

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA CROMATINA DE
ESPERMATOZÓIDES DE GALO (*Gallus gallus*) E
DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE
ARMAZENAMENTO DOS ESPERMATOZÓIDES
NAS ESPERMATECAS DE GALINHAS**

Ana Carolina Nunes Rodrigues
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Setembro/2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE COMPUTACIONAL DA CROMATINA DE
ESPERMATOZÓIDES DE GALO (*Gallus gallus*) E
DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE
ARMAZENAMENTO DOS ESPERMATOZÓIDES
NAS ESPERMATECAS DE GALINHAS**

Ana Carolina Nunes Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária – UFU como
parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Veterinárias (Clínica e
Cirurgia)

Uberlândia – Minas Gerais – Brasil
Setembro/2007

*“É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela”
Friedrich Nietzsche*

Dedico este trabalho ao meu querido esposo Cleber, pelo grande apoio, pela paciência e pela força nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Tânia e Cláudio pelo grande apoio em todas as fases deste trabalho.

Ao meu irmão, Cláudio Júnior por sempre mostrar a alegria que é viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Marcelo Beletti por ter me aceito prontamente como aluna – orientada, pela paciência e ensinamentos ao longo desses dois anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Lício Velloso, diretor do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Uberaba pelo apoio durante o curso do Mestrado.

À diretoria da Granja Planalto por ceder gentilmente as aves utilizadas neste experimento.

À diretoria do Hospital Veterinário de Uberaba – Sr. Roberto Jerônimo e Dr. José Olavo Borges Mendes Junior – pelo local de alojamento dos animais durante a fase experimental.

Ao técnico do Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos da Universidade de Uberaba Itamar Dorneles Júnior pela dedicação e ajuda durante a fase experimental.

Aos alunos da graduação em Medicina Veterinária Talles Franco Moura e Lucas Vilela Perroni pela dedicação e ajuda durante a fase experimental.

Aos técnicos dos laboratórios de micromorfologia da Universidade Federal de Uberlândia, Richard e Hélió.

Aos colegas Marcelo Sousa Stacciarini e Juliana Ítalo pelos momentos de descontração tão importantes durante este percurso.

À Prof. Joana D’Arc Arantes pela prestatividade na tradução para inglês.

À FAPEMIG e CNPq pelo aporte financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
3. MATERIAL E MÉTODO	24
3.1. Variações metodológicas para coloração com azul de toluidina.....	24
3.2. Análise na compactação da cromatina dos espermatozóides após o armazenamento na espermateca das galinhas	26
3.3. Análise das características da espermateca e quantificação dos espermatozóides na região dos túbulos de armazenamento.....	27
3.4. Coleta e análise do sêmen de galos para comparação com os espermatozóides durante o armazenamento.....	29
3.5. Eclosão dos ovos gerados pelas galinhas durante o experimento.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	31
4.1. Variações metodológicas para coloração com azul de toluidina.....	31
4.2. Análise computacional da cromatina dos espermatozóides.....	33
4.3. Alterações na compactação da cromatina dos espermatozóides após o armazenamento nas espermatecas das galinhas	34
4.4. Período de armazenamento e quantificação dos espermatozóides na espermateca	36
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Distribuição dos lotes de galinhas utilizadas no experimento..	27
TABELA 2: Número de aves sacrificadas em cada dia de coleta	28
TABELA 3: Média das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozóides dos galos jovens e velhos	33
TABELA 4: Coeficiente de correlação entre as variáveis avaliadas na análise computacional da cromatina dos espermatozóides dos galos	33
TABELA 5: Médias $\pm$ desvio padrão do número de espermatozóides por dia de coleta	39
TABELA 6: Médias $\pm$ desvio padrão do número de espermatozóides em cada fragmento da espermateca	39
TABELA 7: Médias das quantidades de espermatozóides por dia por fragmento da espermateca	40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Espermatozóides com cromatina mal compactada.....	32
FIGURA 2: Espermatozóides com cromatina mal compactada.....	32
FIGURA 3: Corte de espermateca corado com azul de toluidina	35
FIGURA 4: Epitélio da junção utero-vaginal com os túbulos de armazenamento de espermatozóides.....	36
FIGURA 5: Epitélio pseudoestratificado ciliado no interior do túbulo de armazenamento	37
FIGURA 6: Espermatozóides em toda a extensão do túbulo de armazenamento	38
FIGURA 7: Espermatozóides no interior e fora dos túbulos de armazenamento	38

ANÁLISE COMPUTACIONAL DA CROMATINA DE ESPERMATOZÓIDES DE GALO (*Gallus gallus*) E DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DOS ESPERMATOZÓIDES NAS ESPERMATECAS DE GALINHAS

RESUMO - Os objetivos desse trabalho foram testar novas variantes metodológicas utilizando coloração com azul de toluidina, até se estabelecer um protocolo confiável para a avaliação computacional da compactação da cromatina em espermatozóides de galo, buscar alterações na compactação da cromatina durante o armazenamento dos mesmos na espermateca de galinhas, observar a duração do período de armazenamento e estimar a variação na quantidade de espermatozóides armazenados nos segmentos cranial, médio e caudal da região da espermateca durante 23 dias. Para avaliação computacional da compactação da cromatina, foram utilizadas 20 amostras de sêmen de galo, sendo 10 amostras de galos com 35 semanas de idade (Galos Novos) e 10 amostras de galos com 60 semanas de idade (Galos Velhos). Para a análise dos espermatozóides durante o armazenamento nas espermatecas das galinhas, foram utilizadas 48 matrizes pesadas (44 fêmeas e 4 machos) da linhagem Cobb avian 48 com 36 semanas de idade. Foi coletado material da junção utero-vaginal das fêmeas por 23 dias após a cópula com os machos, sendo que a cada 4 dias, 6 fêmeas foram sacrificadas para confecção de lâminas histológicas da região da espermateca. Foram testados diferentes métodos de desnaturação e coloração com AT, sendo que o melhor foi a hidrólise com ácido clorídrico 1N por 10 minutos, coloração em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0, por 20 minutos, desidratação em álcool, diafanização em xilol e montagem com bálsamo do Canadá. Todas as amostras de sêmen foram submetidas a este protocolo e posteriormente avaliadas por análise de imagem computacional, onde foram mensuradas as cabeças dos espermatozóides quanto a área, comprimento, largura, perímetro, homogeneidade da compactação da cromatina dentro de cada cabeça e intensidade de compactação da cromatina. Os espermatozóides de galos velhos apresentaram mais alterações na cromatina do que os de galos jovens. Os galos jovens apresentaram cabeças de espermatozóides maiores do que

galos velhos. Não foi possível determinar as alterações na compactação da cromatina dos espermatozóides dos galos após o armazenamento na espermateca pelo método utilizado. Foram encontrados espermatozóides por toda a extensão das espermatecas, sendo que esses se concentravam no segmento médio da junção utero-vaginal. Não houve diferença estatística significativa na quantidade de espermatozóides presentes na espermateca no decorrer dos dias de experimento. Foram observadas grandes quantidades de células espermáticas até o 23º dia de coleta. Portanto, o período de armazenamento de espermatozóides em galinhas é de, no mínimo 23 dias.

Palavras – chave: Azul de toluidina, cromatina, espermateca, galo, túbulos de armazenamento de espermatozóides

**COMPUTACIONAL ANALYSIS OF THE CHROMATIN OF FOWL'S
SPERMATOOZOA (*Gallus gallus*) AND DETERMINATION OF THE STORAGE
TIME OF SPERMATOOZOA IN THE SPERM STORAGE TUBULES IN FOWL
HENS**

ABSTRACT - The objectives of this work were to evaluate new methodological variants using toluidina blue (AT), to establish a trustworthy protocol for the computational evaluation of the chromatin compaction of the fowl's spermatozoa, to find out alterations in the chromatin compactation during the storage in the sperm storage tubules of fowl hens, to observe the storage time and to estimate the variation in the amount of stored spermatozoa in the cranial, medium and caudal sections of the uterovaginal junction during 23 days. Twenty semen samples were used: 10 from fowls that were 35 weeks old and had high fertility (young fowls) and 10 from fowls that were 60 weeks and had low fertility (Old fowls). To the analysis of the spermatozoa during the storage in the sperm storage tubules of hens, 48 thirty-six- week-old meat chickens (44 hens and 4 fowls) of the Cobb Avian 48 strain were also used. A sample from the uterovaginal junction of the hens was collected for 23 days after the match with the fowls, 6 hens being sacrificed every four days to make histological microscope slides. Different methods of denaturation and staining were tested. The best method with AT was the hydrolysis with 1N HCl for 10 minutes, staining in bucket with 0.025% AT, pH 4,0, for 20 minutes, dehydration in alcohol, clearing in xylol and mounted with Canada balsam. All the semen samples were submitted to this protocol and later evaluated through computational image analysis. Area, length, width, perimeter and the chromatin compaction homogeneity of head spermatozoa were measured. The sperm of old fowls presented more chromatin changes than the ones of young fowls. The spermatozoa of the young fowls presented bigger heads than the ones of old fowls. It was not possible to determine the chromatin compaction alterations of the fowl sperm after their storage in the sperm storage tubules through the used method. Spermatozoa were found through out the area of the sperm storage tubules. Most of then gathered in the medium section of the uterovaginal junction. There was not meaningful statistical difference in the amount of sperm

in the sperm storage tubules over the days of the experiment. A greater amount of sperm cells were observed until the 23rd day of assessment. Therefore, the storage time of the spermatozoa in hens lasts at least 23 days.

Key words: chromatin condensation, fowl sperm, sperm storage tubules, toluidine blue, utero-vagina junction

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população e consequente aumento do mercado consumidor, mostraram a necessidade da intensificação na produção de proteína animal. Nesse contexto, a expansão da avicultura intensiva é uma realidade atual na produção animal. As aves comerciais para abate são originadas de matrizes de linhagem pesada (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) e a demanda produtiva requer um constante aperfeiçoamento da genética dessas aves, buscando principalmente a elevação do potencial reprodutivo. A exploração máxima dos recursos reprodutivos das matrizes ganhou extrema importância devido à essa realidade do mercado, sendo que a fertilidade dos machos é um dos principais fatores na produção de ovos férteis (SOARES; BELETTI, 2006a).

