

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

LUCIANA BEATRIZ TIAGO OLIVEIRA

A suplementação de L-arginina na ração contribui para minimizar alterações
na compactação da cromatina espermática de galos (*Gallus gallus*)

Uberlândia – MG

2022

LUCIANA BEATRIZ TIAGO OLIVEIRA

A suplementação de L-arginina na ração contribui para minimizar alterações na compactação da cromatina espermática de galos (*Gallus gallus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Estrutural e Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia – MG

2022

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

O48s
2022

Oliveira, Luciana Beatriz Tiago, 1977-

A suplementação de L-arginina na ração contribui para minimizar alterações na compactação da cromatina espermática de galos (*Gallus gallus*) [recurso eletrônico] / Luciana Beatriz Tiago Oliveira. - 2022.

Orientador: Marcelo Emilio Beletti.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.6013>

Inclui bibliografia.

I. Biologia. I. Beletti, Marcelo Emilio, 1964-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 573

Rejane Maria da Silva – CRB6/1925



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, número 09/2022, do PPGBC				
Data:	15 de Dezembro de 2022	Hora de início:	9:00	Hora de encerramento:	11:35
Matrícula do Discente:	12012BCE005				
Nome do Discente:	Luciana Beatriz Tiago Oliveira				
Título do Trabalho:	A suplementação de L-arginina na ração contribui para minimizar alterações na compactação da cromatina espermática de galos (<i>Gallus gallus</i>)				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia da Reprodução				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Alterações na cromatina de espermatozoides				

Reuniu-se no Anfiteatro do Bloco 4K, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Elisa Santanna Monteiro da Silva** - UFU; **Ricardo Tomaz da Silva** - UNIPAC; e **Marcelo Emílio Beletti** orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. **Marcelo Emílio Beletti**, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente **Luciana Beatriz Tiago Oliveira** a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Sant'anna Monteiro da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/12/2022, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Tomaz da Silva, Usuário Externo**, em 15/12/2022, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4122684** e o código CRC **983916F3**.

Dedico este trabalho aos meus pais Osvaldo Tiago de Deus e Ivonete Inácio Tiago, pelo carinho e compreensão. Ao meu esposo Lúcio Eduardo Santos Oliveira pelo estímulo e apoio durante toda essa etapa. À minha sobrinha Anna Júlia Santos Tiago e à minha amiga Júlia Araújo de Lima pelo incentivo para recomeçar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela graça e oportunidade para concluir mais uma etapa em minha vida.

Aos meus queridos e amados pais Osvaldo Tiago de Deus e Ivonete Inácio Tiago por todo o amor e carinho durante minha vida.

Ao meu querido e amado esposo Lúcio Eduardo Santos Oliveira por todo amor, incentivo, apoio, amizade e companheirismo nessa etapa.

À minha querida e amada sobrinha Anna Júlia Santos Tiago pelo incentivo para recomeçar.

À minha querida e amada amiga Júlia Araújo de Lima pelo incentivo, pelos conselhos e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti pelo incentivo, motivação, ensinamentos, paciência, apoio, pela oportunidade e por acreditar no meu trabalho. Nunca aprendi tanto em toda a minha vida acadêmica, por isso serei eternamente grata ao senhor.

Ao Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo pela parceria e ajuda essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

À coordenadora da Pós-graduação Prof^a Dra Bellisa de Freitas Barbosa pelos ensinamentos e apoio.

A todos os Professores Doutores da Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pelos ensinamentos e instruções.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios de Histologia e Centro de Microscopia Eletrônica: Rosiane, Mariani, Fabrício, Mário, Laiane.

Aos alunos e colegas do Laboratório de Biologia da Reprodução por toda parceria e trabalho em equipe.

Aos alunos e colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas e Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o curso.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

À todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Vi ainda debaixo do sol que não é dos ligeiros o prêmio, nem dos valentes, a vitória, nem tampouco dos sábios, o pão, nem ainda dos prudentes, a riqueza, nem dos inteligentes, o favor, porém tudo depende do tempo e do acaso”.

(ECLESIASTES 9:11)

