREIRA et al (2010) observou que a proteção dos espermatozoides contra a oxidação levou à melhora na motilidade, aumento do número de células espermáticas e redução nas alterações morfológicas.

Além das alterações morfológicas, a descompactação da cromatina, também, implica em consequências negativas à fertilidade. EVENSON et al (1980) e BELETTI & MELLO (2006) retratam que durante a espermiogénese pode ocorrer uma substituição deficiente ou errônea das histonas por protaminas, levando a alterações de compactação da cromatina. Sabe-se que em mamíferos a existência de histonas é normal em espermatozoides, porém pode haver a permanência maior que a proporção máxima 15% de histonas na estrutura da cromatina (TANPHAICHITR et al, 1978; GATEWOOD et al., 1990, BELETTI, 2013), o que também levaria a uma cromatina mais frouxa, interferindo na fertilidade do macho.

Neste estudo, os resultados da compactação de cromatina dos espermatozoides indicaram maior grau de descompactação parcial ou total de galos não suplementados com a cantaxantina. Em adição, o lote não suplementado com cantaxantina apresentou menor taxa de eclosão no período de 35 a 45 semanas de vida, e pior taxa de fertilidade.

JOHNSON et al., (2011) e CARREL, (2012) mostraram que alterações cromatínicas espermáticas não são necessariamente marcadas por danos no DNA,

mas podem ser em histonas encontradas em pequenas regiões não protaminadas e que seriam importantes carreadoras de informações epigenéticas, necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, esta também poderia ser outra explicação para as piores taxas de eclosão, e maior grau de descompactação da cromatina dos espermatozoides não suplementados, nesta pesquisa.

Essa correlação negativa entre alterações cromatínicas e eclosão já foi descrita por ARAÚJO (2013), que correlacionou negativamente os níveis de alterações cromatínicas de espermatozoides de perus, com fertilidade, ou seja, alterações na cromatina espermática interferiram no processo de fertilização em perus, porém de forma pouco intensa. O autor ressaltou que a correlação negativa foi maior quando avaliou a taxa de eclosão do que a taxa de fertilidade, e concluíram que as alterações cromatínicas possuem ação negativa sobre o desenvolvimento embrionário, isto porque, ações deletérias sobre DNA poderiam determinar a inviabilidade do embrião prosseguir seu desenvolvimento.

Embora sendo constatado na literatura que em sêmen de galos férteis existe uma pequena quantidade de espermatozoides com baixa compactação de cromatina e alterações morfológicas (BELETTI e SOARES 2006b), também se sabe que defeitos morfológicos em espermatozoides podem ter implicações graves nas propriedades hidrodinâmicas destas células, incluindo efeitos negativos sobre movimentos retilíneos normais e progressões desuniformes, diminuindo as taxas de fertilidade (BELETTI & COSTA, 2003; BELETTI, COSTA & GUARDIEIRO 2005a).

SOARES & BELETTI (2006a) comentam que de acordo com trabalhos em mamíferos, as alterações de cromatina poderiam não alterar a capacidade de o espermatozoide fecundar o ovócito, ou seja, a taxa de fertilidade poderia ser alterada ou não, mas interfeririam na evolução do embrião, impedindo a formação de blastocisto ou mesmo levando a morte em fases pré-eclosão, havendo assim um impacto direto na taxa de eclosão.

Outros estudos em mamíferos como os de ELLINGTON et al (1998) e TWIGG, IRVINE & AITKEN (1998), concluíram, que alguns espermatozoides com anormalidades de cromatina são capazes de fertilizar ovócitos *in vivo* e *in vitro*, porém os danos do DNA podem permanecer durante todo o período embrionário para induzir a apoptose e posterior fragmentação do embrião, o que pode levar ao aborto. TWIGG, IRVINE & AITKEN (1998) comentam que sob circunstâncias normais de dano no

complexo DNA - proteína, esse poderia ser reparado pelo ovócito, não ocorrendo maiores consequências.

Como resultado do presente trabalho, foi observado também, maior número de perfuração espermática na membrana perivitelínea dos animais tratados em todas as idades testadas (30, 40 e 50 semanas).

A correlação entre fertilidade e eclosão e o número de perfuração na membrana perivitelínea, foi constatado por CHRISTIENSEN et al. (2005), onde, em seu estudo, linhagens selecionadas para crescimento rápido apresentaram índices inferiores de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, quando comparadas com linhagens selecionadas para produção de ovos. Em consequência, a fertilidade dos ovos e a viabilidade embrionária também foram afetadas negativamente.

FAIRCHILD & CRISTHENSEN (2005) ainda relacionaram a diminuição no número de perfurações com o aumento nos índices de mortalidade embrionária precoce.

Esta correlação entre eclosão, fertilidade e perfurações da membrana perivitelínea pode ser explicada, pois de acordo ROBERTSON et al. (1997), para que os espermatozoides realizem as perfurações é necessária complexa interação de parâmetros regulatórios hormonais e metabólicos aliada a fatores como: motilidade espermática, ligação entre o ovócito e o espermatozoide, indução da reação acrossomal e da hidrólise da membrana perivitelínica. Segundo o autor a técnica de contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica avalia o resultado da soma de todos os eventos citados acima, o que confere ao teste ampla capacidade de avaliação da fertilização aviária e de taxas com eclodibilidade.

Deve-se considerar a provável contribuição das galinhas na melhoria das taxas de fertilidade e eclosão, já que neste estudo, as fêmeas também receberam o antioxidante na dieta. O mecanismo antioxidante dos túbulos de estocagem seminal já foi proposto por BAKST (2015) e também RUTZ et al. (2005), que discorreram sobre a proteção dos espermatozoides contra o estresse oxidativo com o auxílio de mecanismos presentes nas fêmeas, como a presença das vesículas de transferência de moléculas antioxidantes, a reciclagem da vitamina E, em papel semelhante ao desempenhado pela vitamina C, conforme também demonstrado por BOHM et al. (1997).

TRIQUES et al (2016), verificou em sua pesquisa, que o aumento no número de perfurações está diretamente ligado ao número de espermatozoides que

conseguem atingir o ovócito no infundíbulo, indicando, desta forma, de maneira indireta a capacidade reprodutiva dos galos. Concluiu, que os resultados sugeriram que adicionar antioxidantes na ração de galos reprodutores acarretou em um aumento no número de espermatozoides produzidos pelos machos ou que as células depositadas na vagina tiveram melhores condições de sobrevivência no oviduto e conseguiram atingir o infundíbulo logo após a ovulação.