O pico de produção de ovos das matrizes geralmente ocorre entre a 30^a à 35^a semana de vida e essas aves são descartadas por volta da 58^a semana, podendo essa idade de abate ser prorrogada, de acordo com a necessidade do mercado. Com o passar do tempo, a produção e a fertilidade do lote diminuem consideravelmente (LEESON; SUMMERS, 1997). A reposição de parte dos machos do lote é um recurso utilizado para melhorar a fertilização. Devido a isso, a avaliação da fertilidade dos machos é de grande importância assim como a busca por métodos simples, precisos e de baixo custo.

As técnicas para diagnóstico de fertilidade em galos são pouco exploradas. Métodos clássicos utilizados para exames andrológicos em outras espécies e diretamente relacionados com o espermatozóide como motilidade, densidade, vitalidade e morfologia espermática, também são usados para a avaliação da fertilidade dos galos. Porém essas práticas de rotina não têm sido eficientes na identificação de alterações espermáticas que podem levar à subfertilidade, como alterações na cromatina dos espermatozóides (SOARES; BELETTI, 2006a).

Soares e Beletti (2006a) realizaram estudos preliminares em galos e apesar de não conseguirem desenvolver um protocolo de avaliação de cromatina confiável, verificaram alta correlação entre cromatina frouxa e baixa fertilidade. Contudo, foram encontradas altas taxas de espermatozóides com baixa compactação de cromatina

em sêmen de galos altamente férteis. Isto poderia ser explicado, por uma continuidade na compactação da cromatina dos espermatozóides durante seu armazenamento na espermateca das galinhas.

A existência de alterações cromatínicas nos espermatozóides durante o armazenamento nas espermatecas das galinhas ainda não foi estudada, sendo que observações dessas alterações serão de grande importância nos estudos da fisiologia e fertilidade das aves.

O objetivo desse trabalho foi testar novas variantes metodológicas utilizando coloração com azul de toluidina, até se estabelecer um protocolo confiável para a avaliação computacional da compactação da cromatina em espermatozóides de galo, buscando então alterações na compactação da cromatina durante o armazenamento dos mesmos na espermateca das galinhas, observar a duração do período de armazenamento e estimar a variação na quantidade de espermatozóides armazenados nos segmentos cranial, médio e caudal da região da espermateca durante o período estudado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A espermatogênese é o processo pelo qual as espermatogônias originam os espermatozóides. Ocorre nos túbulos seminíferos, responsáveis pela produção de gametas (AIRE, 2003).

Segundo Gilbert (1982), o tempo de formação dos espermatozóides nos testículos das aves varia de acordo com as espécies. Por volta da quinta semana após o nascimento das aves, ocorre a multiplicação das espermatogônias e os espermátócitos primários aparecem ao redor da sexta semana. Na décima semana, ocorre a multiplicação intensa dessas células e observa-se a presença de espermátócitos secundários nos tubulos. Após o surgimento das primeiras espermátides na vigésima semana, os testículos estão aptos a produzir espermatozóides para garantir a fertilização.

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 total 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. Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à formação de distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozóides que se torna frouxa, 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).

Existem evidências de que o processo de condensação de DNA pode ser incompleto, resultando em uma menor estabilidade nuclear e maior probabilidade de desnaturação do complexo DNA-proteína, o que tem sido associado com infertilidade em vários animais e no homem (EVENSON *et al.* 1980; BALLACHEY *et al.* 1987; DOBRINSKI; BARTH, 1993; BELETTI; MELLO, 1996; LOPES *et al.*, 1998, BELETTI *et al.*, 2004). 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 espermatozóides 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 espermatozóides com DNA danificado.

Em 1966, Gledhill verificou que alguns touros com distúrbios de fertilidade apresentavam parte de seus espermatozóides com maior intensidade na resposta à reação de Feulgen. Inicialmente a maior intensidade de coloração Feulgen positiva nas cabeças destes espermatozóides 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 espermatozóides 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 espermatozóides com cromatina mais frouxa, o que interfere na fertilidade do macho.

Mello (1982) desenvolveu um método para avaliação da cromatina com o uso do azul de toluidina (AT), um corante catiônico que exibe fenômeno metacromático, isto é, a alteração na cor é induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante. A ligação de moléculas do corante azul de toluidina (pH 4,0) aos grupos fosfatos ionizados do DNA é importante para avaliação de alterações na cromatina

espermática. Este pH de 4,0 garante que outros sítios (ânions) não sejam ionizados. Os espermatozóides normais se corariam em verde, mas aqueles com anomalias no complexo DNA-proteína se corariam em violeta. Isto ocorre porque em cromatina normal de espermatozóides, a maioria dos grupos fosfatos está bloqueada por protaminas, e conseqüentemente, poucas moléculas do corante se ligariam ao DNA, resultando em uma coloração de verde à azul claro. Já para aqueles espermatozóides com cromatina pouco compactada, haveria mais ligações com as moléculas do corante, resultando numa coloração de azul escuro a magenta. Porém, somente um alto grau de alteração cromatínica seria identificado por este método. A sensibilidade deste processo pode ser aumentada pela hidrólise antes da coloração, ou seja, de acordo com o seguinte protocolo: tratamento ácido (HCl 4 N a 25 °C, 15 a 20 min.) seguido de coloração com azul de toluidina (pH 4,0). Espermatozóides normais, que são caracterizados por cromatina altamente compactada, seriam pouco afetados pela hidrólise e conseqüentemente, corariam-se em azul claro. Por outro lado, cromatina espermática com baixo grau de alterações poderia ter as protaminas parcialmente extraídas, promovendo assim ligações das moléculas do corante com os grupos fosfatos do DNA. Deste modo, a sensibilidade do método para identificar anormalidades na cromatina espermática é aumentada.

Evenson e colaboradores (1980) criaram outro método que utiliza um processo de desnaturação ácida ou térmica dos espermatozóides e posterior coloração com alaranjado de acridina (AO). A avaliação é feita em citofotômetro de fluxo com ultravioleta (UV), onde espermatozóides com fluorescência verde são considerados com cromatina normal e fluorescência vermelha, com cromatina desnaturada. Teoricamente, os espermatozóides com fluorescência verde possuíam um complexo DNA-proteína estável o suficiente para suportar um rápido tratamento térmico sem se desnaturar. Já aqueles que apresentavam fluorescência vermelha, provavelmente possuiriam alterações no complexo DNA-proteína, tornando-o instável e permitindo a sua desnaturação pelo mesmo tratamento térmico. Porém, o alto custo desta metodologia impede seu uso na rotina veterinária.

Modificando o método de Evenson *et al.* (1980), Tejada e colaboradores (1984) iniciaram um trabalho com esfregaços de sêmen humano, avaliando a compactação

da cromatina pela coloração de AO. Apesar de serem testes mais simples e baratos por não utilizarem citofotômetro de fluxo, obtiveram bons resultados.

Vários outros estudos foram realizados na confirmação destes testes. Assim, Beletti e Mello (1996), estudando touros que apresentavam alta porcentagem de espermatozóides com patologia de cabeça do tipo “pouch formation” (touros subférteis), observaram que alguns destes animais apresentavam a frequência de espermatozóides 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. Neste mesmo trabalho, os autores utilizaram a coloração com AT e com AO em esfregaços de sêmen, sendo que a primeira coloração foi mais barata, eficiente e menos subjetiva.

Hammadeh *et al.* (2001) submeteram sêmen humano a exames com Azul de Anilina e não obtiveram correlação entre condensação cromatínica do espermatozóide e defeitos de morfologia. Assim, concluíram que compactação de cromatina é mais um parâmetro para a avaliação de fertilidade no macho, sendo este independente de outros parâmetros convencionais. Conseqüentemente, indicam a inclusão da avaliação de compactação de cromatina na rotina dos laboratórios de reprodução. Evenson *et al.* (2002) por sua vez preconizam que fatores metacromáticos, como os proporcionados pelo AT, devem ser utilizados na avaliação da integridade cromatínica do espermatozóide humano e de outras espécies animais, pois os parâmetros clássicos de qualidade espermática não estão bem correlacionados aos quadros de infertilidade e subfertilidade.

Segundo Gilbert (1982), os espermatozóides das espécies aviárias diferem dos mamíferos domésticos por serem menores, com cabeças filamentosas e longas, e por não possuírem gota citoplasmática. O acrossoma, a cabeça, a peça intermediária e a peça principal da cauda estão presentes. Ainda segundo este autor, no galo a cabeça do espermatozóide é curva e mede 12 a 13 μm de comprimento, e é recoberta pelo capuchão do acrossoma (2 μm de comprimento). A peça intermediária da cauda mede cerca de 4 μm de comprimento, e o restante do comprimento do espermatozóide de 100 μm é composto da peça principal da cauda. Em sua parte mais larga, o espermatozóide mede cerca de 0,5 μm .

A partir de estudos em microscopia eletrônica de transmissão, Soares e Beletti (2006b) observaram que o acrossoma dos espermatozóides 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 espermatozóides 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 mais claro.

Na análise do sêmen de aves, os parâmetros seminais convencionais analisados são: concentração, motilidade, morfologia, vitalidade, contaminação e volume que varia de 0,5 a 1,0 ml (JAENISH, 1989). Harris *et al.* (1984) enfatizaram a importância do peso corporal na seleção de reprodutores e salientaram uma correlação positiva entre peso corporal e volume de sêmen. Ansah *et al.* (1980) constataram valores médios de motilidade entre 0,22 a 3,0, utilizando escore de zero a quatro. Quanto à concentração, Marini e Goodman (1969) reportaram grandes variações da concentração entre linhagens de alta e baixa taxa de crescimento, nas quais obtiveram, respectivamente, $2,3 \times 10^6$ e $4,9 \times 10^6$ espermatozóides/ml.

As alterações morfológicas nos espermatozóides de galos dividem-se como em outras espécies, em defeitos de cabeça e de peça intermediária, sendo os mais freqüentes 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 freqüentes na peça intermediária espermática foram: peça intermediária dobrada e peça intermediária tumefeita. Já a detecção de anomalias na cromatina dos espermatozóides é freqüentemente negligenciada, por falta de estudos (SOARES; BELETTI, 2006a). Soares e 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 espermatozóides 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.