RESUMO

A arginina é o principal aminoácido que constitui a protamina espermática dos galos. Esta proteína se complexa com o DNA do espermatozoide, permitindo a alta compactação da cromatina espermática. A suplementação de arginina tem efeitos positivos na qualidade do sêmen em galos envelhecidos. O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação de L-arginina na ração contribuiu para melhorar ou manter a qualidade da cromatina espermática, uma vez que o envelhecimento em galo é geralmente acompanhado de piora da qualidade da cromatina. Foram utilizados quatro diferentes lotes de matrizes da linhagem Ross com 52 semanas de idade, dos quais foram avaliadas seis amostras de sêmen por lote, totalizando 24 amostras. Outras 24 amostras, seis por lote, foram avaliadas após seis semanas de suplementação, quando um lote não foi suplementado (controle) e os outros três foram suplementados com 1,15 kg (tratamento 1), 2,17 kg (tratamento 2) e 3,18 kg (tratamento 3) de L-arginina/tonelada de ração. Para a avaliação dos espermatozoides foi utilizada análise computacional de imagens de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina pH 4,0. A cromatina foi avaliada quanto a heterogeneidade da compactação por meio do coeficiente de variação dos valores de pixel e quanto a intensidade de compactação por meio da descompactação porcentual em relação a cabeças padrões e pela densidade óptica integrada (DOI), que foi utilizada pela primeira vez para identificar alterações cromatínicas espermáticas. Também foi avaliada a morfologia da cabeça dos espermatozoides por meio da área, comprimento e das harmônicas zero, um e dois da transformada de Fourier. Além disso, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis morfológicas e as relacionadas a compactação cromatínica. A DOI, mostrou-se mais eficiente na identificação de alterações na compactação da cromatina espermática que a descompactação porcentual. De maneira geral a compactação da cromatina foi influenciada positivamente pela suplementação com L-arginina, sendo melhor na suplementação com maiores teores deste aminoácido, o que foi corroborado com a menor média das variáveis referentes ao tamanho das cabeças dos espermatozoides dos animais que receberam ração com maior teor de L-arginina. Enfim, a suplementação de arginina foi capaz de manter ou mesmo melhorar a qualidade da cromatina espermática durante o período experimental, mostrando melhores resultados na dosagem de 3,18 kg de L-arginina/tonelada de ração.

Palavras-chave: arginina; suplementação dietética; espermatozoides; galo.

ABSTRACT

Arginine is the main amino acid that constitutes the sperm protamine of cockerels. This protein complexes with sperm DNA allowing high compaction of sperm chromatin. Arginine supplementation has positive effects on semen quality in aged cocks. The objective of this work was to verify whether L-arginine supplementation in the feed contributed to improve or maintain sperm chromatin quality, since aging in roosters is usually accompanied by worsening chromatin quality. Four different lots of 52-week-old Ross strain breeders were used, from which six semen samples per lot were evaluated, totaling 24 samples. Another 24 samples, six per lot, were evaluated after six weeks of supplementation, when one lot was not supplemented (control) and the other three were supplemented with 1.15 kg (treatment 1), 2.17 kg (treatment 2) and 3.18 kg (treatment 3) of L-arginine/ton of ration. Computer image analysis of semen smears stained with toluidine blue pH 4.0 was used to evaluate spermatozoa. Chromatin was evaluated for heterogeneity of compaction by means of the coefficient of variation of pixel values, and for compaction intensity by means of percent decompaction relative to standard heads and by integrated optical density (IOD), which was used for the first time to identify sperm chromatin alterations. Sperm head morphology was also evaluated by means of area, length, and the zero, one, and two harmonics of the Fourier transform. Furthermore, Pearson correlation coefficients were calculated between morphological variables and those related to chromatin compaction. The IOD proved to be more efficient in identifying changes in sperm chromatin compaction than the percentual decompaction. In general, the compaction of the chromatin was positively influenced by the supplementation with L-arginine, being better in the supplementation with higher levels of this amino acid, what was corroborated with the smaller average of the variables referring to size of the spermatozoa heads of the animals that received feed with higher levels of L-arginine. Finally, arginine supplementation was able to maintain or even improve sperm chromatin quality during the experimental period, showing better results at 3.18 kg L-arginine/ton feed.

Keywords: arginine; dietary supplementation; spermatozoa; rooster.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do espermatozoide do tipo sauropsídeo.....	17
Figura 2. Esquema do sistema reprodutor do macho	18
Figura 3. Fases do ciclo epitelial seminífero de <i>Numida meleagris</i> (galinha da Angola).....	20
Figura 4. Fotomicrografia de testículo da codorna japonesa (<i>Coturnix japonica</i>).....	21
Figura 5. Ligação da protamina no sulco menor da fita de DNA e formação dos toroides.....	22
Figura 6. Fotomicrografia de esfregaço de sêmen de galo corado com AT pH 4.0.....	27
Figura 7. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos com relação à descompactação porcentual da cromatina espermática de galos com 52 e 58 semanas.....	32
Figura 8. Diferenças entre as médias na descompactação porcentual da cromatina espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	32
Figura 9. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação à densidade óptica integrada (DOI) da cromatina em espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas	33
Figura 10. Diferenças entre as médias na densidade óptica integrada (DOI) da cromatina antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	34
Figura 11. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação à heterogeneidade da cromatina em espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.....	34
Figura 12. Diferenças entre as médias na heterogeneidade da cromatina antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	35
Figura 13. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação à área da cabeça de espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.....	36
Figura 14. Diferenças entre as médias na área da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	37

