

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA- FAMEV UFU
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ROGÉRIO REIS SILVA

RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE GALOS
(*Gallus gallus*) E TAXA DE ECLOSÃO DE OVOS

UBERLÂNDIA

2023

ROGÉRIO REIS SILVA

**RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE GALOS
(*Gallus gallus*) E TAXA DE ECLOSÃO DE OVOS**

Trabalho de conclusão de curso Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito à aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso
II.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2023

ROGÉRIO REIS SILVA

**RELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE GALOS
(*Gallus gallus*) E TAXA DE ECLOSÃO DE OVOS**

Trabalho de conclusão de curso Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito à aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA, 2023

BANCA EXAMINADORA:

MARCELO EMÍLIO BELETTI - DOUTOR (UNICAMP)

BELCHIOLINA BEATRIZ FONSECA - DOUTORA (UFU)

LUCIANA BEATRIZ TIAGO OLIVEIRA - MESTRE (UFU)

DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS,
QUE DE TUDO FIZERAM POR MIM E
TAMBÉM AOS MESTRES QUE ME
INSTRUIRAM E GUIARAM ATÉ AQUI.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Marcelo por aceitar ser meu orientador neste trabalho e pelos dias e horas de instrução investidos em mim, pela paciência e disponibilidade, mesmo em momentos difíceis, homem que tenho grande admiração e respeito. Também sou grato a Luciana pelo ensino, paciência e palavras amigas durante a confecção deste projeto. Demonstro aqui meu contentamento em reconhecer a UFU como fator determinante na minha carreira que começou aqui... e que sem esta instituição pública de alto prestígio, história e de grande qualidade, eu nada seria.

Aos amigos que fiz que participaram do meu crescimento, Maria Vitória, Lucas, Carlos e Maria, Ully, Ícaro, aos amigos da Panta e tantos outros, muito obrigado. Bem como aos amigos e companheiros de república com quem partilhei tanto de minha vivência. Amigos e colegas do laboratório: professora Bia, Simone, Lara, Gabriela, Professora Daise e Professora Roberta, todas mulheres de grande garra e inteligência que tanto me ensinaram ao longo desses anos.

Gostaria de agradecer também ao conselho nacional de desenvolvimento e pesquisa (CNPQ) pelos anos de bolsa de iniciação científica e às pesquisas que participei durante minha graduação.

Reconheço e sou grato também, aos meus tios Vagner e Elenice e a chácara a qual tanto fui na minha adolescência, foi lá que tudo começou, com um pequeno projeto de galinheiro, confecção de uma chocadeira, criação, venda de ovos e de frangos caipiras, foi lá que meu amor pelo meu trabalho começou, foi lá que tive o vislumbre de um futuro como Médico Veterinário.

Aos meus pais não só agradeço, mas a eles dedico meu trabalho e minha graduação, pois sem o apoio incondicional nos momentos mais difíceis, não sei se teria chegado até aqui. Obrigado pai, obrigado mãe!

“ Na construção do nosso conhecimento, os livros são os tijolos e os professores os pedreiros”

Jonathan Fonseca Fogo

RESUMO

A garantia de volume de aves comerciais para o abate e produção de ovos depende principalmente de matrizes. Partindo dessa realidade, as matrizes são exploradas ao máximo em seus recursos reprodutivos, sendo a fertilidade dos machos, de fundamental importância na produção de ovos férteis. Na avicultura, geralmente a avaliação do sêmen dos galos é feita por amostragem e os parâmetros avaliados são em menor número que em mamíferos, sendo que a compactação da cromatina dos espermatozoides de galo geralmente não é avaliada, apesar de ser conhecido que em mamífero alterações na cromatina espermática podem levar à morte embrionária. Assim, objetivou-se com o presente trabalho verificar a relação da taxa de eclosão de lotes de aves da linhagem Ross com a taxa de alterações da cromatina espermática identificadas por análise computacional de esfregaços de sêmen de galo corados com azul de toluidina, pH 4,0. Para isso foram avaliadas amostras de sêmen de cinco lotes de matrizes de linhagem pesada Ross, quanto à compactação da cromatina, área e comprimento da cabeça espermática. Essas variáveis foram correlacionadas entre si e com a taxa de eclosão de cada lote. Não foram observadas diferenças entre os lotes em todas as variáveis analisadas e observou-se correlação significativa apenas entre área e comprimento da cabeça espermática. Durante as análises de imagem foi observado falhas no processo de segmentação das cabeças, o que provavelmente influenciou os resultados, tornando a falta de correlação entre a eclosão e alterações cromatínicas pouco confiáveis.