Outros autores descreveram importante função dos carotenoides dietéticos na redução do estresse oxidativo dos espermatozoides (MAKKER et al. 2009; BANSAL & BILASPURI 2010).

Outro dado importante é a ação pro-vitamina A da cantaxantina. A presença de vitamina A é essencial para reprodução nos machos, pois mantém a espermatogênese, através da proteção do epitélio germinativo e manutenção da integridade das células intersticiais produtoras de testosterona (ZANINI et al.,2001; CHAMPE et al. 2006).

ROCHA et al (2013), observou aumento de vitamina A na gema dos ovos provenientes de lotes tratados com cantaxantina e relacionou a melhoria da fertilidade das matrizes a dois fatores: aumento da vitamina A e proteção antioxidante dos espermatozoides.

Com relação ao tempo de vida das aves, observamos que o número médio de PEMP foi menor nas 50 semanas, quando comparado aos resultados de 30 e 40 semanas. Ainda, foi constatado que o tratamento que recebeu o antioxidante na dieta apresentou menores alterações na compactação de cromatina nas 50 semanas de vida, quando comparado a semana 30 de vida das aves. Isto sugere que a adição do antioxidante foi importante para a proteção dos efeitos da idade sobre a compactação da cromatina, embora os resultados da perfuração tenham apresentado um declínio.

O declínio da eficiência reprodutiva com o aumento da idade das matrizes, já é conhecido na literatura. ROCHA, et al (2013), encontraram que independente da dieta, a fertilidade reduziu 0,75% por semana de envelhecimento das matrizes entre 50 e 60 semanas de idade.

GUMALKA & KAPOWSKA (2005) estudaram dois lotes de matrizes pesadas, de diferentes idades inseminadas com sêmen de galos da mesma idade e observaram que as aves de 36 semanas tiveram dois dias a mais de fertilidade efetiva do que aves de 56 semanas.

HOCKING (1989) e LAKE (1989), afirmaram que a queda da fertilidade de matrizes pesadas inicia com 40 semanas de idade, sendo mais pronunciada após 50 semanas.

O efeito negativo da idade sobre a fertilidade poderia ser explicado pela maior susceptibilidade dos espermatozoides dos galos velhos aos danos oxidativos, o que, nesta pesquisa, foi compensado pela adição da cantaxantina à dieta, devido aos melhores resultados apresentados por aqueles reprodutores que receberam o antioxidante.

Sobre a capacidade de neutralização de radicais livres em relação a idade, WEIR e ROBAIRE (2007) compararam a atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides e a produção de radicais livres na maturação de espermatozoides de ratos velhos e novos e observaram queda na capacidade antioxidante associada ao aumento na produção de radicais livres com o envelhecimento dos animais. Os autores concluíram que a queda na qualidade espermática de animais velhos está associada à maior susceptibilidade dos espermatozoides aos danos oxidativos.

Segundo OPUWARI e HENKEL (2016), os radicais livres podem causar danos à cromatina, variando desde alterações na compactação até graves alterações no DNA. Portanto, o efeito antioxidante da cantaxantina provavelmente colaborou também na proteção da cromatina e não somente da membrana do espermatozoide.

RODRIGUES et al (2009) observaram maior número de alterações na cromatina nos animais velhos, com cromatina menos homogênea e com menor compactação em relação a cabeças normais, e que poderia estar influenciando negativamente a fertilidade.

SOARES & BELETTI (2006a) também observaram que galos velhos (60 semanas) apresentam maior número de alterações na compactação cromatínica do que galos jovens.

ROCHA & BAIÃO (2001) avaliaram sêmen de galos jovens (35 semanas) e velhos (68 semanas) e não encontraram diferença significativa nas características físicas espermáticas (motilidade, vigor e turbilhonamento), mostrando que a queda de fertilidade em galos velhos seria causada por outros fatores, como a perda da proteção contra o estresse oxidativo nas fêmeas, por exemplo.

Quanto à redução na fertilidade devido aos fatores relacionados às galinhas, pode ter ocorrido redução na eficiência do mecanismo de ação antioxidante dos TES sobre os espermatozoides armazenados no oviduto, com o avanço da idade (RUTZ

et al., 2005), o que teria sido compensado pela adição de cantaxantina na dieta das fêmeas.

O declínio “natural” na duração da fertilidade com a idade, observado nesta pesquisa, também pode estar associado a uma maior facilidade na liberação dos espermatozoides nos TES das galinhas, reduzindo o número de espermatozoides aptos a realizarem a fertilização do ovócito (RUTZ et al., 2007).

Quanto a fertilidade, no que diz respeito aos fatores relacionados às galinhas, a adição da cantaxantina também para as fêmeas pode ter contribuído para a melhoria na eficiência dos mecanismos de ação antioxidante dos TES sobre os espermatozoides armazenados no oviduto, com o avanço da idade (BAKST, 2015; RUTZ et al., 2005),

Portanto, além dos machos seria importante também suplementar as fêmeas durante a fase reprodutiva, devido ao papel desta, na condução e preparação dos espermatozoides até o local de fecundação.

Segundo GUMALKA & KAPOWSKA (2005) a duração da fertilidade está mais relacionada com a fêmea, por uma possível perda na capacidade de armazenamento dos túbulos de estocagem seminal. Eles observaram, que os índices de fertilidade diminuiriam com o aumento da idade das fêmeas, mesmo quando estas foram inseminadas com sêmen de galos mais jovens.

Vários autores propõem que para que os espermatozoides sobrevivam dentro dos TES das aves e mantenham sua capacidade de fertilização, eles necessitam de um aporte desta estrutura da fêmea que possuem, sugerido por seus estudos, funções primárias de: ser fonte de substratos para o metabolismo dos espermatozoides residentes; ser fonte de macromoléculas que alteram a função de fertilização do espermatozoide (fatores de decapacitação?) e conferir proteção contra o estresse oxidativo. (BAKST, 2011; FROMAN, 2011; BAKST, 1994; FROMAN, 2003; DAS SC, 2008).

Este estudo indicou que a probabilidade de lotes não suplementados com a cantaxantina apresentarem descompactação na cromatina dos espermatozoides é 1,82 vezes maior do que os que recebem o aditivo antioxidante nas 30 semanas de vida. Já nas 50 semanas de vida, essa proporção aumenta para 5,78 vezes. Isto sugere que o efeito negativo da idade sobre a eficiência reprodutiva das matrizes foi minimizado pela adição da cantaxantina à dieta.

Com relação aos resultados de desenvolvimento testicular, onde nesta

pesquisa, não foi observado diferenças entre as medidas de diâmetro total e altura de epitélio dos túbulos seminíferos nos diferentes tratamentos, também em sua pesquisa TRIQUES et al, (2016), onde foi avaliado o efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre características reprodutivas de machos reprodutores de frangos de corte na fase pós pico de produção, os autores também não encontraram diferenças no desenvolvimento testicular.