Figura 15. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao comprimento da cabeça de espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.....	38
Figura 16. Diferenças entre as médias no comprimento da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	39
Figura 17. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao Fourier zero da cabeça dos espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.....	40
Figura 18. Diferenças entre as médias no Fourier zero da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	40
Figura 19. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao Fourier 1 da cabeça dos espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.....	41
Figura 20. Diferenças entre as médias no Fourier 1 da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	42
Figura 21. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao Fourier 2 da cabeça dos espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.....	43
Figura 22. Diferenças entre as médias no Fourier 2 da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Correlação entre as variáveis relacionadas à compactação da cromatina espermática.....	44
Tabela 2.	Correlação entre as variáveis morfométricas e de compactação da cromatina espermática.....	44
Tabela 3.	Correlação entre as variáveis morfométricas.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Azul de Toluidina
CV	Coefficiente de Variação
DOI	Densidade Óptica Integrada
dUTP	Nucleotídeos
HE	Hematoxilina e Eosina
LPO	Peroxidação Lipídica
PUFAs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SCD	Teste de Dispersão da Cromatina Espermática
SCGE	Eletroforese em Gel de Célula Única
SCSA	Ensaio da Estrutura da Cromatina Espermática
TUNEL	Ensaio de marcação final mediado por Desoxinucleotidil Transferase Terminal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Anatomia e Histofisiologia Sistema Reprodutor masculino de aves.....	17
2.2	Espermatogênese em Aves.....	19
2.3	Alterações na cromatina.....	23
2.4	Suplementação com L-arginina na ração de galos.....	24
2.5	Métodos de avaliação da cromatina espermática.....	25
2.6	Azul de toluidina e análise de imagem computacional.....	27
3	METODOLOGIA	28
3.1	Amostras de sêmen.....	28
3.2	Análise da Cromatina espermática.....	29
3.3	Análise morfométrica de cabeças de espermatozoides.....	30
3.4	Análises estatísticas.....	31
4	RESULTADOS	31
4.1	Análise da Cromatina espermática.....	31
4.2	Análise morfométrica das cabeças de espermatozoides.....	35
4.3	Correlações entre as variáveis morfométricas e de compactação de cromatina.....	44
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A – Tabela nutricional com suplementação de L-arginina.....	58

1 INTRODUÇÃO

Durante a espermiogênese em aves, as histonas são amplamente substituídas por pequenas proteínas ricas em arginina, denominadas protaminas e, ao contrário dos mamíferos, nos galos a protamina não contém resíduos de cisteína apresentando ligações dissulfeto menos estáveis (AUSIÓ; GONZÁLEZ-ROMERO; WOODCOCK, 2014), tornando a compactação da cromatina menos intensa. Seja em aves ou mamíferos, os espermatozoides possuem cromatina altamente organizada e as alterações da cromatina podem interferir no processo de fecundação, principalmente no desenvolvimento embrionário, o que reforça a necessidade de análise da cromatina na avaliação de machos reprodutores (BELETTI, 2013).

As técnicas de pesquisa de fertilidade em galos são pouco exploradas, sendo na maioria das vezes, feitas por amostragem e levando em consideração apenas fatores morfológicos e de motilidade, não sendo avaliada rotineiramente a cromatina espermática (SOARES; BELETTI, 2006).

Vários métodos para identificar alterações na cromatina espermática têm sido testados, sendo o SCSA (ensaio de estrutura da cromatina espermática) o mais frequentemente utilizado para analisar sêmen de galo (SALEHI *et al.*, 2020). O método para avaliar as alterações da cromatina, chamado metacromasia induzida é uma alternativa simples, fácil e de baixo custo.

Originalmente desenvolvido para sêmen de touro, consiste no tratamento ácido de esfregaços de sêmen, seguido por coloração com azul de toluidina. Enquanto os espermatozoides normais são corados de verde a azul claro, aqueles com descompactação de cromatina são geralmente corados de azul escuro a magenta (MELLO, 1982).

Este método foi adaptado para o sêmen de galo, que tem menor compactação de cromatina do que o sêmen de touro, tornando o passo de hidrólise menos intenso ou desnecessário. Assim como em outras espécies, a avaliação visual de diferentes tons de cor tem uma certa subjetividade, o que diminui a precisão e repetibilidade entre avaliadores (SOARES; BELETTI, 2006).

A análise computacional de imagens de esfregaços de sêmen de galo submetidos à metacromasia induzida é uma alternativa para diminuir essa subjetividade e aumentar a repetibilidade (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

Em aves, a protamina presente no núcleo dos espermatozoides é conhecida como *gallina* (NAKANO; TOBITA; ANDO, 1973; NAKANO *et al.* 1989), constituída principalmente por quatro tipos de resíduos de aminoácidos, arginina, serina, tirosina e glicina, sendo a arginina e a serina os dois aminoácidos mais abundantes (CHIVA; KASINSKY; SUBIRANA, 1987).