Palavras-chave: Fertilidade, Eclodibilidade

ABSTRACT

The guarantee of the volume of commercial birds for slaughter and egg production depends mainly on breeders. Based on this reality, the matrices are exploited to the maximum in their reproductive resources, with male fertility being of fundamental importance in producing fertile eggs. In poultry, the evaluation of rooster semen is generally done by sampling and the evaluated parameters are fewer than in mammals. The chromatin compaction of rooster spermatozoa is generally not evaluated, although it is known that Sperm chromatin alterations in mammals can lead to embryonic death. Thus, this study aimed to verify the relationship between the hatching rate of Ross lineage flocks and the rate of changes in sperm chromatin identified by computational analysis of rooster semen smears stained with toluidine blue, ph 4,0. For this purpose, semen samples from five flocks of breeder hen, line Ross were evaluated for chromatin compaction, sperm head area and length. These variables were correlated with each other and with the hatching rate of each batch. We didn't find any difference between flocks in all analyzed variables. However, there was a significant correlation between area and length. During the image analyses, failures were observed in the segmentation process of the head. This probably influenced the results, making the lack of correlation, between hatching and unexpected chromatin alterations, unreliable.

Keywords: Fertility, Hatchability

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6 – 8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8 – 11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11- 14
4 RESULTADOS	14 -16
5 DISCUSÃO	16 -17
6 CONCLUSÃO	18
7 REFERENCIAS	18 -21

1. INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil segue em primeiro lugar como maior exportador de carne de frango do mundo, gerando milhões de empregos (ABPA, 2021) e tendo significativa relevância no produto interno bruto brasileiro, 1,5% (MAPA, 2014). Essa posição se deve ao fato de se destacar em um mercado competitivo em genética, sanidade, nutrição e aporte técnico. Além disso, o mercado brasileiro possui um setor agroindustrial forte, com oferta de produtos, como grãos produtos farmacêuticos e de suplementação nutricional de qualidade e bons preços que possibilitam a produção barata e em escala (DE ZEN, et al., 2019). Ademais, por ser um país populoso e com razoável renda per capita, grandes multinacionais migraram para o Brasil, ao longo dos anos, a fim de suprir a demanda de serviços e produtos que o mercado brasileiro necessitava com melhores condições ao produtor. Exemplos disso são medicações, vacinas, equipamentos, mão de obra qualificada e tecnologias e, no caso da avicultura industrial, genética de qualidade (DE ZEN, et al., 2019; AVILA, 2020;).

Um dos principais fatores que contribuem para produção em escala e extremamente dinâmica de carne e ovos é sem dúvida o melhoramento genético importado, principalmente, do mercado estadunidense e europeu. Isso porque, apesar do grande destaque em produção, o Brasil não possui, ainda, genética própria competitiva como o mercado estrangeiro. (AVILA, 2020). Além disso, outro ponto de suma importância para avicultura industrial é a excelência dos índices zootécnicos e parâmetros tecnológicos em ambiência, manejo, sanidade e nutrição (MARTINI, et al 2019).

O melhoramento genético das aves industriais é o mais avançado de todos os sistemas de produção animal, por apresentarem fisiologia reprodutiva, desenvolvimento embrionário e crescimento extremamente curtos. Hoje a cadeia produtiva conta, antes de chegar à genética para produção em escala, com matrizes, avós, bisavós e linhagens pedigrees. Por meio de cruzamentos direcionados, obtêm-se o frango de corte ou poedeiras comerciais (DE SOUZA, 2006).

Apesar das conquistas nos resultados zootécnicos, ainda existem gargalos no desempenho reprodutivo, relacionados principalmente à influência do ambiente e da alimentação na gametogênese, em especial, na espermatogênese. Devido à queda da fertilidade do lote observada com o passar do tempo, a reposição de parte dos machos é um recurso

utilizado para melhorar a fertilização. Por isso, a avaliação da fertilidade dos machos é de grande importância, assim como a busca por métodos mais precisos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

O espermograma é um dos principais métodos de avaliação da fertilidade em mamíferos. Contudo, algumas alterações do sêmen como a compactação da cromatina dos espermatozoides, não são identificadas nessa rotina, podendo interferir significativamente na fertilidade de reprodutores. Na avicultura, geralmente a avaliação de reprodutores é feita por amostragem e os parâmetros avaliados são em menor número que em mamíferos, sendo que a compactação da cromatina dos espermatozoides de galo é pouco explorada (SOARES; BELETTI, 2006a).