MCGARY (2002), afirmou haver uma correlação positiva entre o peso dos testículos e a produção espermática, e que esse pode ser um dos fatores que diferenciam o índice de fertilidade do lote. Assim também, como descrito por KEEL & ABNEY (1980), que volumes testiculares alterados, podem significar inibição do desenvolvimento testicular e todas suas funções exócrinas e endócrinas.

Em adição HEINLEIN & CHANG (2002), correlacionaram que um epitélio germinal, responsável pela produção de fluidos luminal é um pré-requisito essencial para a espermatogênese.

No entanto, YAMA, et al (2011), descreveu que não é inteiramente possível descrever a relação das alterações geométricas tubulares com a produção de espermatozoides, uma vez que os dados morfométricos são apenas uma parte da imagem completa, e que outros fatores são claramente importantes como o número de células espermátogênicas, de Sertoli, e que estes dados devem servir como modelos preliminares para um estudo da capacidade de fertilização como um todo.

GONZÁLES-MORAN (2008) afirmou que até as 12 semanas de vida do galo os túbulos seminíferos dos testículos são formados apenas por uma camada simples de células de Sertoli e espermátogônias, evoluindo, na medida em que o animal amadurece, para um epitélio seminífero estratificado e notória redução de tecido intersticial no galo sexualmente maduro. TRIQUES et al (2016) concluíram que a suplementação de antioxidantes desde a fase inicial da vida do galo, e não apenas na fase pós-pico como ocorreu em seu experimento, poderia surtir algum efeito na morfometria tubular.

No presente estudo os galos começaram a receber o aditivo antioxidante na dieta na 22 semana de vida, o que também pode ter contribuído para este resultado. Apesar de não existir diferença estatística na histomorfometria realizada no presente trabalho, a altura do epitélio apresentou uma tendência em ser maior nos animais tratados ($p=0,06$). Um dado importante consolidado na literatura é de que a vitamina A é essencial para reprodução nos machos, pois mantém a espermatogênese, através

da proteção do epitélio germinativo (ZANINI et al., 2001; CHAMPE et al. 2006), podendo ser esta uma explicação para esta tendência, já que a cantaxantina aumenta a quantidade de vitamina A (RUTZ et al., 2007).

Os efeitos do uso da cantaxantina como aditivo antioxidante nas dietas já está descrito na literatura por outros autores, demonstrando o grande interesse do mercado de matrizes de frango de corte, por este aditivo, por ser de possível comercialização.

TRIQUES et al (2016), constatou que a suplementação de antioxidantes (cantaxantina e vitamina D) pode influenciar positivamente a taxa de fertilidade no lote de matrizes. E concluíram que, ovos provenientes de galpões onde os galos foram suplementados com blend de antioxidantes apresentaram maior quantidade de perfurações espermáticas em membrana perivitelínica indicando a possibilidade de ganhos em fertilidade utilizando esses aditivos.

ROSA et al. (2010) alimentaram matrizes com 6mg/kg de cantaxantina e verificaram aumento de 1,08% na fertilidade, 3,0% na eclosão total e 2,4% na eclosão sobre ovos férteis quando comparado ao grupo de matrizes que não receberam cantaxantina na dieta.

MAKKER et al. (2009) e BANSAL & BILASPURI (2010) destacaram os antioxidantes dietéticos na redução do estresse oxidativo dos espermatozoides, sendo estes constituídos pelas vitaminas C, E, beta-carotenos, carotenoides e flavonóides.

ROCHA et al, (2013), em seu estudo constatou que a cantaxantina está incluída no grupo dos carotenoides e, adicionada à dieta dos galos e galinhas, pode exercer seu papel antioxidante de três formas: 1) no embrião – protegendo os tecidos embrionários na incubação, 2) no ovo – protegendo os nutrientes da gema durante o armazenamento para o embrião em desenvolvimento e, 3) nas matrizes pesadas – auxiliando nos mecanismos antioxidantes do sêmen e oviduto e reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides.

Em experimentos, SOUZA et al. (2008) e SCHER et al. (2009) adicionaram 6ppm de cantaxantina na dieta de matrizes e observaram redução do número de ovos inférteis e da mortalidade embrionária e melhora nas taxas de eclosão sobre ovos totais e ovos férteis incubados.

DUARTE, et al (2015), concluíram que a inclusão de Cantaxantina e 25-(OH)-D3 à dieta reduziu a mortalidade embrionária e aumentou o percentual de eclosão e o número de pintos viáveis produzidos por ave.

Outro estudo com matrizes de frango de corte, concluiu que a dieta com milho suplementada com cantaxantina influenciou na maior concentração de espermatozoides no período de 56 a 59 semanas de idade (FORGIARINI, et al. 2015)

FERREIRA (2010) adicionou 6ppm de cantaxantina na dieta dos galos com 40 a 59 semanas de idade e verificaram aumento na motilidade, concentração espermática e redução nas alterações morfológicas dos espermatozoides quando comparado aos galos que não receberam o antioxidante na dieta. A pesquisa atribuiu os efeitos à proteção antioxidante da cantaxantina dos ácidos graxos dos espermatozoides.

Contribuindo com estes dados já descritos na literatura, esta pesquisa demonstrou que o uso da cantaxantina na dieta, melhora os índices de compactação de cromatina dos espermatozoides, sugerindo que o aditivo minimiza os efeitos deletérios dos radicais livres sobre os espermatozoides desde o ejaculado até enquanto permanecem estocados nos TES das fêmeas, o que contribui para as melhores taxas de perfuração espermática e melhores taxas de eclosão e fertilidade do lote suplementado.

7. CONCLUSÃO

A adição de cantaxantina na dieta de matrizes reprodutoras de frango de corte melhora a eficiência reprodutiva, promovendo melhores índices de compactação de cromatina dos espermatozoides, melhores taxas de perfuração espermática da membrana perivitelínea e melhores taxas de eclosão e fertilidade.

8. REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira Proteína Animal. **Mercado Mundial**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial>. Acesso em 15 de junho de 2017.

ACUFF, R.V.; THEDFORD, S.S.; HIDIROGLOU, N.N.; PAPAS, A.M.; ODOM JR., T.A. Relative bioavailability of RRR- and all-rac-a-tocopheryl acetate in humans: studies using deuterated compounds. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 397-402, 1994.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v 7, cap. 4, pág.659-668, 1995.