A L-arginina é um aminoácido importante durante a espermatogênese com um papel fundamental na saúde animal e pode ser usada para melhorar a capacidade reprodutiva de animais em ambientes com altas temperaturas (CHEN *et al.*, 2018). Em aves, onde é considerado um aminoácido essencial, a suplementação de arginina demonstrou ter efeitos positivos na produção de testosterona, qualidade do sêmen e índice de espermatogênese em galos idosos (ABBASPOUR *et al.*, 2019).

A fertilidade dos galos diminui progressivamente após 50 semanas de idade, e eles tendem a ter menores volumes testiculares e de sêmen, menores concentrações de espermatozoides e testosterona plasmática (AVITAL-COHEN *et al.*, 2013), apresentando também maior número de espermatozoides com alterações da cromatina (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

Diante do exposto, levantou-se a hipótese de que a suplementação de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas de idade poderia conter a piora progressiva da compactação da cromatina espermática ou até mesmo melhorá-la. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação com L-arginina na alimentação de galos com mais de 50 semanas de idade contribui para a melhoria da compactação da cromatina espermática, prolongando assim a vida útil dos reprodutores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As aves domésticas possuem diversas características anatômicas e histológicas do sistema reprodutor com adaptações comportamentais e morfológicas desenvolvidas para facilitar sua reprodução em habitats distintos. Em geral, os órgãos genitais das aves são adaptados ao seu modo de reprodução denominado ovoviviparidade, sendo uma característica peculiar importante para a sobrevivência e reprodução destes animais, principalmente para as aves silvestres (MORAIS *et al.*, 2012 a).

A maioria dos machos geralmente apresenta dois testículos intra-abdominais ligeiramente assimétricos, um par de epidídimos e um par de ductos deferentes, sendo desprovidos de glândulas anexas e, geralmente, não possuem órgão copulador. (MORAIS *et al.*, 2012 a).

A reprodução nas aves é um evento fisiológico complexo que envolve diversas interações entre os sistemas neuroendócrino e reprodutor com fatores ambientais, sendo o fotoperíodo considerado o fator ambiental principal que regula a reprodução das aves (MORAIS *et al.*, 2012 b).

Em regiões temperadas, a duração do dia é o fator extrínseco primário responsável por ativar o eixo hipotalâmico hipofisário gonadal e determinar a dinâmica reprodutiva das aves,

estabelecendo um ciclo reprodutivo anual, que se divide em sucessivas fases como sensibilidade, estimulação e refratariedade ao longo do ano. Em regiões áridas e semiáridas, a disponibilidade de alimento e a periodicidade das chuvas são os principais fatores ambientais que determinam a dinâmica reprodutiva das aves (MORAIS *et al.*, 2012 b).

O controle e a sincronização das fases do ciclo reprodutivo das aves são determinados pela ação de hormônios sexuais e não sexuais, sendo a prolactina e o hormônio luteinizante os principais envolvidos neste fenômeno, mediante secreção induzida pela luz (MORAIS *et al.*, 2012 b).

Os espermatozoides das aves são células alongadas e flageladas, com três porções identificadas como cabeça, peça intermediária e cauda. Em aves não passeriformes, como os galos, os espermatozoides (figura 1) são vermiformes, planos e alongados, do tipo sauropsídeo, semelhante aos dos répteis, sendo o comprimento total altamente variável, mesmo entre aves da mesma ordem, como os Galiformes, onde o comprimento varia de 75-90 μm em galos e perus até 100-250 μm em codornas comuns e japonesas. Seus núcleos medem aproximadamente 6-21 μm em comprimento e 0,5 μm em diâmetro, sendo amplamente curvados. No espaço subacrossomal há material eletrondenso que é discretamente organizado, com forma cilíndrica denominado *perforatorium* (BARBEITO; GONZÁLEZ, 2014).

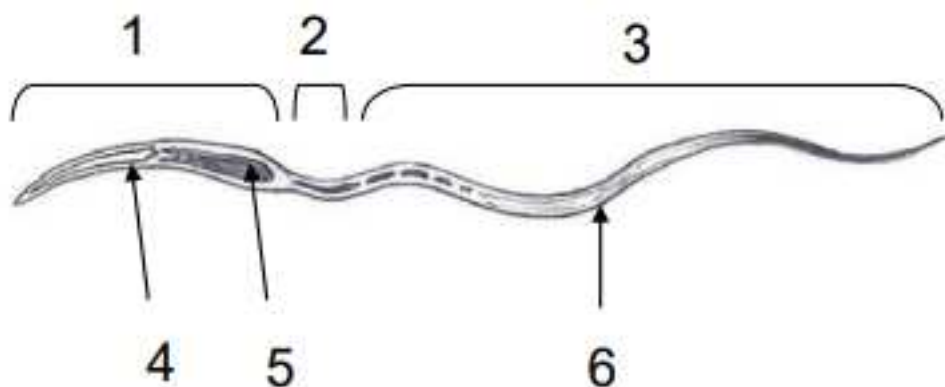


Figura 1. Esquema do espermatozoide do tipo sauropsídeo, mostrando cabeça (1), peça intermediária (2), cauda (3), acrossomo (4), núcleo (5), flagelo (6). Fonte: Histología de las aves (BARBEITO; GONZÁLEZ, 2014, p. 374).