A maioria das técnicas usadas para avaliação do sêmen é realizada pela análise visual do examinador, a qual possui certo grau de subjetividade e mesmo tendenciosidade. Na tentativa de se diminuir a subjetividade, tendenciosidade, falhas do examinador e aumentar a reprodutibilidade entre examinadores, vem sendo proposto o uso de análise de imagem por computador para a avaliação da motilidade e morfologia dos espermatozóides (BELETTI *et al*, 2005a). A análise computacional da morfologia espermática geralmente considera mensurações básicas como área, perímetro, comprimento, largura, bem como fatores derivados destas medidas, tal como: razão largura: comprimento, elipicidade, fator forma e outros (GARRETT; BAKER, 1995; BELETTI *et al*, 2005a). Em adição a estas mensurações básicas, descritores Fourier também são usados (OSTERMEIER *et al.*, 2001a;2001b; BELETTI *et al*, 2005a). Outra aplicação para análise de imagem é a caracterização da cromatina de espermatozóides coradas com azul de toluidina, que vem sendo concomitantemente usada com a análise morfométrica (BELETTI *et al*, 2005b).

O primeiro parâmetro seminal estudado por análise de imagem foi a motilidade (DOTT, 1975; JECHT; RUSSO, 1973). Hoje, existem programas de computador que avaliam a motilidade com precisão, sendo muito superiores à estimativa visual realizada pelo examinador nas técnicas de rotina (VERSTEGEN *et al.*, 2002; BELETTI *et al*, 2005a). Estes programas permitem análises mais completas, muito além do que simplesmente a determinação da porcentagem de espermatozóides férteis. O “CASA” (computer-aided semen analysis) permite a avaliação da concentração, porcentagem de espermatozóides móveis, velocidade curvilínea, velocidade linear, velocidade média, amplitude do deslocamento lateral da cabeça (WIJCHMAN *et al.*, 2001).

Ao contrário da motilidade, a morfologia normal dos espermatozóides e mesmo as anomalias variam para cada espécie e se faz necessário uma padronização da técnica para cada uma. A maioria das técnicas até agora padronizadas para determinar alterações morfológicas de espermatozóides são restritas à análise morfométrica da cabeça de espermatozóides humanos, sendo

mensuradas apenas a área, perímetro, comprimento, largura e razão largura/altura (MACLEOD; IRVINE, 1995; DAVIS *et al.*, 1992; JAGOE *et al.*, 1986; KATZ *et al.*, 1986; SCHRADER *et al.*, 1990). Apesar da simplicidade deste tipo de análise, Macleod e Irvine (1995) demonstraram que esta técnica é mais eficaz que análise visual realizada pelo técnico para identificar problemas de fertilidade. A avaliação de outros parâmetros morfológicos da cabeça (GARRETT; BAKER, 1995; HARR, 1997; BELETTI *et al.*, 2005a) e até mesmo da cauda (GERGELY, 1999; STEIGERWALD; KRAUSE, 1998) estão sendo pesquisados.

Na medicina veterinária, a análise de imagem, como técnica para avaliação de sêmen, esta passando por uma fase de padronização para cada espécie, tal como bovino (GRAVANCE *et al.*, 1998a; GRAVANCE *et al.*, 1999; SAILER *et al.*, 1996), ovino (GRAVANCE *et al.*, 1998b; SANCHO *et al.*, 1998), suíno (HIRAI *et al.*, 2001), eqüino (GRAVANCE *et al.*, 1996; GRAVANCE *et al.*, 1997), coelho (GRAVANCE; DAVIS, 1995), rato (HIGUCHI *et al.*, 2001) e até mesmo macaco (GAGO *et al.*, 1998). Porém, quase todos se restringem às mensurações básicas da cabeça do espermatozóide, ou seja, área, perímetro, altura, largura e razão largura/altura.

Recentemente o grupo de pesquisa "Cybernetic Vision" do Instituto de Física de São Carlos - USP em colaboração com Instituto de Ciências Biomédicas da UFU criaram programas em ambiente "Scilab", para análise morfológica de espermatozóides, independente da espécie (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI *et al.*, 2005a,c). Estes programas avaliam detalhadamente a morfologia da cabeça e estabilidade da cromatina, utilizando esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina. Já está demonstrado que estes programas identificam alterações morfológicas e de cromatina não percebidas pela análise visual do espermograma de rotina (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI *et al.*, 2005a,b,c).

Um fator importante na fisiologia reprodutiva das aves é a capacidade das fêmeas de armazenarem espermatozóides por períodos prolongados. Isso ocorre devido à presença dos túbulos de armazenamento de espermatozóides, que são invaginações do epitélio concentradas entre 1 e 3 cm nas diferentes espécies, na região cranial da vagina, sendo esta denominada junção utero-vaginal ou espermateca (ZANIBONI; BAKST, 2004). Os espermatozóides introduzidos na

vagina pela cópula ou inseminação artificial, ascendem até os túbulos de armazenamento e aí permanecem por períodos variados, dependendo da espécie, idade e status reprodutivo da fêmea (KING *et al.*, 2002). Holm e Ridderstrale (2002) afirmam que a duração do armazenamento dos espermatozóides pode variar de 6 a 45 dias nas diferentes espécies. No peru, este período varia de 10 a 15 semanas após uma única inseminação (BRILLARD; BAKST, 1990).

Através de experimentos onde a mucosa vaginal foi isolada, conservada em meio PBS (Phosphate-Buffered Saline) e observada em estereomicroscópio, King *et al* (1999) observaram que os espermatozóides estavam mais concentrados na porção terminal dos túbulos de armazenamento, posicionados com as cabeças alinhadas e suas caudas batiam sincronizadas e lentamente à temperatura ambiente. Froman (2003) observou que os espermatozóides ao longo dos túbulos não se aderem às células epiteliais e se alinham com os acrossomas voltados para o fundo cego dos mesmos. Aparentemente, ocorre uma estratificação das células espermáticas na extensão dos túbulos (VAN KREY *et al*, 1981), dando créditos à hipótese de que os últimos espermatozóides introduzidos são os primeiros a saírem dos túbulos fertilizando os ovos (BURKE; OGASAWARA, 1969; COMPTON *et al*, 1978). Bakst (1987,1993) observou a presença de lipídeos neste epitélio em galinhas, perus e codornas japonesas. Este material lipídico poderia ajudar na manutenção da membrana plasmática dos espermatozóides, protegendo contra danos oxidativos.

A quantificação dos espermatozóides contidos nos túbulos de armazenamento é difícil, pois essas células se agrupam muito próximas umas das outras. Além disso, raramente as lâminas cortadas em somente um plano de corte histológico, sendo que também a fixação e preparação do tecido levam a perdas e alteração do número de espermatozóides (KING *et al*, 1999). Segundo Bakst (1987), a população de espermatozóides na espermateca é estimada em $7,5 \times 10^6$ células. Brillard e Bakst (1990) observaram que os espermatozóides preenchem os túbulos de armazenamento mais rapidamente e em maior número nas fêmeas inseminadas antes do início da produção de ovos. Utilizando técnicas histológicas, notaram que o preenchimento dos túbulos levou cerca de 4 horas em fêmeas inseminadas antes do início da produção de ovos, enquanto que naquelas inseminadas após o início da produção, esse número subiu para 2-5 dias. Possivelmente, o ambiente do lúmen

dos túbulos durante a produção de ovos não é condizente com o transporte de espermatozóides ou ocorre uma diminuição de túbulos funcionais após o início da produção. King *et al* (2002) sugerem que pode ocorrer algum tipo de ativação dos túbulos antes do início da produção de ovos, justificando a maior capacidade de armazenamneto neste período. Alterações hormonais (BRILLARD *et al*, 1997) ou a distensão do oviduto associada à passagem dos ovos (BAKST, 1994) podem interferir no armazenamento após o início da produção. De acordo com Brillard (1993), a capacidade máxima de armazenamento em galinhas é atingida com somente uma inseminação artificial.

Segundo Bakst *et al* (1994), os espermatozóides armazenados são recrutados dos túbulos durante todo o período em que a fêmea está produzindo ovos, para garantir a fertilização dos mesmos. O armazenamento dispensa a manutenção constante dos machos com as fêmeas, já que a sincronização da cópula com a ovulação se torna desnecessária (SWAN; SICOURI, 1999).

Alguns estudos sugerem a existência de um processo de seleção dos espermatozóides que permanecem na espermateca (OGASAWARA *et al*, 1966; BAKST, 1989). Esses mecanismos de entrada e saída dos espermatozóides dos túbulos não estão bem caracterizados, mas sabe-se que somente espermatozóides móveis e morfolologicamente normais adentram os túbulos de armazenamento (KING *et al*, 2002). Froman (2003) sugere que a motilidade espermática é o principal aspecto para a seleção dos espermatozóides que permanecerão nos túbulos de armazenamento pois somente células móveis são capazes de ascender a vagina e atingir a espermateca. Além disso, fatores como a idade da ave e início da produção de ovos também podem interferir (KING, 2002).

Froman (2003) em sua dedução de um modelo para o armazenamento de espermatozóides em galinhas, explica que a presença de uma corrente unidirecional de fluido deveria promover a saída dos espermatozóides para fora dos túbulos de armazenamento quando a motilidade desses fosse menor que a força da corrente. Essa corrente seria formada pelo do fluxo de água que atravessa os aquaporos de membrana (AQP), que são pequenas proteínas de membrana que funcionam como canais de água em vários tecidos (VERKMAN; MITRA, 2000), presentes na porção

apical dos túbulos de armazenamento (ZANIBONI; BAKST, 2004). Acredita-se, de acordo com Zaniboni e Bakst (2004) que a cascata hormonal que modula a produção de ovos também interfira no funcionamento dos aquaporos dos túbulos, já que antes do início da produção observa-se pequenas quantidades de fluido saindo dos túbulos, o que favoreceria o preenchimento máximo dos mesmos. Após o início da produção, observa-se um aumento na produção de fluido, o que favoreceria a saída dos espermatozóides para atingir o local de fertilização do ovulo.