AITKEN R.J., BUCKINGHAN D.W., CARRERAS A., IRVINE D.S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, p.495-504, 1996.

ALLEN T.E., GRIGG G.W. Sperm transport in the fowl. **Australian Journal Agronomy Research**, v.8, p.788-789, 1957.

ANGELES, M.; SCHEIDELER, S. Effect of diet, level and source of xanthophyll on hen performance and egg yolk pigmentation. Annual Meeting Abstracts Pinnstater Conference Center. In: **Official Journal of the Poultry Science Association**. v. 77. 1-18, 1998.

ARAÚJO, D.S. **Alterações cromáticas em espermatozoides de perus submetidos a dois níveis de proteína bruta na ração em três diferentes idades**. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Uberlândia. 2013.

ARRUDA, S. F. **Potencial antioxidante de vegetais folhosos in vivo**. Tese de doutorado em Biologia Molecular. Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Brasília. 2004.

ATESSAHIN A., BUCAK, M.N., TUNCER P.B., KIZIL M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.77, p.38-44, 2008.

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

BAIÃO, N. C.; MENDEZ, J.; MATEOS, K.; MATEOS, G. G. Influence of type of and source of xanthophylls and level of use on yolk pigmentation. Poultry Science Association. In: **Official Journal of the Poultry Science Association**, 1996.

BAKST M.R, MCGARY S, ESTEVEZ I, KNAPP T. Use of nonsettable eggs to evaluate turkey hen fertility. **Journal Apply Poultry Research**, v.11, p.402-405, 2002.

BAKST M.R, WISHART G.J. Brillard JP. Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. **Poultry Science**; 5: 117 – 43, 1994.

BAKST M.R. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. **Journal Animal Science**. 89: 1323 -9, 2011.

BAKST MR. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. **Journal Animal Science**, v 89: 1323 -9, 2009.

BAKST MR. Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. **Journal Animal Science**, 89: 1323 -9, 2011.

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

BAKST, M. R.; BAHR, J. M. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: **HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal**. 6ª Edição. Manole. São Paulo. 390-470, 1995.

BAKST, M. R.; MCGARY, S.; ESTEVEZ, I.; KNAPP, T. Use of nonsettable eggs to evaluate turkey hen fertility. **The Journal of Applied Poultry Research**. v 11. 402-405, 2002.

BAKST, M. R.; WISHART, G.; BRILLARD, J. P. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. **Poultry Science**, Savoy, Rev. 5, p. 117-143, 1994.

BAKST, M.R., HOLM, L. Impact of egg storage on carbonic anhydrase activity during early embryogenesis in turkey. **Poultry Science**, v. 82, p. 1193-1197, 2003.

BAKST, M; BAUCHAN, G. Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. **Theriogenology**. v. 83 1438 – 1444, 2015.

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

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

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

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**. v 2011. 2010.

BANSAL, A.K., BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, 2010.

BARBER, A. A.; BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence and significance in animal tissues. **Advances in Gerontological Research**, v 2. 355-403, 1967.

BEARDSWORTH, P.M; HERNANDEZ, J.M. Canthaxanthin is more than a safe carotenoid. **World Poultry**, v.19, p. 14-15, 2003.

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

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 92-96, 2013.

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, n. 3, 2004.

BELETTI, M. E., MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA- protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 73-90, 1996.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology.**, v.25, p.97-107, 2003.

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

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, Louisville, v. 79, n. 1, p. 17-23, 2004.

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

BENZIE, I. F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v 47. 233-261, 1996.

BIASE, N. G.; FERREIRA, D. F. Comparações múltiplas e testes simultâneas para parâmetros binomiais de k populações independentes. **Revista Brasileira Biometria**, São Paulo, v.27, n.3, p.301-323, 2009.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETE, S; CORMIER, N.; SIRAD, M. A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**. v 57. 1105-1122, 2002.

BILODEAU J.F., CHATTERJEE S., SIRARD M.A., GAGNON C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction Development**, v.55, p.282-288, 2000.

BITTAR FILHO, I; RIBEIRO, R. S. Manejo de machos. In: **Manejo de Matrizes de Corte**. FACTA. Campinas. 9:187-194, 2005.

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

BÖHM, F.; EDGE, R.; LAND, E. J.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOT, T. G. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. **Journal of American Chemical Society**. v 119. 621:622, 1997.

BONGALHARDO, D. C.; SOMNAPAN-KAKUDA, N.; BUHR, M. M. Isolations and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. **Poultry Science**. v 81. 1877-1883, 2002.

BONGALHARDO, D.C. Produção e preservação do sêmen de galos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.37, n2, p.131-135, abri/jun. 2013.

BOZZOLA JJ, RUSSEL LD. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2^a ed. Sudbury: MA Jones and Bartlett, 1998.

BRANDALIZE, V. H. Programas de alimentação de matrizes pesadas. In: **Manejo de Matrizes de Corte**. FACTA. Campinas. 11:217-239, 2005.

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

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

BRILLARD, J. P. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination, **Poultry Science**, v.72, p. 923-928, 1993.

BUCAK M.N., ATESSAHIN A., YÜCE A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128-134, 2008.

BUCAK M.N., SARIÖZKAN S., TUNCER P.B., ULUTAS P.A., AKAÇADAG H.I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.81, p.90-95, 2009.

BULL, M. L. Anatomia do aparelho reprodutor do macho e da fêmea. In: **Fundação Apinco de Ciência e Tecnologias Avícolas. Fisiologia da reprodução das aves**. Campinas, FACTA, São Paulo. p. 1-10, 1994.

BURKE, W.H. Reprodução das aves. In: **Swenson M.J. & Reece W.O. Dukes/ Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. Cap. 38. p.660-680, 1996.

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.

CARREL D.T. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v.97, p.267-274, 2012.

CHAMPE, P.C. HARVEY, R.A. FERRIER, D.R. **Bioquímica ilustrada**. 4 edição. 533 p. Artes Médicas. Porto Alegre. 2006.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiology Review**. v 59. 527-605, 1979.

CHERIAN, G., TRABER, M.G., GOEGER, M.P., LEORNARD, S.W. Conjugated linoleic acid and fish oil in laying hen diets: effects on egg fatty acids, thiobarbituric acid reactive substances, and tocopherols during storage. **Poultry Science**, v. 86, p. 953-958, 2007.

CHIVA, M.; KASINSKY, H. F.; SUBIRANA, J. A. Characterization of protamines from four avian species. **FEBS Letters**, v. 215, n. 2, p. 237-240, 1987.