2.1 Anatomia e Histofisiologia do Sistema Reprodutor masculino de aves

Os testículos do galo (figura 2) estão situados na cavidade abdominal, sendo circundados por uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, que é recoberta por um peritônio, não existindo septos bem desenvolvidos para dividir os testículos em lóbulos (BANKS, 1992; BACHA; BACHA, 2011).

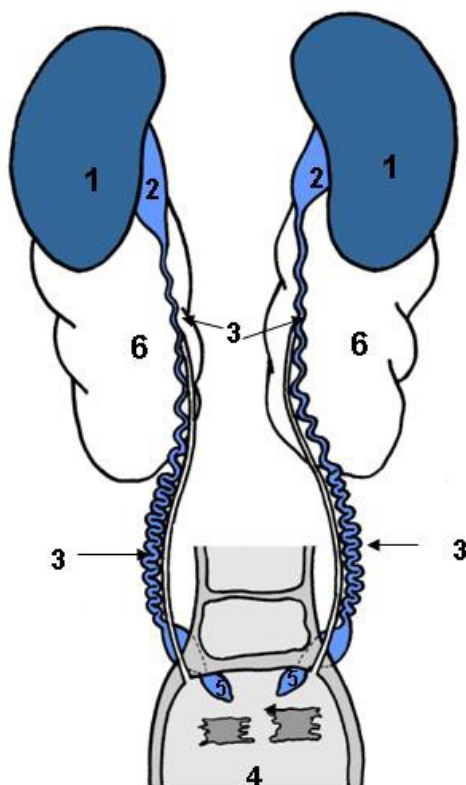


Figura 2. Esquema do sistema reprodutor do macho. Testículos (1), epidídimo (2), ductos deferentes (3), urodeu (4), ductos ejaculatórios (5), rins (6). Fonte: Histología de las aves (BARBEITO; GONZÁLEZ, 2014, p. 367).

Os túbulos seminíferos das aves são anastomosados e rodeados por uma lâmina basal constituída por fibroblastos, células mioepiteliais, e tecido conjuntivo, sendo composto por células de Sertoli e o epitélio seminífero, onde as células germinativas se dividem e diferenciam-se enquanto migram da lâmina basal ao lúmen do túbulo (DEVICHE; HURLEY; FOKIDIS, 2011). As células epiteliais dos túbulos seminíferos são como as dos mamíferos: células de Sertoli, espermatogônia, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides e espermatozoides (JONES; LIN, 1993)..

Ao contrário dos mamíferos, várias associações de células não ocorrem em segmentos ao longo do comprimento dos túbulos seminíferos, sendo o epitélio seminífero organizado em colunas estreitas de células que se submetem à espermatogênese de forma independente. Existe também muito pouco tecido conjuntivo entre os túbulos seminíferos adjacentes que são achatados com células poliédricas, núcleo redondo relativamente grande, citoplasma frequentemente vacuolado e as células intersticiais que são esparsas, apresentando-se isoladamente ou em pequenos grupos, principalmente nos espaços intersticiais maiores (BANKS, 1992; EURELL; FRAPPIER, 2003; BACHA; BACHA, 2011).

Os túbulos seminíferos são contínuos com túbulos retos, que são revestidos por células de Sertoli. Os túbulos retos conduzem aos canais anastomosados da rede testicular, que é revestido por um epitélio simples cuboidal a escamoso. A rede testicular fica fora da túnica albugínea abaixo do epidídimo que apresenta três tipos de túbulos: os ductos eferentes, os ductos conectores e o ducto do epidídimo. Os numerosos ductos eferentes unem a rede testicular aos ductos de conexão. Eles são revestidos por um epitélio simples de grupos intermitentes de células colunares altas e baixas, bem como células que parecem ser pseudoestratificadas (BANKS, 1992; EURELL; FRAPPIER, 2003; BACHA; BACHA, 2011).

As células epiteliais são organizadas em dobras e muitas das células apresentam tufo de cílios. Os ductos de conexão (canais excretórios) são menores em diâmetro do que os outros túbulos do epidídimo e são revestidos por um epitélio colunar pseudoestratificado. As células epiteliais raramente são ciliadas e não estão dispostas em numerosas dobras, como as células que revestem os ductos eferentes. Assim, a superfície luminal dos ductos de conexão tem uma aparência lisa. O ducto único do epidídimo é semelhante em estrutura aos ductos de conexão, exceto pelo fato de ser muito maior em diâmetro. Todos os túbulos do epidídimo são rodeados e ligados por tecido conjuntivo (BANKS, 1992; EURELL; FRAPPIER, 2003; BACHA; BACHA, 2011).