Cromatina é encontrada no núcleo de todas as células eucarióticas e é formada pelo DNA e proteínas a ele ligadas. Na célula somática a cromatina é formada basicamente pelos nucleossomas constituído por um octâmero de histonas canônicas (2 H2A, 2 H2B, 2 H3 e 2 H4) envolvido por duas voltas de DNA e proteínas dos processos de replicação e reparo do DNA e da ativação e repressão da atividade gênica. Esses nucleossomas se organizam formando um solenoide estabilizados pela histona H1 (ALBERTS et al., 2017). Durante a espermiogênese de mamíferos e aves as histonas são substituídas por protaminas, proteínas filamentosas básica altamente ricas em arginina e que se encaixam no sulco menor do DNA. Isso permite que ocorra uma alta compactação da cromatina espermática, que possibilita a diminuição do volume e a alteração da forma da cabeça do espermatozoide, fazendo com que este fique com a hidrodinâmica ideal para sua movimentação. Assim, as alterações da compactação da cromatina podem levar a mudanças da hidrodinâmica do espermatozoide, com consequente alteração de sua motilidade, o tornando inviável. Além disso, a alta compactação da cromatina espermática é capaz de proteger o DNA de forma extremamente eficiente, impedindo que este sofra danos durante o trajeto percorrido até o ovócito. Alterações na compactação da cromatina geralmente são acompanhadas por lesões no DNA nas mais diversas intensidades. Alterações cromatínicas podem não somente interferir no processo de fecundação, como principalmente no desenvolvimento embrionário devido às alterações no DNA, o que reforça a necessidade da análise da cromatina na avaliação de reprodutores machos (BELETTI, 2013).

Com este trabalho objetivou-se verificar a relação da taxa de eclosão de lotes de aves da linhagem Ross com a taxa de alterações da cromatina espermática identificadas por análise computacional de esfregaços de sêmen de galo corados com azul de toluidina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura industrial

Para entender como a avicultura industrial se consolidou de forma tão assertiva no ramo de proteína animal é necessário citar de onde vieram animais com tamanha aptidão para produção. Estudos arqueológicos indicam que a domesticação das galinhas tem evidências antes de 6000 AC no sudeste da Ásia e posteriormente foram introduzidas na China, Japão e Coreia. Apenas em 2000AC ocorreu a domesticação na Índia. Já na Europa, a difusão desses animais foi datada pela primeira vez na idade do bronze, cerca de 1600 AC (WEST et al, 1988).

Com o avanço da ciência e tecnologia, no final do século XIX Mendel propôs as leis de conservação genética e com isso, teve-se a origem do melhoramento genético usado no setor agropecuário. Raças de galinhas criadas com cruzamento direcionado para aptidão reprodutiva e produtiva. Em 1940, com insinuação da segunda guerra e a demanda por proteína animal, os programas de melhoramento genético tiveram fomento dos governos para aumentar a produção de proteína animal (PINAZZA, LAVANDOS, 2000; CAMPO, 2009).

No contexto da evolução dos estudos em genética, iniciou-se os programas de melhoramento genético utilizando como metodologia cruzamentos direcionados, que ainda hoje estão consolidados no setor avícola. Este processo está estruturado no modelo de pirâmide invertida, o qual a base estão as reprodutoras com linhagem pura, para produção de ovos da linhagem subsequente, bisavós, estas por sua vez produzem os ovos que se tornaram avós e essas produzem os ovos que geraram os pintinhos matrizes que produzirão ou o frango de corte ou as poedeiras comerciais (MOURA, 2017).

2.2 Reprodução das aves

As aves, diferente dos mamíferos, possuem o desenvolvimento embrionário fora do útero materno, esse fato possibilitou o crescimento embrionário, dentro de ovos, tendo sua própria reserva energética que utilizará antes e depois de seu nascimento. Por isso, o sistema reprodutor feminino é munido de grande quantidade de glândulas especializadas para produção dos componentes necessários ao desenvolvimento embrionário (FONTENELE; DOMINGUES

2012). Ademais a maioria dos machos não possui estrutura penetrante e seus pares de testículos se encontram dentro da cavidade celomática. Os testículos são volumosos e tem alta capacidade de concentrar espermatozoides, aproximadamente 3,5 milhões/ mm³ embora com baixo volume no ejaculado, 0,5 a 1ml a baixa quantidade de ejaculado se deve ao fato de não possuírem glândulas anexas como a próstata, bulbo uretral e vesiculares (WILLIAM 2006; MORAIS, 2004).

As aves possuem o ciclo reprodutivo sob influência de foto período, positivo, ou seja, na natureza, o estímulo reprodutivo é sazonal (FONTENELE; DOMINGUES, 2012). O espermatozoide do galo é maior que dos mamíferos, medindo aproximadamente 100 µm e possuem cabeça longa e filamentosa (WILLIAM, 2006). Grigg (1949), caracterizando o núcleo dos espermatozoides de galos aferiu 14 micrometros de comprimento, já Villaverde (2016), 13,5 ±3,5.

Como citado por MOURA (2017), a estrutura estratificada dos estabelecimentos avícolas reprodutores, com forma de pirâmide invertida, confere grande número do produto final, frango ou poedeiras comerciais, no final da cadeia produtiva sendo que em todas as ramificações da cadeia os cruzamentos, por monta natural, são direcionados para se obter o máximo de potencial de cada linhagem genética.