CLULOW J., JONES R.C. Studies of fluid and spermatozoa transport in the extratesticular genital ducts of the Japanese quail. **Journal Anatomy**, v.157, p.1-11, 1988.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA BRASIL – CNA. **Balanco 2016 e Perspectivas 2017**. 2017. Disponível em: <http://www.cnabrasil.org.br/balanco-2016-e-perspectivas-2017>. Acesso em: 15 de junho de 2017.

COURTENS, J. L.; LOIR, M. A citochemical study of nuclear changes in boar, bull, goat, mouse, rat and stallion spermatides. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 74, p. 327-340, 1981.

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

DARDEN, J. R.; MARINI, P. J.; WALKER, R. M.; RHOADS, M. L.; DONOGHUE, A. M. Efficacy of sperm mobility assessment in commercial flocks and the relationship of sperm mobility and insemination dose with fertility in turkeys. **Poultry Science**. 79:1797-1802, 2000.

DAS S.C, ISOBE N., YOSHIMURA Y. Mechanism of prolonges sperm storage and sperm survivability in hen oviduct: a review. **Am Journal Reproduction Immunology**. 60: 477 – 81, 2008.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v 274. 532-538, 1989.

DOBRINSKI, I.; HUGHES, H.P.A.; BARTH, A.D. Flow cytometric microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 101, p.531-538, 1994.

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

DONOGHUE, A. M.; WISHART, G. J. Storage of poultry semen. **Animal Reproduction Science**. 62:213-232, 2000.

DUARTE, V., SILVA, C., SANTOS, M.F.R, PERIM, F.S. Inclusion of canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol in the diet of broiler breeders on performance and incubation parameters. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.11, p.2050-2055, nov, 2015.

DUNCAN, I. J. H.; HOCKING, P. M.; SEAWRIGHT. E. Sexual behaviour and fertility in broiler breeder domestic fowl. **Applied Animal Behaviour Science**. v26. 3:201-213. 37, 1990.

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

EDGE, R.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. The carotenoids as antioxidants: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v 41. 189-200, 1997.

ELLINGTON J.E., EVENSON D.P., FLEMING J.E., BRISBOIS R.S., HISS G.A., BRODER S.J., WRIGHT R.W. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and Sterility**, 69, 643- 649, 1998.

ETCHES, R. J. Reproducción Aviar. In: **Acribia**. Zaragoza. 339p, 1996.

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

EUROPEAN COMMISSION. **Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of canthaxanthin in feedingstuffs for salmon and trout, laying hens, and other poultry**, abril, 2002. Disponibilidade em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out81_en.pdf. Acesso em 20 de junho 2017.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

- FAIRCHILD, B.D., CRISTHENSEN, V.L. Influence of hen age and number of inseminated sperm on the number of holes hydrolyzed in the inner perivitelline layer of turkey eggs, **Journal Applied of Poultry Research**, v. 14, p. 576-571, 2005.
- FERREIRA, P. B. **Cantaxantina e 25-hidroxicolecalciferol e seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos de galos**. In: Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- FOFANOVA, K.A. Morphological data on polyspermy in chickens, **Feeding Procedures**, v. 24, p. T239- T247, 1965.
- FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. **Carotenoides cores atraentes e ação biológica**. In: Biotecnologia, ciência e desenvolvimento, ed. 13, pág. 40-45, 2000.
- FOOTE, C. S.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen x carotenoid quenching parallels biological protection. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v 92. 5216-5218, 1970.
- FORGIARINI, J. **Cantaxantina em dietas com milho ou sorgo sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Santa Maria. 2015.
- FRANCHINI, A, SIRRI, F, TALLARICO, N, MINELI, G, IAFFALDANO, N, MELUZZI, A. Oxidative stability and sensory and functional properties of eggs from laying hens fed supranutritional doses of vitamins E and C. **Poultry Science**, v. 81, p. 1744-1750, 2002.
- FROMAM D.P, FELTMAN A.J, PENDARVIS K, COOKSEY A.M, BURGESS S.C, RHOADS D.D. A proteome – based model for sperm mobility pheno-type. **Journal Animal Science**; 89: 1330 – 7, 2011.

FROMAN D. Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology Reproduction**; 69: 248 – 53, 2003.

FROMAN, D. P.; FELTMANN, A. J. Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**. v 58. 2:379-384, 1998.

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

GARCIA, E. A.; MENDES, A. A.; PIZZOLANTE, C. C.; GONÇALVES, H. C. OLIVEIRA, R. P.; SILVA, M. A. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v 4, Campinas, 2002.

GARDNER, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. In: **Free radical Biology Medicin**, v 7. 65-86, 1989.

GATEWOOD JM, COOK GR, BALHORN R, SCHMID CW, BRADBURY EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. **Journal Biology Chemical**. 265:20662–20666, 1990.

GIAMPIETRO, A, SCATOLINI, A.M., BOIAGO, M.M., CORÓ, D.M.O, SOUZA, H.B.A., SOUZA, P.A., LIMA, T.M.A, PIZZOLANTE, C.C. Estudo da metodologia de TBARS em ovos. ovos. **Produção Animal - Avicultura, Revista do Avisite**, Campinas, n. 13, p. 18 - 18, maio. 2008.

GILBERT, A. B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: **HAFEZ, E.S. E. Reprodução Animal**. 6ª Edição. Manole. São Paulo. 488-515, 1982.

GOODWIN, T. W. **Chemistry and biochemistry of plant pigments**. Academic Press, 2004.

GONZÁLES-MORAN, M. G.; GUERRA-ARAIZA, C.; CAMPOS, M. G.; CAMACHO-ARROYO, I. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature and aged chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v. 35, n. 4, p. 371- 379, 2008.

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

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

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme for aerobic life. **Plant Physiology**. v 141. 312-322, 2006.

HAMMADEH, M. E.; FILIPPOS, A.;HAMAD, M. F. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. **International Journal of Fertility and Sterility**. v 3. 3:87-110, 2009.

HAMMADEH, M.E., FILIPPOS, A, HAMAD, M.F. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 3, n. 3, p. 87-110, 2009.

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

HEILEIN, C. & CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocrinology Review**., 23(2):175-200, 2002.

HESS R.A, THURSTON R.J, BIELLIER H.V. Morphology of the epididymal region and ductus deferents of the turkey. **Journal Anatomy**, v.122, p.241-252, 1976.

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.

HOGG, N. KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochim, Biophys. Acta.** v 1411. 3:378-384, 1999.

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

HOLSBERGER, D. R.; DONOGHUE, A. M.; FROMAN, D. P.; OTTINGER, M. A. Assessment of ejaculate quality and sperm characteristics in turkeys: sperm mobility phenotype is independent of time. **Poultry Science.** v 77. 11:1711-1717, 1998.