O ducto do epidídimo se junta aos canais deferentes na porção terminal do epidídimo, sendo o último um ducto com epitélio colunar pseudoestratificado, músculo liso subjacente e uma camada mais periférica de tecido conjuntivo denso. Cada canal deferente se funde com um pequeno ducto ejaculatório cônico, cuja submucosa contém tecido erétil. O ducto ejaculatório se projeta e se abre para o urodeu da cloaca, marcando a terminação do sistema de ductos do macho (BANKS, 1992; EURELL; FRAPPIER, 2003; BACHA; BACHA, 2011).

2.2 Espermatogênese em Aves

Os espermatozoides de aves não passeriformes são filiformes, com a superfície plana e alongada. O núcleo possui forma cilíndrica, longa e reta ou ligeiramente curva, sendo coberto anteriormente por um acrossoma cônico. Além disso, um perfuratório está presente na cavidade do acrossoma, no espaço subacrossomal, e no canal endonuclear (VIEIRA; COLLI; BÃO, 2004; GRIBBINS, 2011).

A espermatogênese nas aves (figura 3), assim como nos mamíferos, é definida pela formação de espermatozoides maduros a partir da espermatogônia, incluindo três fases sequenciais denominadas espermatocitogênese, espermatidogênese e espermiogênese (DEVICHE; HURLEY; FOKIDIS, 2011).

Durante a espermatocitogênese, uma espermatogônia tipo A sofre mitose para gerar uma nova célula germinativa e uma espermatogônia intermediária (I), que se divide ainda em duas células filhas. Cada espermatogônia do tipo I divide-se em duas espermatogônias B, que se dividem cada uma delas em dois espermatócitos primários. Os espermatócitos primários realizam duas divisões meióticas, dando origem a espermatócitos secundários, que se dividem em espermátides, sendo essa etapa da espermatogênese denominada espermatidogênese (ABDUL-RAHMAN; OBESE; ROBINSON, 2016).

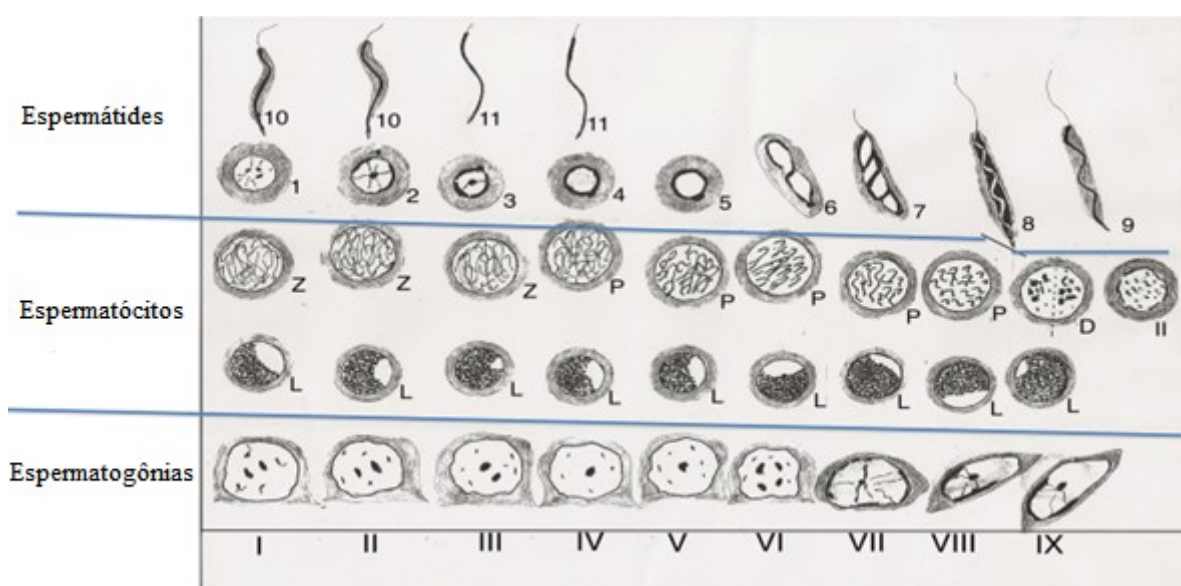


Figura 3. Fases do ciclo epitelial seminífero de *Numida meleagris* (galinha da Angola). Os numerais romanos indicam as fases do ciclo, enquanto os algarismos arábicos indicam os passos do desenvolvimento da espermátide. A espermatogônia não foi especificada como A, B, ou intermediária nas várias fases porque as três estão invariavelmente presentes em todas as fases do ciclo. L: espermatócito de leptóteno; Z: espermatócito de zigóteno; P: espermatócito de paquíteno; D: espermatócito de diplóteno na divisão meiótica; II: espermatócito secundário. Fonte: Adaptado de Spermatogenesis and cellular associations in the seminiferous epithelium of Guinea cock (*Numida meleagris*) (ABDUL-RAHMAN; OBESE; ROBINSON, 2016, p. 245).