2.3 Espermatogênese e Caracterização Espermática

A produção de espermatozoide nos testículos dos galos, similarmente aos mamíferos, tem origem das espermatogonias as quais, em sequência, passam pelas fases de: espermatocitogênese, espermatidogênese e espermiogênese (DEVICHE, 2011). Sabendo disso, na espermatocitogênese as espermatogonias sofrem processo de mitose para dar origem a duas novas células, uma nova célula germinativa e uma espermatogonia intermediária, a espermatogonia intermediária se divide novamente e formam a espermatogonia tipo b que por sua vez geram, cada uma, dois espermatócitos primários, e esses fazem uma divisão meiótica e geram dois espermatócitos secundários e que em sequência se dividem em duas espermátides (ABDUL-RAHMAN, 2016); (THURSTON, 2000).

O fato de muitas espécies de aves serem poligâmicas, inclusive o *Gallus gallus Domesticus*, influencia, por seleção natural a competição espermática a ter uma alta qualidade.

Sendo assim, células com natação mais rápida e tamanho adequado tendem a fertilização, enquanto gametas muito grandes ou com problemas na motilidade tendem a não prosseguir na seleção pós-copulatória. Ademais, no ejaculado dos galos pode ser encontrado espermatozoides de tamanhos e formas variadas. O pleomorfismo é fato que se correlaciona com potencial de fertilização, podendo ser devido a células em diferentes fases de maturação: espermatócitos 1 e 2 ou espermátides (VILLAVERDE et. al. 2016)

2.4 Avaliação Reprodutiva e da Cromatina

Na avicultura industrial, mesmo com os avanços históricos no setor, ainda há dificuldade na interpretação da relação da gametogênese com os fatores extrínsecos da produção. Nos lotes de reprodutoras é observado, com o passar do tempo, grande queda de fertilidade, fato que obriga a indústria fazer reposição de parte dos machos ou até o abate do lote. Sendo assim, análise da fertilidade dos machos com métodos precisos e replicáveis tem grande demanda (RODRIGUES; BELETTI, 2009); (MORENO et. al. 2016).

Em concordância, com mamíferos reprodutores o espermograma é bastante utilizado para análise do sêmem. Entretanto a avaliação da compactação da cromatina não é possível nesse método, deixando assim, lacunas na observação real da fertilidade. Na indústria avícola a avaliação dos reprodutores, pelo grande número, é feita por sistema de amostragem e os parâmetros avaliados são menos explorados. Por conseguinte, a avaliação dos espermatozoides de galos pelo método de análise da compactação da cromatina ainda é pouco abordada (OLIVEIRA et al., 2023).

A cromatina dos espermatozoides é altamente organizada e carrega o genoma masculino, influenciando totalmente a fertilidade e o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, a avaliação, precisa, dessa estrutura é extremamente necessária para mensurar a interferência paterna no desempenho reprodutivo dos lotes avícolas e a taxa de eclodibilidade no incubatório (BELETTI, 2013). Quando é dito que a avaliação da cromatina é extremamente importante, deve-se pensar que alterações nesta estrutura podem ser quebras das fitas de DNA, defeito no condensamento desse material, modificações das bases nitrogenadas entre outros e isso pode causar, direta ou indiretamente, infertilidade ou morte embrionária (ESTEVES *et al.*, 2020).

2.5 Azul de toluidina e Análise de imagem computacional

Por serem feitos de forma visual e individual, muitas análises de qualidade espermática podem ser subjetivas e sem repetibilidade. Com isso métodos alternativos foram criados afim de sanar diferenças nas interpretações das avaliações de esfregaços de espermatozoides, como por exemplo o método de análise computacional de espermatozoides corados com azul de toluidina (RODRIGUES; ROCHA BELETTI; 2009). O azul de toluidina em ph 4,0 tem capacidade de se ligar nos radicais fosfato no DNA onde estão quase que exclusivamente. Esse corante catiônico se liga na cromatina e é possível distinguir essa em compactada ou não com o corante verde a azul claro ou então azul escuro a magenta respectivamente. Por ser um corante originalmente azul e por apresentar diferentes colorações, quando ligado a estruturas celulares ele é denominado um corante metacromático (SOARES; BELETTI, 2006; Mello, 1982).