HOOD, J. E. **An attempt at alleviating heat stress infertility in male broiler breeder chickens with dietary ascorbic acid.** In: Mississippi State University, 1999.

HSIEH, R. J.; KINSELLA, J. E. Oxidations of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Advances Food Nutrition Research.** v 33. 233-341, 1989.

IAFFALDANO, N.; MELUZZI, A. Effect of dialysis on quality characteristics of turkey semen during liquid storage. **Theriogenology.** v 60. 421-427, 2003.

ILIO K.Y, HESS R.A. Structure and function of the ductuli efferents: a review. **Microscopy Research Technology**, v.29, p.432-467, 1994.

JAENISCH, F.R.F. **Estudo anatomopatológico dos testículos e epidídimos e características físicas e morfológicas do sêmen de *Gallus domesticus* com diferentes pesos corporais.** Belo Horizonte. 69p. Dissertação de Mestrado em Patologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 1989.

JOHNSON G.D., LALANCETTE C., LINNEMANN A.K., LEDUC F., BOISSONNEAULT G., KRAWETZ S.A.. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v.141, p.21-36, 2011.

KARACA, A. G.; PARKER, H. M.; MCDANIEL, C. D. Elevated body temperature directly contributes to heat stress infertility of broiler breeder males. **Poultry Science**. 81: 1892-1897, 2002.

KARADAS, F.; PAPPAS, A.C.; SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K. Embryonic development within carotenoid-enriched eggs influences the post-hatch carotenoid status of the chicken. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, v. 141, p. 244-251, 2005.

KASIMANICKAM R., PELZER K.D., KASIMANICKAM V., SWECKER W.S., THATCHER C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.

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

KEEL, B. A. & Abney, T. O. Influence of bilateral cryptorchidism in the mature rat: Alterations in testicular function and serum hormone levels. **Endocrinology**, 107(4):1226-33, 1980.

KIM, K. S.; PAIK, I. Y.; WOO, J. H.; KANG, B. Y. The effect of training type on oxidative damage and antioxidant capacity during three-dimensional space exercise. **Medical Principles and Practice**. v 19. 133-141, 2010.

KING, L. M.; KIRBY, J. D.; FROMAN, D. P.; SONSTEGARD, T. S.; HARRY, D. E.; DARDEN, J. R.; MARINI, P. J.; WALKER, R. M.; RHOADS, M. L.; DONOGHUE, A. M. Efficacy of sperm mobility assessment in commercial flocks and the relationship of sperm mobility and insemination dose with fertility in turkeys. **Poultry Science**. 79:1797-1802, 2000.

KIRBY, J. D.; TRESSLER, C. J.; KIRBY, Y. K. Evaluation of the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. **Poultry Science**. v 77. 11:1688-1694, 1998.

KUSS, F. **Agentes oxidantes e antioxidantes**. In: Programa de Pós-Graduação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

KUSTER, C. E.; SINGER, R. S.; ALTHOUSE, G. C. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. **Theriogenology**. 61:691-703, 2004.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, 46, 244-282, 2007.

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

LEWIN, L. M. et al. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 133-137, 1999.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v 37. 3:293-303, 2001.

LOIR, M.; LINNEAU, M. Partial characterization of ram spermatid basic nuclear proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 80, p. 974-982, 1978.

LUCASZEWICS, E. Study of diluents for cock's semen storage in the light of laboratory estimation and fertility rates. **Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu**, Zootechnika XXX 168:43-59, 1988.

LUCASZEWICZ, E. Cryopreservation of *Anser anser* L. gander semen. **Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu** 440, Rozprawy CXC. 1-11, 2002.

LUCASZEWICZ, E.; JERYSZ, A.; PARTYKA, A.; SIUDZINSKA, A. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. **Veterinary Science**. 85:583-588. 2008.

LUCHESE, L.; GARCEZ, M.; SALVADOR, M.; PASQUALOTTO, E. B.; PASQUALOTTO, F. F. A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina. **Reprodução e Climatério**. v 22. 7-14, 2007.

MACIEL, M. P. **Características reprodutivas de galos leves e semi-pesados submetidos a diferentes fotoperíodos**. In: Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

MAIA V. **Técnica Histológica**. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, p.70-136, 1979.

MAKKER, K, AGARWAL, A, SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal Medical Research**, v. 129, p. 357-367, 2009.

MARTÍ E., MARTI J.I., MUIÑO-BLANCO T., CEBRIÁN-PÉREZ J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal Andrology**, v.29, p.459-467, 2008.

MARTIN-RILLO, S. et al. Bora semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**. v31. 4:519-526, 1996.

MCBRIDE, J. It plants pigments paint an antioxidants substance rainbow. **Agricultural Research**. Washington. v 44. 4-8, 1996.

MCDANIEL, G. R.; BRAKE, K.; BUSHONG, R. D. Factors affecting broiler breeders performance. 1. Relationship of daily feed intake level to reproductive performance of pullets. **Poultry Science**. 60:307-312, 1981.

MCDOWELL, L. R. **Vitamin in animal nutrition: comparative aspect ti human nutrition**. Washington: Academic. 486p, 1989.

MCGARY, S.; ESTEVEZ, I.; BAKST, M. R. Phenotypic traits as reliable indicators of fertility in male broiler breeders. **Poultry Science**. v 81. 102-111, 2002.

MCGARY BROUGHER, S.; ESTEVEZ, I.; OTTINGER, M. A. Can testosterone and corticosterone predicted the rate of display of male sexual behavior, development of secondary characters and fertility potential in primary broiler breeders? **Poultry Science**. v 46. 621-625, 2005.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas. v 54. 149-155, 2004.

MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, p.387- 392, 1982.

MISRO M.M., CHOUDHURY L., UPRETI K., GAUTAM D., CHAKI S.P., MAHAJAN A.S., BABBAR R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative streee in subjects presenting a normal semen profile. **International Journal Andrology**, v.27, p.82-87, 2004.

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

MOSS, T. A.; MELROSE, D. R.; REED, H. C. Spermatogenesis, semen and artificial insemination. In: **COLE, D. J. A. Fertility in domestic animals**. 59-106.J. V. 2003, 1978.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2002.

NORDBERG J., ARNÉR E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology Medicin**, v.31, p.1287-1312, 2001.

O'FLAHERTY C., BEORLEGUI N., BECONI M.T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal Andrology**, v.26, p.109-114, 2003.

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

OLSON, J. A. Bioavailability of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v 49. 21-25, 1999.

OPUWARI, C.S.; HENKEL, R.R. An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. **BioMed Research International**, v.2016, ID 9540142, 11p, 2016.