Outra possibilidade para a saída dos espermatozóides dos túbulos de armazenamento foi sugerida por Freedman *et al* (2001). Através de imunohistoquímica, comprovaram a existência de gânglios e fibras nervosas na túnica mucosa da espermateca. Isso implica na existência de mecanismos de controle neural dos túbulos de armazenamento. Mamajiwalla *et al.* (1992) observaram que a porção terminal dos túbulos é capaz de se contrair *in vitro*. Assim, Freedman *et al.* (2001) concluíram que terminais abundantes em F-actina no epitélio dos túbulos poderiam estar envolvidos em uma contração dos mesmos, liberando os espermatozóides presentes próximos a abertura. Além disso, observaram que a motilidade dos espermatozóides residentes nos túbulos pode ser alterada por neurotransmissores colinérgicos liberados pelas fibras nervosas adjacentes. Atherton *et al.* (1980) concluíram que a acetilcolina aumenta a motilidade de espermatozóides *in vitro*. Como Freedman *et al* observaram a presença de atividade colinesterásica nos espermatozóides por imunohistoquímica, sugerem que a motilidade dos espermatozóides de aves também pode ser regulada por um sistema de neurotransmissão colinérgica. Porém, se a saída dos espermatozóides dos túbulos é resultado de um aumento na motilidade dos mesmos mediada por acetilcolina ainda precisa ser determinada.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Variações metodológicas para coloração com Azul de Toluidina

Foram utilizadas 20 amostras de sêmen de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de duas diferentes idades, coletadas por massagem cloacal, de acordo com a técnica descrita por Wilson (1988). Dez amostras foram coletadas de aves pertencentes a um lote com 35 semanas de idade, peso médio de 4,9 Kg e taxa de fertilidade de 99,43% (Galos Novos). As demais amostras foram coletadas de aves pertencentes a um lote com 60 semanas de idade, peso médio de 5,3 Kg e taxa de fertilidade de 96,41% (Galos Velhos). Para conservação das amostras foi colocada uma gota de sêmen em 2 mL de formol citrato (RODENAS *et al*, 2005; SOARES; BELETTI, 2006)

Em seguida, foram testadas variantes metodológicas utilizando colorações com azul de toluidina (AT) com diferentes métodos de desnaturação e coloração, descritos a seguir:

Desnaturação:

- 1) Sem desnaturação.
- 2) 5, 10, 15 e 20 minutos em ácido clorídrico 4N.
- 3) 5, 10, 15 e 20 minutos em ácido clorídrico 1N.
- 4) 5, 10, 15 e 20 minutos em ácido clorídrico 0,5N.
- 5) 1, 5 e 10 minutos em estufa a 60 °C.

Coloração:

- 1) Uma gota de azul de toluidina 0,025%, pH 3,0 entre lâmina e lamínula com observação após 3 minutos.
- 2) Uma gota de azul de toluidina 0,025%, pH 4,0 entre lâmina e lamínula com observação após 3 minutos.
- 3) Uma gota de azul de toluidina 0,025%, pH 5,0 entre lâmina e lamínula com observação após 3 minutos.
- 4) Coloração em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 3,0, por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentrações crescentes de álcool, diafanização com xilol e montagem com bálsamo do Canadá.

- 5) Coloração em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0, por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentrações crescentes de álcool, diafanização com xilol e montagem com bálsamo do Canadá.
- 6) Coloração em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 5,0, por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentrações crescentes de álcool, diafanização com xilol e montagem com bálsamo do Canadá.

Todas as amostras passaram por todas as variantes acima. A escolha do melhor protocolo de coloração para a visualização das alterações na compactação do DNA dos espermatozóides foi feita pela observação das lâminas em microscopia de luz.

Após a escolha do melhor protocolo de coloração, este foi aplicado nas 20 amostras de sêmen. Os esfregaços foram visualizados e as imagens foram capturadas com o intuito de passarem pela análise computacional.

Para a análise computacional, imagens digitais foram capturadas em microscópio binocular Olympus BX40 com objetiva de 100x (imersão), acoplado a câmera Olympus OLY-200, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153. Posteriormente, estas imagens foram trabalhadas no programa Jasc Paint Shop Pro 8®, no qual eram primeiramente passadas para tons de cinza. Em seguida as cabeças dos espermatozóides foram cortadas aleatoriamente e coladas em fundo branco, processo este denominado de segmentação. Foram segmentadas 50 cabeças por animal para serem avaliadas individualmente.

As cabeças dos espermatozóides foram analisadas em programa desenvolvido em ambiente de programação SCILAB no qual foram avaliados: área, comprimento, largura, perímetro (BELETTI *et al*, 2005a), homogeneidade da coloração da cabeça (CV) e a diferença percentual do valor médio dos pixels que compõem a cabeça em relação ao valor médio dos pixels de cabeças padrões (Dif. %). Para se ter uma referência da coloração normal da cabeça do espermatozóide, foram selecionadas visualmente 6 cabeças de espermatozóides em cada esfregaço. A média dos valores de píxel destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozóides (cabeças padrões) (SILVA, 2006).

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

Para a análise estatística foi utilizado teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Uma vez confirmada a normalidade dos dados utilizou-se o teste t-Student para comparação entre médias com $p \leq 0,05$. Também foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis referentes ao tamanho da cabeça (área, perímetro, largura e comprimento) e à compactação de cromatina (coeficiente de variação e diferença porcentual).

3.2. Análise das alterações na compactação da cromatina dos espermatozóides após o armazenamento na espermoteca das galinhas

Foram utilizadas 48 matrizes pesadas, sendo quarenta e quatro fêmeas e quatro machos da linhagem Cobb Avian 48 com 36 semanas de idade, cedidas pela Granja Planalto – Unidade do Óleo – Uberlândia – MG. Durante o experimento, as aves foram alojadas em baias medindo $8m^2$ nas dependências do Hospital Veterinário de Uberaba – MG da Universidade de Uberaba (UNIUBE). Foi utilizada cama de serragem no piso das baias e os animais foram mantidos com água e ração comercial para postura à vontade. Por se tratar de matrizes pesadas, foram montados ninhos elevados para a postura dos ovos, igualando ao máximo o ambiente das fêmeas ao ambiente da granja.

Os animais foram identificados com placas de metal numeradas na face medial da asa, as fêmeas numeradas de 1 a 44 e os machos de 1 a 4.

Inicialmente, os machos e as fêmeas foram separados por um período de 25 dias para garantir o esvaziamento das espermatecas das galinhas. Após esse período, dividiu-se as fêmeas em quatro lotes, sendo cada lote formado por 11 galinhas. Foi introduzido um galo em cada lote de galinhas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos lotes de galos e galinhas utilizados no experimento

Número do Galo	Lote de Galinhas
1	1 – 11
2	12 – 22
3	23 – 34
4	35 - 44

Os galos foram mantidos com as galinhas durante 7 dias, garantindo assim a cobertura de todo o lote. Os animais foram então separados novamente e deu-se início à coleta do material.

A coleta do material foi realizada por um período de 23 dias. Foi feita a coleta de material na região da espermateca in vivo com a utilização de uma pipeta Pasteur de 1ml, a qual era introduzida no proctodeo das aves após a eversão da cloaca e higienização da região com soro fisiológico. Introduziu-se a pipeta até a junção utero-vaginal, que foi percebida devido à resistência do esfíncter presente nesta região e com movimentos de rotação, o material foi coletado. Após a retirada, a ponta da pipeta foi mergulhada e lavada em um microtubo de 2 mL (Ependorf) contendo 0,1ml de solução fixadora de formol citrato. Os microtubos foram identificados com data de coleta e número do animal.

Após o término das coletas, os microtubos foram centrifugados para que houvesse a precipitação dos espermatozóides. Fez-se a coleta de uma gota proveniente do fundo do ependorf, sendo que esta foi colocada em lâmina. Após a secagem da lâmina, a mesma foi levada ao microscópio óptico com condensador de contraste de fase em objetiva de 40x para a tentativa de observação dos espermatozóides.

3.3. Análise das características da espermateca e quantificação dos espermatozóides na região dos túbulos de armazenamento.

À medida que se procedia a coleta do material, de 3 a 6 aves por dia eram escolhidas aleatoriamente e sacrificadas para que fossem confeccionadas lâminas para análise histológica da espermateca. As aves foram sacrificadas de acordo com a Tabela 2:

Após o sacrifício, as vísceras das aves foram retiradas e separou-se o oviduto das demais. A região da espermateca foi separada e dividida em fragmentos (cranial, médio e caudal), que foram fixados em formol 10% e enviados para o processamento e confecção das lâminas histológicas.

Tabela 2: Número de aves sacrificadas em cada dia de coleta

Dia de Coleta	Aves sacrificadas	Total
3	8, 20, 23, 24, 34, 35	6
5	5, 12, 43	3
10	3, 4, 6, 11, 41, 42	6
12	16, 19, 22, 28, 30, 33	6
16	1, 13, 17, 31, 37, 40	6
18	2, 9, 26, 32, 39, 44	6
19	10, 14, 15, 21, 36, 38	6
23	7, 18, 25, 27, 29	5

Cada fragmento foi processado de acordo com o protocolo clássico de inclusão em parafina. Foram então cortados em toda sua extensão, sendo que, para cada fragmento, foram feitas dez lâminas, cada uma contendo 3 cortes, em um total de 30 cortes de cada fragmento.. Os cortes foram de 6µm de espessura, sendo que o intervalo entre os cortes foi de 600µm (100 cortes).

As lâminas foram submetidas a dois tipos de coloração. Cinco lâminas de cada fragmento foram coradas com a técnica usual para hematoxilina-eosina (HE). As demais foram coradas com Azul de Toluidina (AT), de acordo com o protocolo determinado no início do experimento: desnaturação em ácido clorídrico 0,5N por 10

min, coloração em AT 0,025% pH 4 por 20 min e desidratação em séries de álcool e diafanização em xilol. Todas foram montadas com bálsamo do Canadá.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 100x (imersão). Foi feita então uma contagem dos espermatozoides visualizados em cada corte presente nas lâminas coradas com HE. As células presentes em cada campo eram contadas e o resultado anotado. Esse procedimento foi realizado nas lâminas confeccionadas de acordo com os dias de coleta descritos na Tabela 2. As imagens das lâminas foram digitalizadas em microscópio Olympus Triocular BX40 acoplado a câmera Oly-200, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153.