O método de análise computacional desenvolvida por Rodrigues; Rocha e Beletti (2009) permite fazer, a partir de fotomicrografias, a comparação das cabeças dos espermatozoides padrões, corados com azul de toluidina, que estão em alto grau de compactação e homogeneidade, com as demais cabeças analisadas. Posteriormente, obtém-se a diferença do valor médio em pixels das cabeças padrões e as demais analisadas e verifica-se o quão as cabeças em análise se aproximam, em porcentagem, das cabeças padrão e tem-se o valor da descompactação para cada cabeça. O método também permite fazer análise do coeficiente de variação dos valores de pixels e mede, além de quantificar, o quão a cromatina esta heterogênea.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e obtenção das amostras

O experimento foi conduzido utilizando-se amostras de sêmen de galos doadas (parecer 71/2022/CEUA/PROPP/REITO) por um matrizeiro de corte da linhagem Ross, do município de Uberlândia. Foram utilizadas amostras oriundas de cinco lotes, sendo dois em início de produção (26 e 27) semanas de idade e três em final de produção (56 semanas de idade).

Foram doadas 10 amostras de sêmen de cada lote, totalizando 50 amostras, as quais foram processadas e avaliadas no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, em Uberlândia, MG. As coletas de sêmen já eram realizadas rotineiramente dentro do manejo da granja.

3.2 Coleta do Sêmen

Na granja a coleta do sêmen foi feita utilizando o método desenvolvido por BURROWS e QUINN (1937), o qual consiste na manipulação do galo, posicionando-o paralelamente ao tronco de quem faz o procedimento, de forma que a mão esquerda do profissional, destro, massageie o abdômen, com as pernas do animal viradas para a frente do manipulador e a cabeça para trás; já a mão direita desliza firmemente no sentido crânio caudal estimulando assim as penas das costas e da calda. A massagem feita corretamente causa uma tumescência, o falo se enche de linfa, sendo possível após a visualização pressioná-lo delicadamente, causando assim, a ejaculação.

3.3. Processamento das Amostras

As amostras de sêmen foram repassadas aos pesquisadores imediatamente após a coleta e uma gota de sêmen foi colocada em microtubos contendo 2 mL de formol salina (CBRA, 2013). As amostras de cada lote foram misturadas em dois “pools” formados por cinco amostras cada.

Os dados de eclosão de cada lote referentes à semana da coleta de sêmen foram repassados pelo incubatório da empresa, onde essa variável é rotineiramente calculada.

3.3.1. Confecção das Lâminas e Registro Fotográfico

Para confecção das lâminas foi posto uma gota da amostra de sêmen em lâmina polida e realizado esfregaço de cada “pool”. Após secagem, os esfregaços foram corados com três gotas de azul de toluidina 0,025% (Sigma-Aldrich, CI52040), pH 4,0, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) e cobertos por lamínula. Após três minutos, o excesso de corante

foi retirado e assim, usando microscópio Olympus BX51 com uma câmera Olympus DP70 ligada a um computador PC com software de captura DP Controller, com objetiva de 100x e optovar 2X, foram capturadas cerca de 100 imagens digitais. As imagens digitais foram coletadas aleatoriamente percorrendo toda a lâmina e posteriormente utilizadas para análise de imagem computacional.

3.3.2. Avaliação computacional de esfregaços corados com azul de toluidina

A partir das fotomicrografias as cabeças dos espermatozoides foram segmentadas por limiarização (“thresholding”) utilizando um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Matilab e executado no software Octave (BACKES; TRAVENCOLO; ESCARPINATI, 2016). Após a segmentação das cabeças, foi realizada avaliação visual na qual foram eliminadas as que continham defeitos como erro de segmentação, imagens cortadas, fora de foco ou com artefatos advindos do corante. Cerca de 200 imagens foram selecionadas por lâmina e em seguida foram analisadas por rotinas desenvolvidas em ambiente de programação SCILAB. Foram obtidos a área da cabeça em μm^2 , comprimento em μm e densidade óptica integrada (DOI) (OLIVEIRA 2023).

A DOI foi obtida com a multiplicação da área pela densidade óptica da cabeça (DO). Já a DO foi obtida a partir do logaritmo de base 10 da relação da luz incidente e da transmitida, ou seja, da absorbância (BOSCHI, 2019)

Como a cabeça do espermatozoide pode não ter forma linear, o comprimento da cabeça foi obtido pelo método de esqueletização da imagem. (OLIVEIRA, 2023)

3.4. Avaliação estatística

Para a escolha do teste estatístico a ser utilizado, inicialmente foi verificada a distribuição dos dados utilizando-se o teste Komogorov-Smirnov. Como foi identificado que a distribuição dos dados era “normal” foi utilizado o teste de “Anova Oneway” com teste t não pareado como “post-test” para detectar diferenças entre os lotes. Para a correlação, foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Assim, foi possível verificar a existência e a intensidade de correlação de cada variável do sêmen analisada com a eclodibilidade. Foram consideradas

significativas as correlações com $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.1.

4. RESULTADOS

A tabela 1 mostra a média e o desvio padrão das características (densidade e dimensões) da cabeça dos espermatozoides avaliadas em cada lote. Não foi identificada diferença entre os lotes para nenhuma das características avaliadas.