ORTEGA, A. M. Peroxidación lipídica y antioxidantes em la preservación de sêmen: uma revisão. **Interciencia**. v 28. 699-704, 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química dos alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. Ed. Edgard Blücher. São Paulo. 155-157, 2004.

RITCHISON, G. **Avian reproduction**: anatomy and the bird egg. 2013. Disponível em <http://people.eku.edu/ritchisong/avianreproduction/html>. Acesso em: 17 de junho de 2017.

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

- ROCHA JÚNIOR, J.M.; BAIÃO, N.C. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.53, p.683-685, 2001.
- ROCHA J.S.R.; BARBOSA V.M.; LARA L.J.C.; BAIÃO, N.C.; CANÇADO, S.V.; LANA A.M.Q.; POMPEU, M.A.; VASCONCELOS R.J.C.; MACHADO, A.L.C.; MIRANDA, D.J.A. The effect of storage and dietary canthaxanthin on fertile egg quality and embryonic development. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.65, n.3, p.792-800, 2013.
- ROCK, C. L. et al. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**. v 75. 185-197, 1997.
- RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v 61, p.1302-1307, 2009.
- RODRIGUES, A. C. N.; MOURA, T.F.; SILVA, L.V.P.; BELETTI, M. E. Análise da compactação da cromatina de espermatozoides de galo (*Gallus gallus*) e determinação do seu período de armazenamento e distribuição na espermateca de galinha. **Biotemas**, v.24, p. 65-73, 2011.
- RODRIGUES, W.C. Teste de Kruskal-Wallis (K-W). **Estatística na Mão**. 2016. Disponível em: <http://estatisticanamao.agroamb.com.br/artigos?ID=12>. Acesso em: 24.06.2017.
- ROSA, A.P., SCHER, A, DUARTE, V., BOEMO, L, VIEIRA, T.N.N, FERREIRA JR, J.A.G., SORBARA, J.O.B. Supplementation of canthaxanthin to broiler breeders diet on broiler chick hatchery parameters and egg yolk TBARS. **Anais...** International Poultry Scientific Forum, Atlanta. Abstracts... Atlanta: Georgia World Congress Center, 2010, p. 39, 2010.
- ROTHSCHILD, L. **Fertilization**. Londres, Inglaterra: Methuen Co., 1956.

ROZEMBOIM, I.; AHARONY, T.; YAHAV, S. The effect of melatonin administration on circulating plasma luteinizing hormone concentration in castrated White Leghorn roosters. **Poultry Science**. v 81. 1354-1359, 2002.

RUMEL, D. "Odds ratio": algumas considerações. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 3, 1986.

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

RUTZ, F, ANCIUTI, M.A, PAN, E.A. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. In: MACARI, M.; MENDES, A.A. **Manejo de matrizes de corte**. 1. ed. Campinas: FACTA, 2005.

SARIÖZKAN S., BUCAK M.N., TUNCER P.B., ULUTAS P.A., BILGEN A. The influence of cystein and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Bull sêmen following cryopreservation. **Cryobiology**, v.58, p.134-138, 2009.

SCHER, A, ROSA, A.P, SORBARA, J.O.B, DUARTE, V, BOEMO, L, VIEIRA, T.N.N. Efeitos da adição de HyD e Carophyll Red à dieta de matrizes de corte sobre a incubação artificial. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2009, Porto Alegre. **Anais do Prêmio Lamas da...** Campinas: Facta, 2009.

SHAMI, N. J. I.E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, Campinas. v 17. 2:236-277, 2004.

SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides 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 espermatozóides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** .São Paulo, v. 43, n. 4, p. 554-560, 2006b.
- SOUTHON, S. Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. **Food Research International**, v 33. 211-227, 2000.
- SOUZA, R.A, SOUZA, P.A, SOUZA, R.C, NEVES, A.C.R.S. Efeito da utilização de Carophyll Red nos índices reprodutivos de matrizes de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Supl. 10, p. 32, 2008.
- SPITELLER, P.; SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe²⁺/O₂ or Fe³⁺/O₂ is used as oxidant. **Biochim Biophys Acta**. v 1392. 23-40, 1998.
- STAINES, H.J, MIDDLETON, R.C., LAUGHLIN, K.F., WISHRT, G.J. Quantification of a sperm-egg interaction for estimating the mating efficiency of broiler breeder flocks, **British Poultry Science**, v. 39, p. 273-277, 1998.
- STURKIE P.D, OPEL H. Reproduction in the male, fertilization and early embryonic development. *In*: Sturkie PD (Ed.). **Avian physiology**. 3rd.ed. New York: Springer-Verlag. Chapter 17, 1976.
- SURAI, A.P, SURAI, P.F, STEINBERG, W, WAKEMAN, W.G, SPEAKE, B.K, SPARKES, N.H.C. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **British Poultry Science**, v. 44, p. 612-619, 2003.
- SURAI, P. F. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **British Poultry Science**. v 44. 612-619, 2003.
- SURAI, P. F. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. **Nottingham University Press**, 2002.

SURAI, P. F.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Relationship between vitamin E content a susceptibility to lipid peroxidation in tissues of the newly hatched chick. **British Poultry Science**. v 40. 406-410, 1999.

SURAI, P. F.; SPEAKE, B. K. Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. **Journal Nutritional Biochemistry**. v 9. 645-651, 1998.

SWAN, R. A.; SICOURI, O. Evidence of sperm storage in the female ostrich. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v.77, p. 649-650, 1999.

TANHAICHITR, N., SHHBON, P., TALUPPETH, N. CHALERMISARACHAI, P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. **Experimental Cell Research**. 117. 347-350. 1978.

TINGARI, M. D; LAKE, P. E. Uptake of spermatozoa by the ductuli efferentes after ligation of the ductus deferens of the domestic fowl. **Journal of Anatomy**, v.109, p.353-354, 1971.

TRIQUES, G. E.; SCHMIDT, J.M; ORO, C.S; BORDIGNON, H.F.; DONIN, D. G., FERNANDES. J. I. M. Effect of dietary antioxidant supplementation on reproductive characteristics of male broiler breeders during the post-peak production phase. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, suplemento 1, p. 2557-2566, 2016.

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J.Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 7, p.1864-71, 1998.

VAN KREY, H. P.; BALINDER, R. J.; COMPTON, M. M. Storage and evacuation of spermatozoa from the uterovaginal sperm host glands in domestic fowl. **Poultry Science**, Savoy, v. 60, p. 871- 877, 1981.