Para a análise estatística, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Posteriormente, utilizou-se o teste t-Student para comparação entre médias para os dados que possuíam distribuição normal e o teste de "Wilcoxon" para os dados que possuíam distribuição não normal (ambos com $p \leq 0,05$).

3.4. Coleta e análise do sêmen dos galos para comparação com espermatozoides durante o armazenamento

Terminada a coleta do material das fêmeas, foi feita a coleta do sêmen dos machos para a comparação. Como os animais não responderam às técnicas de coleta artificial de sêmen, após várias tentativas foi necessário sacrificar os quatro machos para obter-se a amostra. Após o sacrifício, procedeu-se a abertura da cavidade celômica pela face ventral. As vísceras foram retiradas até a visualização dos testículos. Ligados aos testículos, observou-se os ductos deferentes. Foi coletado 0,1ml de sêmen da porção distal dos ductos deferentes através de aspiração por uma agulha fina acoplada a uma seringa de 1ml, sendo que metade deste volume (0,05ml) foi colocada em 2ml de solução fixadora de formol + citrato de sódio.

Foram feitos esfregaços das amostras e após 12h de secagem em temperatura ambiente, foram corados com AT de acordo com a técnica determinada no início do experimento.

3.5. Eclosão dos ovos gerados pelas galinhas durante o experimento

Os ovos gerados pelas aves durante os primeiros 18 dias após a cópula foram colocados em chocadeira, sendo observado sua evolução até a eclosão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variações metodológicas de coloração com AT

O protocolo de fixação utilizando formol citrato apresentou bons resultados para a fixação. Soares e Beletti (2006) descrevem que a fixação dos espermatozóides em lâminas faz com que sua cabeça helicoidal sofra algumas fraturas, alterando o acesso das moléculas de corante, fazendo com que todos os espermatozóides sejam corados como se possuíssem alterações cromatínicas, por isso foi utilizado formol citrato (RODENAS *et al*, 2005).

Para a determinação do protocolo de coloração, procurou-se estabelecer inicialmente um protocolo de desnaturação para a posterior coloração com AT. O melhor método de desnaturação foi a hidrólise com ácido clorídrico 1N por dez minutos, e a melhor coloração foi a realizada em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0, por 20 minutos e posterior desidratação em séries de concentração crescentes de álcool e diafanização em xilol. Com este protocolo foi possível diferenciar visualmente os espermatozóides mais bem corados em relação aos outros métodos testados. Por esta razão, este foi o protocolo escolhido para diferenciar computacionalmente os espermatozóides normais daqueles com alteração de cromatina (Figuras 1 e 2), sendo aplicado a todas as amostras de sêmen dos galos jovens e velhos.

Soares e Beletti (2006) não conseguiram chegar a um protocolo confiável para a avaliação visual da compactação de cromatina utilizando AT. A principal diferença entre os protocolos utilizados por estes autores e o escolhido para a avaliação computacional neste trabalho é a hidrólise com ácido clorídrico feita antes do início da coloração, que não foi realizada no trabalho citado. Apesar destes autores afirmarem que os espermatozóides de galo possuem cromatina mais frouxa que a de outras espécies, dispensando a desnaturação ácida, o protocolo escolhido como o mais eficiente no presente trabalho permitiu a diferenciação visual dos espermatozóides mais bem corados (cromatina alterada), por isso, foi aplicado para a análise computacional das cabeças.

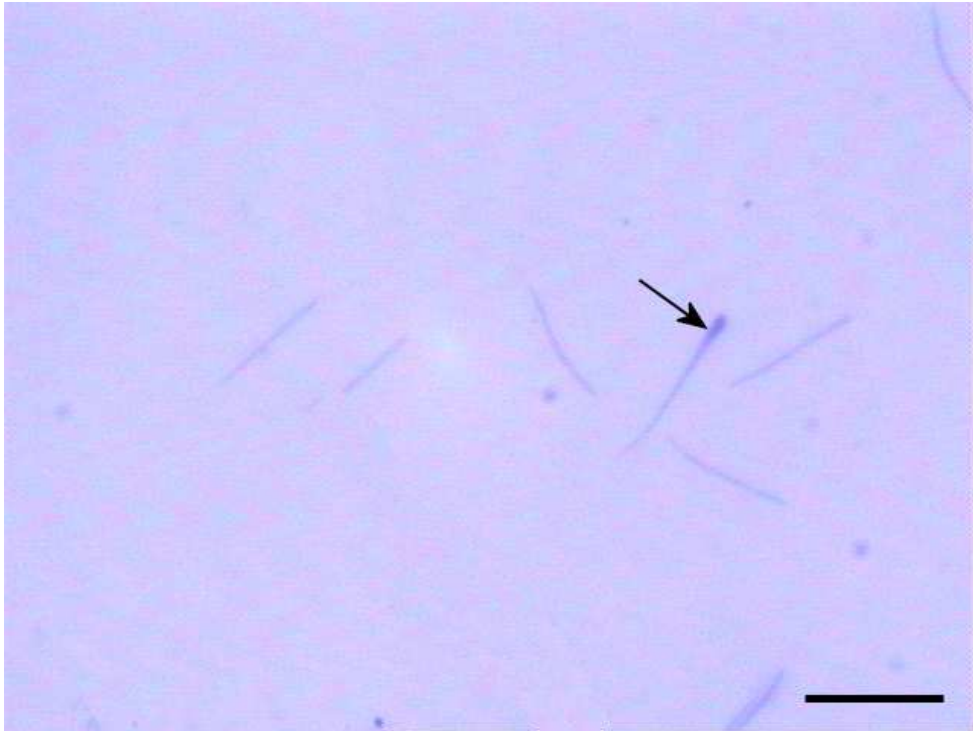


Figura 1: Esfregaço de sêmen de galo hidrolisado em ácido clorídrico 1N por 10 minutos e corado em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0 por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentração crescente de álcool. Espermatozóides com cromatina mal compactada corando se em azul mais intenso (Seta). (Barra 10 μ m)

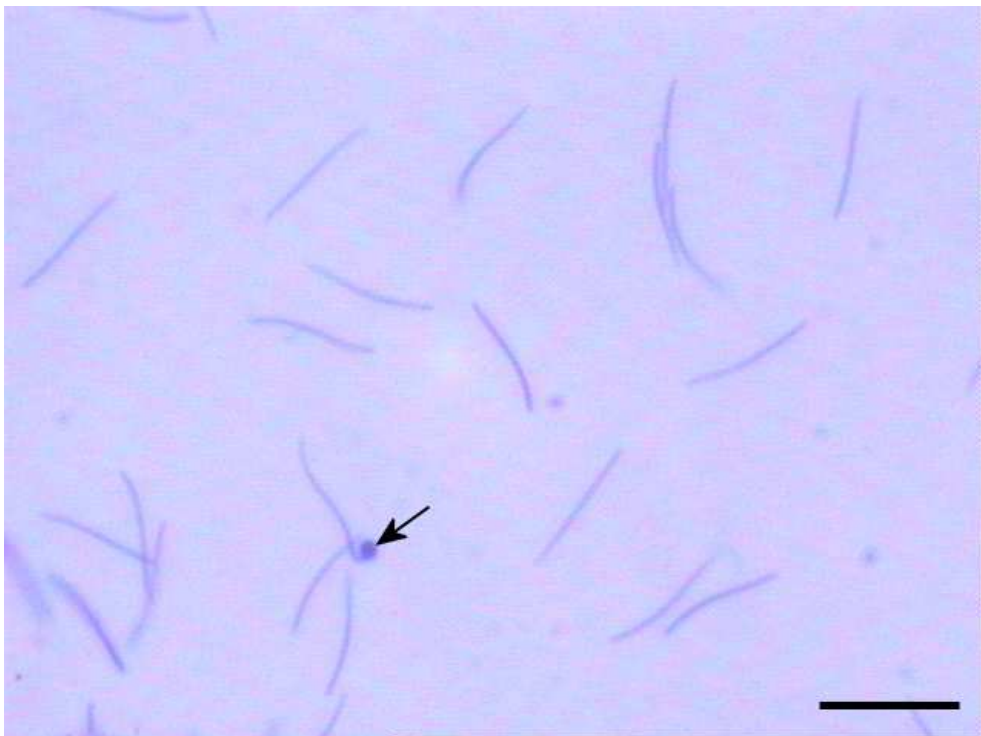


Figura 2: Esfregaço de sêmen de galo hidrolisado em ácido clorídrico 1N por 10 minutos e corado em cubeta com azul de toluidina 0,025%, pH 4,0 por 20 minutos e posterior desidratação em série de concentração crescente de álcool. Espermatozóides com cromatina mal compactada corando se em azul mais intenso (Seta). (Barra 10 μ m).

4.2. Análise Computacional

Na análise morfométrica computacional, a partir dos valores das variáveis de cada uma das 50 cabeças de cada animal, chegou-se a uma média de cada animal. A partir dessa média foi obtida uma média de cada variável dos galos jovens e dos galos velhos (Tabela 3).

Os coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas referentes a tamanho da cabeça e a compactação de cromatina estão demonstrados na Tabela 4, na qual não foi possível observar correlação estatisticamente significativa. Portanto, baseado nesses dados não é possível fazer qualquer inferência sobre a influência da compactação da cromatina sobre a forma da cabeça dos espermatozoides de galo. Segundo Beletti *et al.* (2005b), as alterações morfológicas causadas por alterações na estrutura da cromatina deveriam aumentar o tamanho do espermatozoide. Neste trabalho, não foi mensurado o volume dos espermatozoides, somente a área. Apesar de não serem significativos estatisticamente, os coeficientes de correlação foram negativos, demonstrando uma tendência dos espermatozoides dos animais com maior número de alterações na cromatina serem menores.

Tabela 3. Média das características avaliadas na análise computacional da cabeça dos espermatozoides dos galos jovens e velhos (Média $\pm$ desvio padrão)

<i>Variáveis analisadas</i>	<i>Galos Novos</i>	<i>Galos Velhos</i>
Área (μm^2)	9,9 $\pm$ 1,8 ^a	8,8 $\pm$ 1,9 ^b
Perímetro (μm)	29,1 $\pm$ 3,1 ^a	27,7 $\pm$ 3,6 ^b
Largura (μm)	1,0 $\pm$ 0,15 ^a	0,98 $\pm$ 0,15 ^b
Comprimento (μm)	11,0 $\pm$ 2,4	10,2 $\pm$ 2,2 ^b
CV	3,8 $\pm$ 2,9 ^a	7,5 $\pm$ 7,8 ^b
Dif. %	1,9 $\pm$ 2,3 ^a	5,7 $\pm$ 3,2 ^b

Letras distintas na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre os valores, segundo o teste t-Student com $p \leq 0,05$.