TABELA 1. Média e desvio padrão das características (densidade e dimensões) da cabeça dos espermatozoides obtidas em cada lote de aves

	DOI	ÁREA (μm)	COMPRIMENTO (μm)
LOTE 2	3,26 \pm 0,37	10,79 \pm 1,23	10,41 \pm 0,37
LOTE 3	3,30 \pm 0,01	11,79 \pm 0,02	11,47 \pm 0,07
LOTE 4	3,44 \pm 0,43	11,32 \pm 0,86	10,47 \pm 0,48
LOTE 5	3,30 \pm 0,10	10,97 \pm 0,13	10,66 \pm 0,05
LOTE 6	3,43 \pm 0,59	11,79 \pm 1,53	11,31 \pm 0,63

A tabela 2 mostra os coeficientes de correlação entre as características da cabeça dos espermatozoides e a taxa de eclosão de cada lote.

TABELA 2. Coeficientes de correlação entre as características da cabeça dos espermatozoides e a taxa de eclosão de cada lote

	Eclosão	DOI	Área	Comprimento
Eclosão	1,00			
DOI	0,78	1,00		
Área	0,11	0,51	1,00	
Comprimento	-0,21	0,11	0,89*	1,00

* Coeficiente de correlação significativa

A eclosão não teve correlação significativa com nenhuma das características da cabeça do espermatozoide, o que significa, a princípio, que essas características não interferem na eclodibilidade dos ovos. A única correlação significativa foi entre área e comprimento da cabeça.

A figura 1 mostra duas cabeças de espermatozoides de galo segmentadas automaticamente. Observa-se que na letra A a existência de pregas na superfície que aparentemente não fazem parte da cabeça, pois são mais claras. Já na letra B a segmentação aparentemente está perfeita.

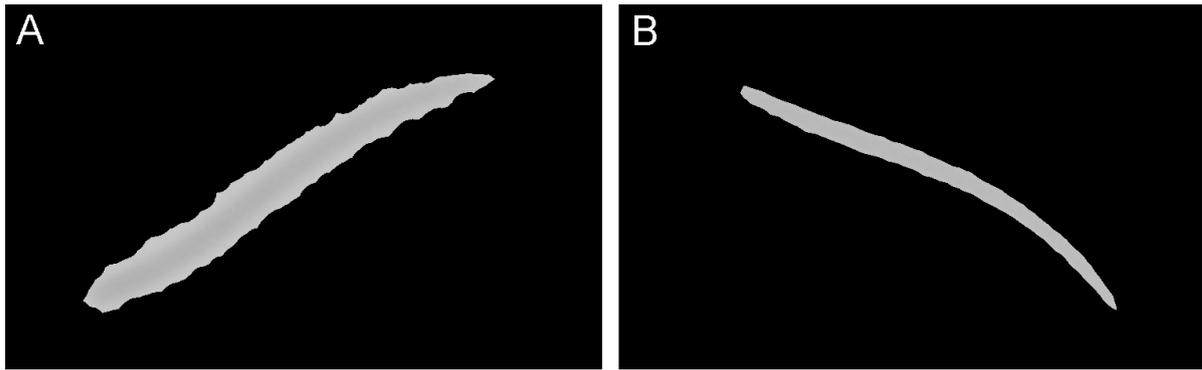


Figura 1: Cabeças de espermatozoides de galo segmentadas automaticamente de fotomicrografias de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina pH 4,0. Fonte: autoria própria

5. DISCUSSÃO

Os valores das características morfométricas da cabeça do espermatozoide (área e comprimento) foram próximas ao encontrado na literatura (GRIGG, 1949; SANTIAGO-MORENO et al., 2016; ANDRASZEK; BANASZEWSKA; BIESIADA-DRZAZGA, 2018), o que a princípio demonstraria que o método utilizado é eficiente para avaliação destas variáveis.

O uso da DOI para avaliação da cromatina, foi proposto pela primeira e única vez por Oliveira (2022). No presente trabalho foi utilizada a DOI pela área em μm^2 , diferentemente de Oliveira (2022), que utilizou a DOI por pixel. Isso não permitiu verificar se os resultados eram compatíveis ou semelhantes.

O teste de correlação de Pearson demonstrou que a correlação entre área e comprimento foi significativa. Isso era esperado, já que a cabeça do espermatozoide de galo é longa e delgada, com espessura geralmente constante e de aproximadamente $1 \mu\text{m}$.