Em aves, a espermatogênese ocorre através da sincronização das atividades das células germinativas dentro do túbulo seminífero, que possui um epitélio estratificado com células germinativas em vários estágios de divisão meiótica e morfogênese. Após a produção de uma nova espermatogônia a partir de uma célula germinativa, todas as divisões celulares subsequentes são incompletas, de maneira que cada geração de células germinativas forma um clone em que todos os membros são unidos por pontes de citoplasma, formando um sincício até o momento que os espermatozoides são libertados do epitélio seminífero. Cada clone está associado a um grupo de células de Sertoli que regulam o desenvolvimento de mais de quatro gerações sucessivas à medida que migram do lado basal para o lado luminal do epitélio seminífero (JONES; LIN, 1993).

A segunda e última divisão meiótica do espermatócito secundário origina células germinativas haploides, denominadas espermátides redondas. A espermátide passa por um dos mais complexos processos morfológicos com mudanças na diferenciação celular, podendo ser visualizadas em vários níveis, dependendo da fase da espermiogênese (figura 4) . Dentro do epitélio, as espermátides são geralmente de forma arredondada e localização adluminal, movimentos das espermátides no epitélio seminífero são provocadas pelas células de Sertoli, que são as únicas células somáticas, células não germinativas, encontradas no epitélio seminífero (AIRE, 2014).

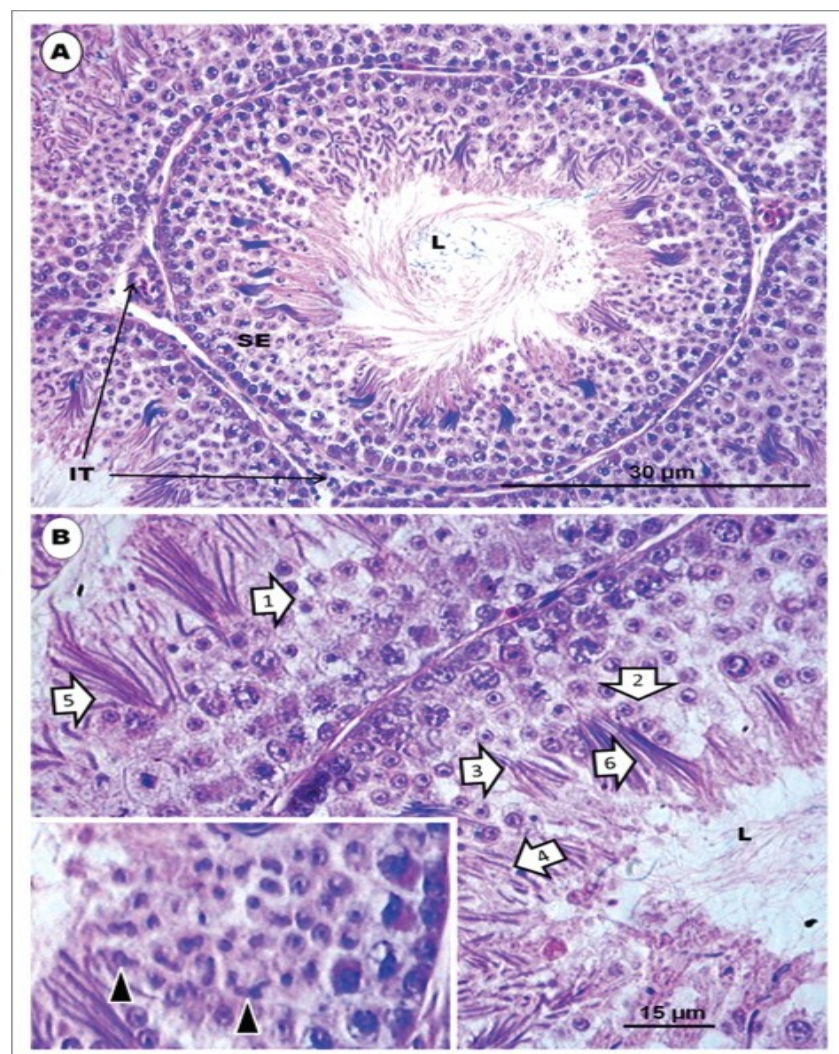


Figura 4. Fotomicrografia de testículo da codorna japonesa (*Coturnix japonica*). (A) representa uma seção histológica corada com hematoxilina e eosina (HE) de uma seção transversal de um túbulo seminífero circundado por tecido intertubular em um testículo sexualmente maduro e ativo da codorna japonesa. L = lúmen. (B) representa uma visão em maior escala do epitélio seminífero, que apresenta várias espermátides e células germinativas. O epitélio mostra várias espermátides [1 a 6] em várias etapas da espermiogênese, pertencentes a várias associações celulares, mas situadas bastante próximas umas das outras ou parecendo mistas, em alguns casos. A inserção mostra espermátides alongadas de formato irregular. L = lúmen. Fonte Spermiogenesis in birds (AIRE, 2014, p.3).