Tabela 4: Coeficiente de correlação entre as variáveis avaliadas na análise computacional da compactação da cromatina dos espermatozoides dos galos jovens e velhos

<i>Variáveis analisadas</i>	<i>Área</i>	<i>Perímetro</i>	<i>Largura</i>	<i>Comprimento</i>
Dif %	-0,118	-0,021	-0,064	-0,075
CV	-0,107	-0,002	-0,019	-0,107

Nenhum dos coeficientes é estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$

Conforme os dados apresentados na Tabela 3, podemos verificar que os galos novos apresentam as variáveis de tamanho de cabeça maiores que os galos velhos. Essa diferença pode ser justificada pela presença de um maior número de alterações morfológicas nos espermatozóides dos galos jovens, que foi observado por Soares e Beletti (2006).

Foi encontrado um maior número de alterações na cromatina (CV e Dif%) nos animais velhos (Tabela 3), ou seja, estes animais apresentavam cromatina com compactação menos homogênea dentro de uma mesma cabeça (CV) e com menor compactação em relação a cabeças normais (Dif%). Soares e Beletti (2006) também observaram que galos velhos (60 semanas) apresentam um maior número de alterações na compactação cromatínica do que galos jovens, porém não conseguiram uma avaliação confiável de esfregaços corados com azul de toluidina, pois esta foi feita visualmente, de maneira subjetiva. A diferenciação foi realizada em esfregaços corados com alaranjado de acridina.

A avaliação computacional de esfregaços de sêmen de galo corados com azul de toluidina permitiu uma avaliação menos subjetiva e mais sensível da compactação da cromatina dos espermatozóides. Vários estudos (BELETTI *et al*, 2005a; BELETTI *et al*, 2005b; BELETTI *et al*, 2004) concordam que a avaliação computacional pode encontrar alterações que não seriam percebidas pelas análises tradicionais.

4.3. Alterações na compactação da cromatina dos espermatozóides durante o período de armazenamento na espermateca das galinhas

Não foi possível avaliar as alterações na cromatina dos espermatozóides durante o período de armazenamento na espermateca das galinhas. Apesar do método de coleta do sêmen dos 4 galos utilizados na cobertura das galinhas ter sido eficiente, o método de coleta do material proveniente da junção uterovaginal utilizado não se mostrou adequado. Após a confecção das lâminas, foi possível visualizar alguns espermatozóides, porém estes apresentavam-se totalmente aglomerados, sendo impossível proceder a segmentação das cabeças para a análise computacional. Os espermatozóides isolados não foram suficientes para uma amostra estatisticamente satisfatória.

Foi feita uma tentativa de isolamento das cabeças a partir dos cortes histológicos da espermateca corados com azul de toluidina. Porém, não foi possível segmentá-las, já que, neste caso, a coloração com azul de toluidina não foi eficiente, não houve coloração do núcleo dos espermatozóides (Figura 3) e, conseqüentemente, não foi possível comparar a compactação da cromatina dessas células com os espermatozóides dos esfregaços do sêmen dos galos. É importante enfatizar que a cabeça dos espermatozóides são cortadas durante este tipo de processamento, alterando a coloração das mesmas.

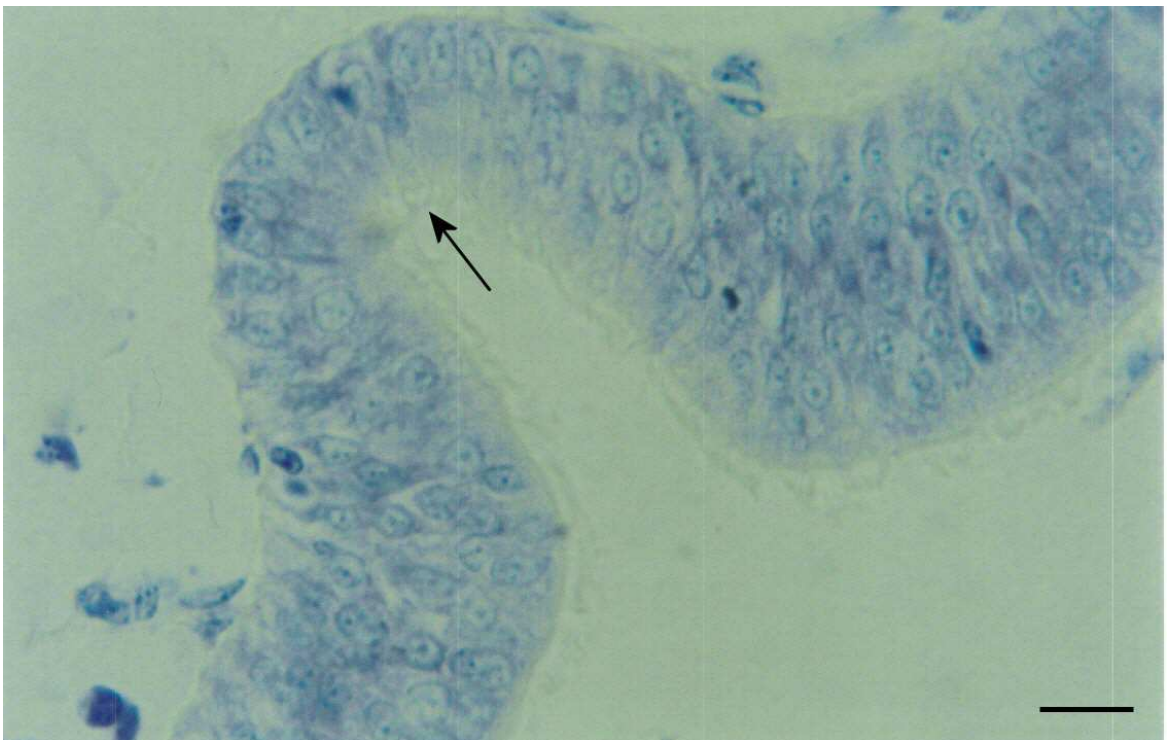


Figura 3: Corte de espermateca corado com azul de toluidina, mostrando a imagem negativa dos cílios e caudas dos espermatozóides (seta). Não é possível visualizar as cabeças dos espermatozóides (Barra 40 μm)

4.4. Período de armazenamento e contagem dos espermatozóides na espermateca

As espermatecas das galinhas foram observadas macroscopicamente como uma região da mucosa vaginal muito pregueada. Microscopicamente, a vagina é revestida por epitélio pseudoestratificado ciliado e possui lâmina própria bem vascularizada e camadas muscular e serosa características das vísceras ocas do sistema reprodutor (Figura 4).



Figura 4: Epitélio da junção utero-vaginal com os túbulos de armazenamento de espermatozóides (setas). Coloração HE, (Barra 100 µm).

Neste trabalho, foram observadas características da espermateca que não condizem com algumas características observadas por outros autores. Bakst et al (1994) descreveram o epitélio da junção utero-vaginal como epitélio pseudoestratificado colunar e ciliado e o epitélio dos túbulos de armazenamento como simples colunar sem cílios. O epitélio pseudoestratificado ciliado observado neste trabalho foi encontrado não somente na junção utero-vaginal mas também nos túbulos de armazenamento. Assim como a presença de cílios foi observada no interior dos túbulos de armazenamento e não somente no epitélio da junção utero-vaginal como descrito por Bakst (1994) (Figura 5). Foi possível diferenciar

os cílios das caudas dos espermatozóides devido à variação de tamanho que estas apresentam, sendo que o tamanho dos cílios é constante.



Figura 5: Epitélio pseudoestratificado ciliado no interior do túbulo de armazenamento. Observar a presença de cílios (seta preta) e espermatozóides (seta azul). Coloração HE, (Barra 40 μ m)

A presença de células espermáticas foi observada por toda a mucosa da espermateca. Os espermatozóides ocupavam não só os túbulos de armazenamento, como também foram observados fora dos túbulos em grandes extensões (Figura 6). As cabeças dos espermatozóides encontravam-se quase que perpendiculares ao epitélio, e as caudas voltadas para a luz dos túbulos ou da espermateca (Figura 6).

Vários autores (BRILLARD; BAKST, 1990; BAKST, 1997; KING *et al.* 2002; ZANIBONE; BAKST, 2004) descrevem a presença de espermatozóides somente no interior dos túbulos de armazenamento, mais precisamente na sua porção terminal. Após a análise das lâminas, observamos espermatozóides em maior concentração na porção terminal, porém eles se estendiam por toda a parede dos túbulos (Figura 7).