Já em relação a taxa de eclosão, não foi observada correlação significativa com qualquer das características da cabeça dos espermatozoides avaliadas. Isso foi surpreendente, visto que diversos trabalhos demonstraram correlação entre alterações cromatínicas e problemas de fertilidade em aves (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009; PARTYKA; NIZANSKI; ŁUKASZEWICZ, 2010; PARTYKA; ŁUKASZEWICZ; NIZANSKI, 2011; SHANMUGAM et al., 2014; JOHNSTON et al., 2020) e mamíferos (LUCIO et al., 2016; SOUZA et al., 2018; LOLOI et al., 2022). Considerando que frequentemente alterações na cromatina são acompanhadas de alterações morfométricas da cabeça espermática (BELETTI; MELLO, 2004),

a inexistência de correlação da eclosão com ambos os tipos de características seria coerente. No entanto, apesar do coeficiente de correlação entre DOI e eclosão não ser significativo, o valor numérico de 0,78 ($P=0,12$) é considerado alto, e por ser positivo, significaria que quanto maior a DOI, maior seria a eclosão. Isso contradiz totalmente o que é encontrado na literatura. Já a correlação de comprimento da cabeça com a eclosão foi negativa, como era esperado, porém não significativa.. Pode-se especular que a inexistência de diferença das características nucleares entre os lotes tenha influenciado o resultado do teste de correlação. É importante salientar, que a fertilidade do lote pode ser influenciada por diversas outras variáveis, tais como, variáveis de manejo, doenças que podem interferir na fertilidade, questões físicas como por exemplo o galo deixar de cobrir porque não comeu ou ainda por desconforto pela qualidade da cama. Também pode ser que a maneira como foi executado o método utilizado para calcular a DOI, tenha gerado distorções que podem ter diminuído sua acurácia.

Uma rápida observação das cabeças segmentadas, corrobora com a possibilidade de erro metodológico, pois foi possível observar que muitas cabeças ficaram com a superfície pregueada (figura 1A) e outras não (figura 1B). O conteúdo das pregas parece ser mais claro que a parte central e isso certamente interferiu na DOI e provavelmente, em menor intensidade, na área. Outro fator que pode ter influenciado o resultado da correlação é a pequena diferença na eclodibilidade entre os lotes.

O presente estudo não apontou correlação do DOI, área e comprimento da cabeça espermática com a taxa de nascimento de pintinhos, contudo, o método de análise computacional de imagens de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina já se mostrou eficiente em outros trabalhos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009, OLIVEIRA, 2022).

Portanto, deve-se dar muita importância em alguns detalhes na execução deste método, tais como: a perfeita vedação da lamínula, pois rapidamente ocorre a evaporação da água concentrando a solução corante, interferindo na cor dos espermatozoides; esperar exatamente três minutos antes de retirar o excesso de corante; somente vedar a lamínula depois de certificar que a quantidade de corante está homogênea por toda a lâmina; padronizar a regulagem do microscópio e da câmera para todas as capturas; e verificar visualmente se a segmentação está sendo realizada de forma correta e caso contrário, ajustar os parâmetros do programa para corrigir a segmentação. Sem tais cuidados, a acurácia do método pode ser prejudicada.

Para melhorar futuros trabalhos com objetivos semelhantes, sugere-se utilizar também lotes com galos em pico de produção, o que ampliaria a diferença de eclodibilidade e provavelmente geraria melhores resultados quanto a correlação.

6. CONCLUSÃO

Nas condições testadas não há correlação entre alterações na cromatina espermática de galos e eclosão do lote. Independente da taxa de eclosão, existe correlação positiva entre tamanho e comprimento da cabeça do espermatozoide. Outros trabalhos devem ser realizados com maior número de aves e menor influência das variáveis da granja para novas avaliações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RAHMAN, I. I.; OBESE, F. Y.; ROBINSON, J. E. Spermatogenesis and cellular associations in the seminiferous epithelium of Guinea cock (*Numida meleagris*). **Canadian Journal of Animal Science**, v. 97, n. 2, p. 241-249, 2016.

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual da Associação Brasileira de Proteína Animal**, 2021.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T.; ANDRADE, A.E.B.; BIZARRO, C.V.; RENARD, G. **Biologia Molecular da Célula**. 6.ed., Artmed: Porto Alegre, 2017, 1464 p.

AVILA, A. M. S. A relação entre tecnologia e instituições em cadeias de valor do agronegócio. **Tese de doutorado, Universidade do Rio Grande do Sul**, 2020.

BACKES, A. R.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; ESCARPINATI, M. C., A derivative based algorithm for image thresholding. **Proceedings of XII Workshop de Visão Computacional**, p 189-194, 2016.

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 of Morphological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.

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

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

BOSCHI, F.; RIZZATTI, V.; ZOICO, E.; MONTANARI, T.; ZAMBONI, M.; SBARBATI, A.; COLITTI, M. Relationship between lipid droplets size and integrated optical density. **European Journal of Histochemistry EJH**, v. 63, n. 1, 2019.

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.

CAMPO, J. L. Evolución de la genética avícola. **Selecciones avícolas**, v. 19, p 15-19, 2009.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação seminal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

DEVICHE, P.; HURLEY, L. L.; FOKIDIS, H. B. Avian testicular structure, function, and regulation. In: **Hormones and Reproduction of Vertebrates**. Academic Press,. p. 27-70, 2011.