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

- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WEIR, C. P.; ROBAIRE, B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. **Journal of Andrology**. v 28. 2:229-240, 2007.
- WILLIAMS, A. W.; BOILEAU, T. W. M.; ERDMAN, J. W. Jr. Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1998.
- WISHART, J.G. Quantitative aspects of sperm:egg interaction in chickens and turkeys, **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 81-92, 1997.
- WÓJCIAK K.M., DOLATOWSKI Z.J. Oxidative stability of fermented meat products. Acta Sci.Pol. **Technology of Aliments**. 11 (2), 99-109, 2012.
- YAMA, O. E.; DURU, F. I.; OREMOSU, A. A.; NORONHA, C. C. & ABAYOMI, O. Stereological evaluation of the effects of Momordica charantia, antioxidants and testosterone on seminiferous tubules of rat. **Internacional Journal Morphology**, 29(3):1062-1068, 2011.
- ZANIBONI, L.; BAKST, M. R. Localization of aquaporins in the sperm storage tubules in the turkey oviduct. **Poultry Science**, Savoy, v. 83, p. 1209-1212, 2004.
- ZANINI, S. F. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de galos leves. 2001. **In:** Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- ZINI A., GARRELS K., PHANG D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v.55, p.922-926, 2000.

ANEXO 1 - Especificações Nutricionais para a Fêmea Matriz Linhagem ROSS AP95

		Inicial		Crescimento		Postura 1		Postura 2 ^o		Postura 3 ^o	
Idade	dias	0-28 dias		29 dias até 5% de Produção		A partir de 5% de Produção até 245 dias		246-350 dias		Após 351 dias	
Energia Metabolizável (kg)	kcal	2800		2800		2800		2800		2800	
AMINOÁCIDOS*		Total	Digestível	Total	Digestível	Total	Digestível	Total	Digestível	Total	Digestível
Lisina	%	1,06	0,95	0,68	0,61	0,67	0,60	0,62	0,56	0,58	0,52
Metionina + Cistina	%	0,84	0,74	0,63	0,55	0,67	0,59	0,65	0,57	0,59	0,54
Metionina	%	0,51	0,46	0,38	0,35	0,41	0,37	0,40	0,36	0,36	0,35
Treonina	%	0,75	0,66	0,54	0,48	0,55	0,49	0,53	0,47	0,51	0,47
Valina	%	0,80	0,71	0,64	0,57	0,63	0,56	0,60	0,53	0,57	0,51
IsoLeucina	%	0,70	0,62	0,56	0,50	0,56	0,50	0,54	0,48	0,51	0,45
Arginina	%	1,17	1,05	0,84	0,76	0,88	0,79	0,86	0,77	0,80	0,72
Triptofano	%	0,19	0,16	0,16	0,14	0,16	0,14	0,15	0,13	0,14	0,12
Leucina	%	1,23	1,11	0,84	0,76	1,04	0,94	1,00	0,90	0,96	0,86
Proteína Bruta	%	19,00		14,00-15,00		15,00		14,00		13,00	
MINERAIS*											
Cálcio	%	1,00		0,90		3,00		3,20		3,40	
Fósforo Disponível	%	0,45		0,42		0,35		0,33		0,32	
Sódio	%	0,18-0,23		0,18-0,23		0,18-0,23		0,18-0,23		0,18-0,23	
Cloretos	%	0,18-0,23		0,18-0,23		0,18-0,23		0,18-0,23		0,18-0,23	
Potássio	%	0,40-0,90		0,40-0,90		0,60-0,90		0,60-0,90		0,60-0,90	
SUPLEMENTAÇÃO DE MICROMINERAIS POR KG											
Cobre	mg	16						10			
Iodo	mg	1,25						2,00			
Ferro	mg	40						50			
Manganês	mg	120						120			
Selênio	mg	0,30						0,30			
Zinco	mg	110						110			
SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS POR KG											
		Alimento base trigo		Alimento base milho		Alimento base trigo		Alimento base milho			
Vitamina A	IU	11000		10000		12000		11000			
Vitamina D3	IU	3500		3500		3500		3500			
Vitamina E	IU	100		100		100		100			
Vitamina K (Menadiona)	mg	3		3		5		5			
Tiamina (B1)	mg	3		3		3		3			
Riboflavina (B2)	mg	6		6		12		12			
Ácido Nicotínico	mg	30		35		50		55			
Ácido Pantotênico	mg	13		15		13		15			
Piridoxina (B6)	mg	4		3		5		4			
Biotina	mg	0,20		0,15		0,30		0,25			
Ácido Fólico	mg	1,50		1,50		2,00		2,00			
Vitamina B12	mg	0,02		0,02		0,03		0,03			
ESPECIFICAÇÕES MÍNIMAS											
Colina por kg	mg	1400		1300		1200		1050		1050	
Ácido Linoleico	%	1,00		1,00		1,25		1,25		1,25	

ANEXO 2 - Especificações Nutricionais para a Macho Matriz Linhagem ROSS AP95

		Nutrientes para o Macho	
Energia Metabolizável (kg)	kcal	2700	
AMINOÁCIDOS*			
		Total	Digestível
Lisina	%	0,49	0,44
Metionina + Cistina	%	0,48	0,42
Metionina	%	0,31	0,28
Treonina	%	0,38	0,33
Valina	%	0,42	0,37
IsoLeucina	%	0,39	0,34
Arginina	%	0,58	0,52
Triptofano	%	0,09	0,08
Leucina	%	0,58	0,52
Proteína Bruta			
	%	11,50	
MINERAIS*			
Cálcio	%	0,70	
Fósforo Disponível	%	0,35	
Sódio	%	0,18-0,23	
Cloretos	%	0,18-0,23	
Potássio	%	0,60-0,90	
SUPLEMENTAÇÃO DE MICROMINERAIS POR KG			
Cobre	mg	10	
Iodo	mg	2,00	
Ferro	mg	50	
Manganês	mg	120	
Selênio	mg	0,30	
Zinco	mg	110	
SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINAS POR KG			
		Alimento Base trigo	Alimento Base milho
Vitamina A	IU	12000	11000
Vitamina D3	IU	3500	3500
Vitamina E	IU	100	100
Vitamina K (Menadiona)	mg	5	5
Tiamina (B1)	mg	3	3
Riboflavina (B2)	mg	12	12
Ácido Nicotínico	mg	50	55
Ácido Pantotênico	mg	13	15
Piridoxina (B6)	mg	5	4
Biotina	mg	0,30	0,25
Ácido Fólico	mg	2,00	2,00
Vitamina B12	mg	0,03	0,03
ESPECIFICAÇÕES MÍNIMAS			
Colina por kg	mg	1000	
Ácido Linoleico	%	1,00	