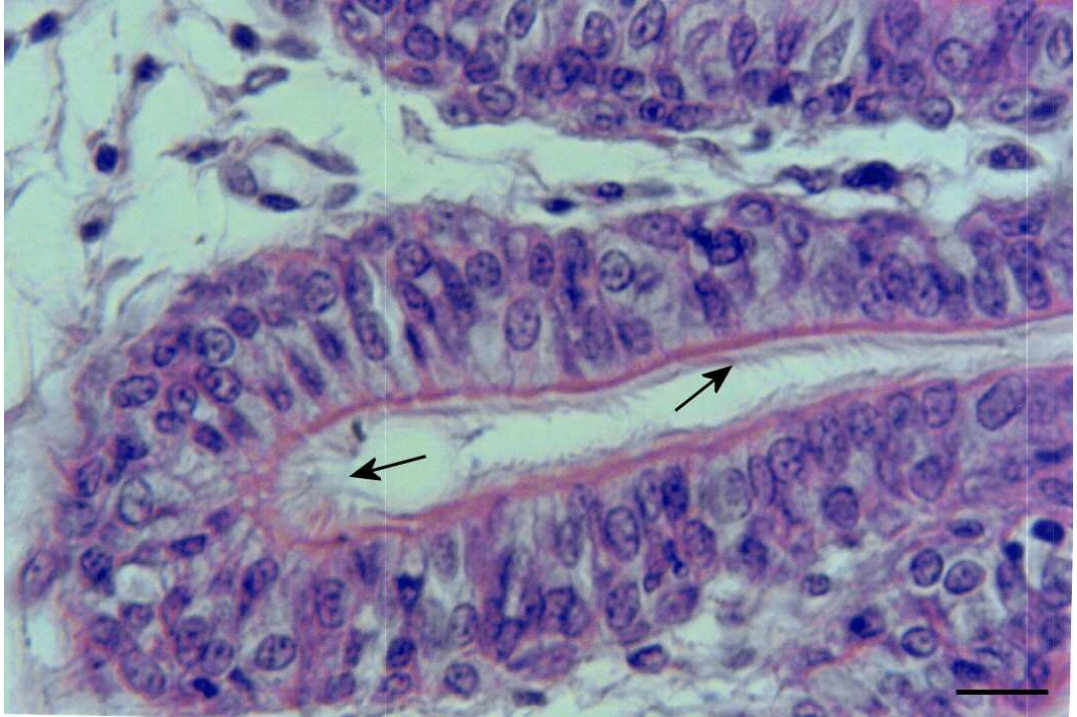


Figura 6: Espermatozoides presentes em toda a extensão do túbulo de armazenamento (setas). Coloração HE, (Barra 40 μ m)

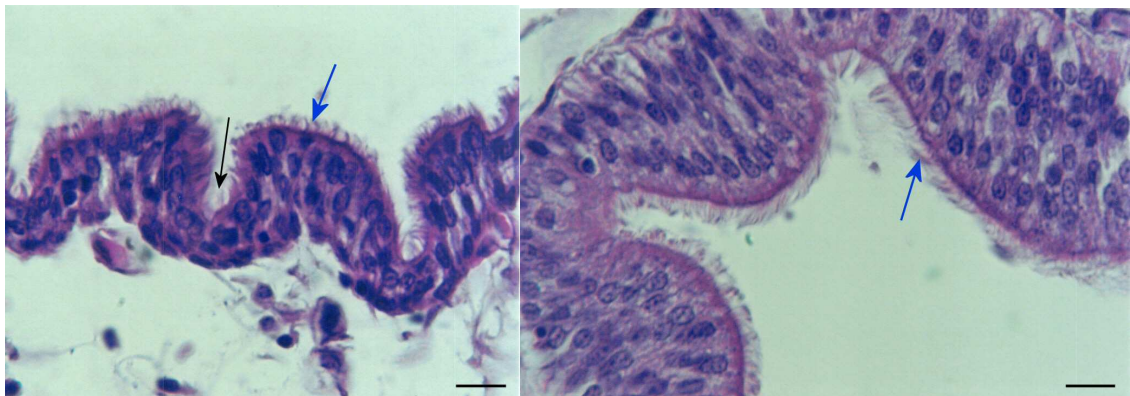


Figura 7: Espermatozoides no interior (setas pretas) e fora dos túbulos de armazenamento (setas azuis). Observar os núcleos das células espermáticas, mais basófilos. Coloração HE, (Barra 40 μ m).

Prasad (1967) observou que o preenchimento total dos túbulos de armazenamento ocorre em 2 dias após a cópula. Neste trabalho, observamos que na primeira coleta, no segundo dia após a cópula, praticamente toda a superfície da espermateca e dos túbulos possuía espermatozoides, condizendo com as observações do autor citado.

As médias das quantidades de espermatozóides encontradas em cada dia de coleta está demonstrada na Tabela 5. Não houve diferença significativa quanto à diminuição no número de espermatozóides por dia de coleta.

Tabela 5. Médias $\pm$ Desvio Padrão do número de espermatozóides por dia de coleta

Dia de coleta	Média de espermatozóides $\pm$ DP
3	6267,33 $\pm$ 3932.190 ^a
5	6098,33 $\pm$ 3184.212 ^a
10	5670,66 $\pm$ 4121.278 ^a
12	5816,66 $\pm$ 4190.810 ^a
16	5329,33 $\pm$ 3656.508 ^a
18	5136,66 $\pm$ 3581.448 ^a
19	5011 $\pm$ 3912.763 ^a
23	4726,66 $\pm$ 3798.135 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam médias diferentes, segundo o teste t-Student com $p \leq 0,05$.

Quanto às quantidades avaliadas em cada fragmento da espermateca (cranial, médio e caudal), houve diferença significativa entre cada fragmento. Os valores médios de espermatozóides em cada fragmento está representado na Tabela 6:

Tabela 6. Médias $\pm$ desvio padrão do número de espermatozóides em cada fragmento da espermateca

Fragmento	Média de espermatozóides $\pm$ DP
Cranial	2160,37 $\pm$ 611.6684 ^a
Médio	9928,75 $\pm$ 413.2045 ^b
Caudal	4432,12 $\pm$ 704.1726 ^c

Letras diferentes na mesma coluna indicam médias diferentes, segundo o teste t-Student com $p \leq 0,05$.

Apesar da diferença no número de espermatozóides em cada fragmento da espermateca, não houve diferença significativa entre os fragmentos nos diferentes dias de coleta (Tabela 7).

Tabela 7. Médias das quantidades de espermatozóides por dia por fragmento da espermateca

Dia de coleta	Fragmento Cranial	Fragmento Médio	Fragmento Caudal
3	2750.0 ^a	10640.0 ^a	5412.0 ^a
5	3220.0 ^a	9960.0 ^a	5115.0 ^a
10	2120.0 ^a	10192.0 ^a	4700.0 ^a
12	2490.0 ^a	10230.0 ^a	4730.0 ^a
16	1923.0 ^a	9815.0 ^a	4250.0 ^a
18	1700.0 ^a	9510.0 ^a	4200.0 ^a
19	1550.0 ^a	9683.0 ^a	3800.0 ^a
23	1530.0 ^a	9400.0 ^a	3250.0 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre grupos, segundo teste Wilcoxon com $p \leq 0,05$

A partir desses resultados (Tabelas 6 e 7), observamos que os espermatozóides se concentram na porção média da espermateca. No caso das galinhas, cerca de 1cm caudalmente ao esfíncter da junção utero-vaginal.

As médias das quantidades de espermatozóides armazenados na junção utero-vaginal não foram significativamente decrescentes com o passar dos dias como seria esperado, porém houve uma tendência ao decréscimo. De acordo com Leite e Viveiros (2006) o armazenamento em galinhas ocorre por no máximo 7 dias. Holm e Ridderstrale (2002) afirmam que a duração do armazenamento dos espermatozóides pode variar de 6 a 45 dias nas diferentes espécies, porém não especificaram o período de armazenamento em galinhas. No presente trabalho, foram observadas grandes quantidades de espermatozóides armazenados no 23º dia de coleta. A eclosão de ovos ocorreu até o 18º dia, sendo que ovos dos dias posteriores não foram colocados para a eclosão.

Brillard e Bakst (1990) estimaram a quantidade de espermatozóides nos túbulos de armazenamento em cerca de $7,5 \times 10^6$ espermatozóides. De acordo com King et al. (1999) a contagem de espermatozóides é complicada, pois estes encontram-se armazenados muito agrupados, dificultando a diferenciação das células. Por isso, são utilizadas técnicas como digestão por colagenase

(BRILLARD, 1993), homogenização dos túbulos (McLEAN; FROMAN, 1996), que são mais precisas. As contagens realizadas neste trabalho limitaram-se a um pequeno fragmento da junção utero-vaginal e cortes histológicos espaçados, não atingindo valores tão altos quanto aqueles dos autores supracitados. Devemos considerar também as perdas ocorridas no processo de coleta e fixação do material, que podem influenciar na diminuição da quantidade de espermatozóides.

5. CONCLUSÕES

O protocolo determinado e utilizado para a coloração dos esfregaços de sêmen foi eficiente tanto para a observação visual quanto para a análise computacional da compactação da cromatina em espermatozóides de galo. Porém o mesmo protocolo não foi satisfatório para a coloração de cortes histológicos pois não possibilitou a visualização dos espermatozóides no epitélio dos túbulos de armazenamento.

A análise computacional da compactação da cromatina foi mais precisa e mais objetiva do que a análise visual, descartando a possível subjetividade e a possibilidades de erros que existem durante esse procedimento e mostrou que os espermatozóides de galos velhos apresentam mais alterações na cromatina do que os de galos jovens; tanto alterações na homogeneidade como na compactação propriamente dita.

A presença de células ciliadas foi observada tanto no epitélio da junção utero-vaginal quanto no interior dos túbulos de armazenamento. O armazenamento dos espermatozóides na espermateca de galinhas ocorre por toda a extensão do epitélio da junção utero-vaginal e por toda a parede dos túbulos de armazenamento e não somente na sua porção terminal.

Existem espermatozóides viáveis em galinhas nos túbulos de armazenamento por pelo menos 18 dias após a cópula e estes permanecem armazenados por pelo menos 23 dias.

6. REFERÊNCIAS

AIRE, T. A. Ultraestructural study of spermiogenesis in the turkey, *Meleagris gallopavo*. **Poultry Science**, Savoy, v. 44, n. 5, p. 674 – 682, 2003.

ANSAH, G.A.; CROBER, D.C.; BUCKLAND, R.B.; SEXTON, A.E.; KENNEDY, B.W. Artificial insemination of individually caged broiler breeders. Reproductive performance of males in relation to age and strain of females. **Poultry Science**, Savoy, v.59, n.2, p.428-437, 1980.

ATHERTON, R. W.; CISSON, C. M.; WILSON, B. M; GOLDER, T. K. Quantitation of avian spermatozoa mobility: neurochemical regulation. **Gamete Research**, New York, v.3, p. 17 – 24, 1980.

BAKST M. R. Anatomical basis of sperm storage in the avian oviduct. **Scanning Microscopy**, Chicago, v. 1, p. 1257-1266, 1987

BAKST M. R. Oviductal sperm storage in poultry: a review. **Reproduction, Fertility, and Development**, Melbourne v. 5, p. 595-599, 1993.

BAKST M. R. Fate of fluorescent stained sperm following insemination: new light on oviductal sperm transport and storage in turkey. **Biology of Reproduction**, New York, n.50, p.987 – 992, 1994.

BALLACHEY, B. E.; HOHENBOKEN, W. D.; EVENSON, D. P. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction**, New York, v.36, p.915-25, 1987.