DE SOUZA. A. J. M., MARTINELLI, O., DEWES, H. Dinâmica inovativa no agronegócio: a inovação tecnológica na avicultura industrial por meio da análise de patentes. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 23, n. 2/3, p. 207-233, 2006.

DE ZEN, S., IGUMA, M. D., ORTELAN, C. B., SANTOS, V. H. S., FELLI, C. B. Evolução da avicultura no Brasil. **CEPEA Centro de Estudos Avançados em Economia** 1ed (1), 2019.

FONTENELE, N.; DOMINGUES, J. Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 165-176, 2012.

GRIGG, G. W.; HODGE, A. J. Electron microscopic studies of spermatozoa I. The morphology of the spermatozoon of the common domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 271-286, 1949.

JOHNSTON, S. D.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; PAPPIN, E.; HAMPE, A.; DONELEY, R.; LIERZ, M.; GOSÁLVEZ, J. Assessment of avian sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin dispersion assay. **Reproduction, fertility and development**, v. 32, n. 10, p. 948-952, 2020

LOLOI, J.; PETRELLA, F.; KRESCH, E.; IBRAHIM, E.; ZINI, A.; RAMASAMY, R. The effect of sperm DNA fragmentation on male fertility and strategies for improvement: A narrative review. **Urology**, v. 168, p. 3-9, 2022.

LUCIO, A. C.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; MARTINS, M. C.; BRAGA, L. S.; MIGLIO, L.; ALVES, B. G.; SILVA, T. H.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Selected sperm traits

are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 924-933, 2016

MARTINI, YASMIN MARTINELLI; DE FREITAS, EDMILSON SANTOS. Comparação De Índices Zootécnicos De Matrizes De Corte Alojadas Em Diferentes Densidades De Acordo Com A Idade Reprodutiva. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 2, n. 2, p. 144-153, 2019.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387-392, 1982.

Ministério da Agropecuária, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Panorama da Avicultura Nacional e Perspectivas para o Setor**. Brasília, p76, 2014.

MORAES, I. A. Reprodução das Aves. 2004. Disponível em. Disponível em: <http://fisiovet.uff.br/wp-content/uploads/sites/397/delightful-downloads/2018/07/Reprodu%C3%A7%C3%A3o-nas-aves-dom%C3%A9sticas.pdf> Acesso em: 17 jan. 2023.

MOURA, G. G. C.; NETO, L. F.; SANTANA, A. P. L. Melhoramento genético em aves de corte. **Conexão Eletrônica**, v. 14, n. 1, p. 363-369, 2017.

OLIVEIRA, L.B.T.; BUTOLO, J.E.G.; BUTOLO, E.A.F.; REIS, R.S.; TRAVENÇOLO, B.A.N.; BELETTI, M.E. A suplementação de L-arginina minimiza as alterações induzidas pelo envelhecimento na cromatina do esperma de galos. **Ciência Avícola**, v. 8, pág. 102, 2023.

PARTYKA, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; NIŻAŃSKI, W. Flow cytometric assessment of fresh and frozen-thawed Canada goose (*Branta canadensis*) semen. **Theriogenology**, v. 76, n. 5, p. 843-850, 2011.

PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; ŁUKASZEWICZ, E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1019-1027, 2010.

PINAZZA, L. A.; LAUANDOS, I. P. A revolução das aves. **AgroANALYSIS**, v. 20, n. 8, p. 18-20, 2000.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v 61, n 4, p 1302-1307, 2009.

SHANMUGAM, M.; VINOTH, A.; RAJARAVINDRA, K. S.; RAJKUMAR, U. Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. **Animal reproduction science**, v. 145, n. 1-2, p. 81-85, 2014.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, C.M.; VILLAVERDE-MORCILLO, S.; TOLEDANO-DIAZ, A.; CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GOYA, A. L.; MARTÍNEZ, J. G. . Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 882, 2016

SOUZA, E. T.; SILVA, C. V.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; ALVES, B. G.; BELETTI, M. E. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reproductive biology**, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2018.

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

THURSTON, R. J.; KORN, N. Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. **Poultry Science**, v. 79, n. 11, p. 1650-1668, 2000.

VILLAVERDE-MORCILLO, S. **Collection, Storage and Morphometry of Avian Sperm: Use for Sperm Characterization and Cryopreservation in Wild Species**. Tese de Doutorado. Faculty of Veterinary Medicine. Spain: Universidad Complutense de Madrid 2016.

WEST, B.; ZHOU, B.X. Did chickens go north? New evidence for domestication. **Journal of archaeological science**, v. 15, n. 5, p. 515-533, 1988.

WILLIAM, O. R. **Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 691-701, 2006.