BELETTI, M. E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology**. Saint Louis, v.25, n.2, p.97-107, 2003.

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.

BELETTI, M. E. ; COSTA, L. F. ; VIANA, M. P. . A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 105-116, 2005a.

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, 2005b.

BELETTI, M. E. ; COSTA, L. F. ; VIANA, M. P. . A spectral framework for sperm shape characterization. **Computers in Biology and Medicine**, New York, v. 35, n. 6, p. 463-473, 2005c.

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

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**, New York, v.62,n.3, p.In press, 2004.

BRILLARD, J. P.; GALUT, O.; NYS, Y. Possible causes of subfertility in hens following insemination near the time of oviposition. **British Journal of Poultry Science**, Edinburgh, v. 28, p. 307-318, 1987.

BRILLARD, J.P. Sperm storage and transpot following natural mating and artificial insemination. **Poultry Science**, Savoy, v.72, n.5, p.923-928, 1993.

BRILLARD, J. P.; BAKST, M. R. Quantification of spermatozoa in the sperm storage tubules of turkey hens and the relation of sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. **Biology of Reproduction**, New York, n. 43, p. 271 – 275, 1990.

BURKE, W. H.; OGASAWARA, F. X. Presence of spermatozoa in uterovaginal fluids of the hen at various stages of the ovulatory cycle. **Poultry Science**, Savoy, v. 48, p. 408-413, 1969.

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

COMPTON, M. M.; VAN KREY, H. P.; SIEGEL, P. B. The filling and emptying of the uterovaginal sperm host glands in the domestic hen. **Poultry Science**, Savoy, v. 57, p. 1696- 1700, 1978

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

DAVIS, R.O.; BAIN, D.E.; SIEMERS, R.J.; THAL, D.M.; ANDREW, J.B.; GRAVANCE, C.G. Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. **Fertility and Sterility**. Birmingham, v.58, n.4, p.763-769, 1992.

DOBRINSKI, I.; BARTH, A.D. Abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. In: 10th BRAZILIAN CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, Belo Horizonte, Brazil, 5-9 July 1993., **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 1, n 4 (suplemento), p.15-23, 1993.

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.

DOTT, H.M. The estimation of the proportion of motile bull spermatozoa in various diluents and a comparison with the proportion eosinophilic. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v.45, n.1, p. 47-55, 1975.

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**, Birmingham, v.69, n.4, p.643-49, 1998.

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

EVENSON DP, LARSON KL, JOST LK.; Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Science**, Dordrecht, v.22, n.(2-3), p.169-89, 2002

FREEDMAN, S. L.; AKUFFO, V. G.; BAKST, M. R. Evidence of the innervation of sperm storage tubules in the oviduct of the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 121, p. 809 – 814, 2001

FROMAN, D. deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**, New York, v. 69, p. 248-253, 2003.

GAGO, C. et al. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*) using computer-assisted image analysis. **International Journal of Andrology**. Lawrence, v.21, n.3, p.169-176, 1998.

GARRETT, C; BAKER, H. W. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. **Fertility and Sterility**. Birmingham, v.63, n.6, p.1306-1317, 1995.

GERGELY, A. et al. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. **Human Reproduction**. Oxford, v.14, n.8, p.2007-2014, 1999.

GILBERT, A. B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E.S.Z. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1982. p.488-515.

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

GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. **Journal of Andrology**. Lawrence, v.16, n.1, p.88-93, 1995.

GRAVANCE, C.G. et al. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v.108, n.1, p.41-46, 1996.

GRAVANCE, C.G. et al. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v.47, n.1-2, p.149-155, 1997.

GRAVANCE, C.G. et al. Percentage of normal sperm heads is significantly increased by Percoll separation of semen. **International Journal of Andrology**. Lawrence, v.21, n.2, p.116-119, 1998a.

GRAVANCE, C.G. et al. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **International Journal of Andrology**. Lawrence, v.19, n.6, p.704-709, 1998b.

GRAVANCE, C.G. et al. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). **International Journal of Andrology**. Lawrence, v.22, n.2, p.77-82, 1999.

HAMMADEH ME, ZEGINIADOV T, ROSENBAUM P, GEORG T, SCHMIDT W, STREHLER E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Archives of Andrology**, Philadelphia, v.46, n.2, p.99-104, Mar-Apr, 2001.

HARR, R. Characterization of spermatozoa by planar morphometry. **Clinical Laboratory Science**. Washington, v.10, n.4, p.190-196, 1997.

HARRIS, G.C.; BENSON, J.A.; SELLERS, R.S. The influence of daylength, body weight and age on the reproductive ability of broiler breeder cockerels. **Poultry Science**, Savoy, v.63, n.8, p.1705-1710, 1984.

HIGUCHI, H. et al. Application of computer-assisted sperm analysis system to elucidate lack of effects of cyclophosphamide on rat epididymal sperm motion. **Toxicological Sciences**. Orlando, v.26, n.2, p.75-83, 2001.

HIRAI, M. et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **International Journal of Andrology**. Lawrence, v.22, n.1, p.104-110, 2001.

HOLM, L.; RIDDERSTRALE, Y. Development of semen storage tubules in the quail during sexual maturation. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 292, p. 200-205, 2002.

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, 1989. 69p. Dissertação de Mestrado em Patologia. Universidade Federal de Minas Gerais, 1989.

JAGOE, J.R.; WASHBROOK, N.P.; HUDSON, E.A. Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis. **Journal of Clinical Pathology**. London, v.39, n.12, p.1347-1352, 1986.

JECHT, E.W.; RUSSO, J.J. A system for the quantitative analysis of human sperm motility. **Andrologie**. Paris, v.5, n.3, p.215-221, 1973.

KATZ, D.F. et al. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**. Lawrence, v.7, n.4, p.203-210, 1986.

KING, L. M.; BRILLARD, J. P.; BAKST, M. R.; DONOGHUE, A. M. isolation of sperm storage tubules from the uterovaginal junction mucosa of turkey. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, p. 1044-1047, 1999.

KING, L. M.; BRILLARD, J. P.; GARRET, W. M.; BAKST, M. R.; DONOGHUE, A. M. Segregation os spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge v. 123, p. 79 – 83, 2002.

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Comercial Poultry Nutrition**, 2 ed. Guelph, Ontario: University Books. 1997. 342p.

LEITE, M. A. S.; VIVEIROS, A. T. M. Coleta de sêmen e inseminação artificial em galinhas. **Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras**, Lavras, n. 71, p. 1-19, 2006

LEWIN, L.M.; GOLAN, R.; FREIDLIN, P.; SHOCHAT, L. A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Philadelphia, v.124, p.133-137, 1999.

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

LOPES, S.; SUN, J.G.; JURISICOVA, A.; MERIANO, J.; CASPER, R. F. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increases in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and Sterility**, New York, v.69, n.5, p.528-32, 1998.

MACLEOD, I.C.; IRVINE, D.S. The predictive value of computer-assisted analysis in the context of a donor insemination programme. **Human Reproduction**. Oxford, v.10, n.3, p.580-586, 1995.

MAMAJIWALA S. N.; FATH, K. R.; BURGESS, D. R. Development of the chicken intestinal epithelium. **Current Topics in Developmental Biology, Cytoskeleton in Development**, New York, v. 26, p. 123 – 143, 1992.

MARINI, J.P. & GOODMAN, B.L. Semen characteristics as influenced by selection for divergent growth rate in chickens. **Poultry Science**, Savoy, v.48, n.3, p.859-865, 1969.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Berlin, v. 74, p.387-92, 1982.

NAKANO, M.; KASAI, K.; YOSHIDA, K.; TANIMOTO, T.; TAMAKI, Y.; TOBITA, T. Conformation of the fowl protamine, galline, and its binding properties to DNA. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.105, p.133-137, 1989.

NAKANO, M.; TOBITA, T.; ANDO, T. Studies on a protamine (galline) from fowl sperm – 2 – Amino-acid sequences of 2 components of galline. **International Journal of Peptide and Protein Research**, Copenhagen, v.7, p.31-46, 1975.

OGASAWARA, F. X.; LORENZ F. L.; BOBR, L. W. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds. **Journal of Reproduction and fertility**, Cambridge, v.11, p 33-41, 1966.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVENSON, D.P.; PARRISH, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.22, p.595-603, 2001a.

OSTERMEIER, G. C. et al. Measurements of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**. Lawrence, v.22, n.4, p.584-594, 2001b.

RODENAS, C. E. O.; MURGAS, L.D.S.; MACIEL, M.P.; FERRAZ, J.M.; RIBEIRO, M.C.; BERTECHINI, A.G.; FREITAS, R.T.F; FIALHO, E.T. Características seminais de galos alimentados com rações suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 160-167, 2005

SAILER, B. L.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**. New York, v.24, p.167-173, 1996.

SANCHO, M. et al. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. **Theriogenology**. Stoneham, v.50, n.1, p.27-37, 1998

SCHRADER, S.M.; TURNER, T.W.; SIMON, S.D. Longitudinal study of semen quality of unexposed workers: sperm head morphometry. **Journal of Andrology**. Lawrence, v.11, n.1, p.32-39, 1990.

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

SOARES, J. M. ; BELETTI, M. E. . Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, 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) através de microscopia eletrônica de transmissão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, p. 554-560, 2006b.

STEIGERWALD, P.; KRAUSE, W. Estimation of sperm morphology using a new CASA system. **Andrologia**. Berlin, v.30, n.1, p.23-27, 1998.

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

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test the practical evaluation of male fertility by acridine orange (LA) fluorescence. **Fertility and Sterility**, New York, v.42, p.87-91, 1984.

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.

VERKMAN, A. S.; MITRA, A. K. Structure and function of aquaporin water channel. **American Journal of Renal Physiology**, Stanford, v. 278, p. 13-28, 2000.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. Stoneham, v.57, n.1, p.149-179, 2002.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.481-492, 2000

WIJCHMAN, J.G. et al. Variation in semen parameters derived from computer-aided semen analysis, within donors and between donors. **Journal of Andrology**. Lawrence, v.22, n.5, p.773-780, 2001.

WILSON, J. L. Métodos para valorar la capacidad reproductiva en gallos reproductores. **Avicultura Profesional**, v.6, n.3, p. 76-81, 1988.

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.