A espermiogênese envolve a inclusão seletiva de certos constituintes celulares da espermatíde que são necessários para sua subsequente diferenciação em um espermatozoide funcional como ribossomos em uma gotícula citoplasmática denominada corpo residual no momento em que as espermatídes se alinham na superfície luminal do túbulo seminífero. Finalmente ocorre a espermição com espermatozoides maduros liberados no lúmen (NISHIMURA; L'HERNAULT, 2017).

A transformação das espermatídes redondas em espermatozoides, processo denominado espermiogênese, é acompanhada pela substituição de histonas por protaminas (figura 5), levando a uma cromatina altamente compactada com o término da transcrição em espermatozoides maduros (MEZQUITA; TENG, 1977; OLIVA; DIXON, 1991). As protaminas são pequenas proteínas nucleares ricas em arginina que substituem as histonas para atingir um alto nível de compactação da cromatina (BIZZARO *et al.*, 1998).

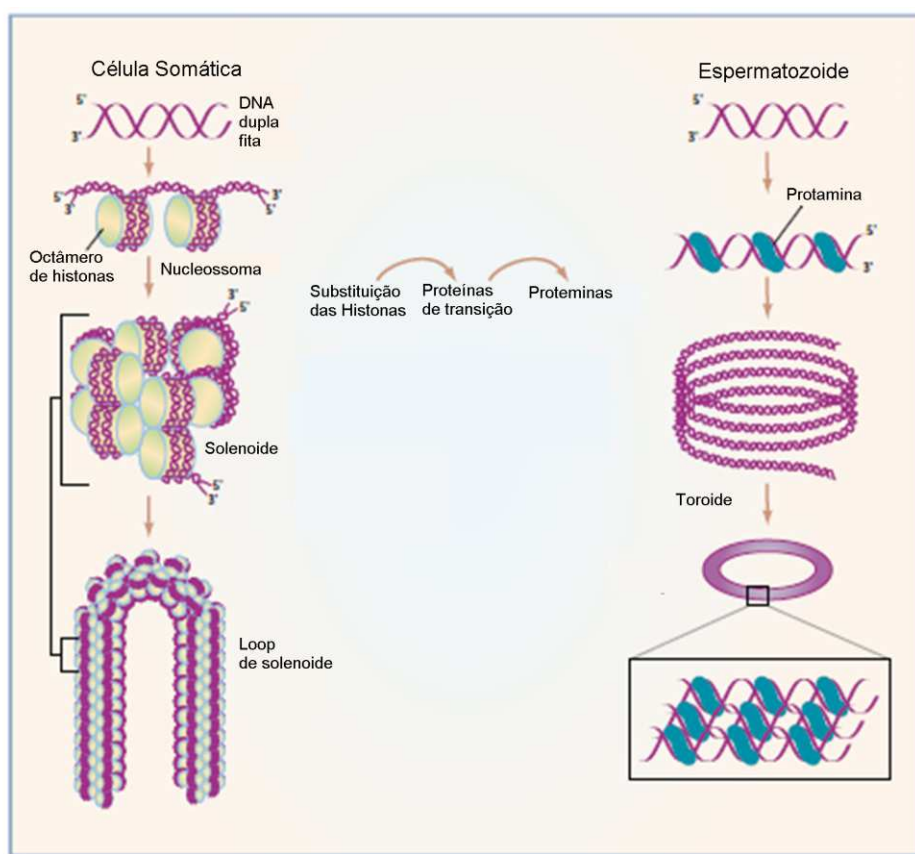


Figura 5. Ligação da protamina no sulco menor da fita de DNA e formação dos toroides. Fonte: Adaptado de Packaging paternal chromosomes with protamine (BRAUN, 2001, p. 2).

A condensação dos núcleos espermáticos ocorre devido a interação eletrostática entre os abundantes resíduos de arginina presentes nas protaminas e os grupos aniônicos do DNA. Esta interação foi proposta (CHIVA; KASINSKY; SUBIRANA, 1987) para ser regulada *in*

vivo através de modificações pós-transcricionais reversíveis, como fosforilação enzimática e desfosforilação de resíduos de serina (LOUIE; DIXON, 1972). No entanto, a protamina *gallina* relatada em galos carece de cisteína (OLIVA; MEZQUITA, 1986; RHIM *et al.*, 1995; AUSIÓ; GONZÁLEZ-ROMERO; WOODCOCK, 2014).

Foi proposto que após a fosforilação, os resíduos de serina e treonina da protamina de galos poderiam formar ligações eletrostáticas e, portanto, funcionar como ligações dissulfeto (CHIVA; KASINSKY; SUBIRANA, 1987). O curto epidídimo aviário e a rápida migração espermática através dele (WISHART; HORROCKS, 2000), juntamente com a falta de cisteína na protamina aviária sugerem um processo de compactação da cromatina mais limitado.

2.3 Alterações na cromatina

Danos à cromatina é um termo abrangente usado para qualquer defeito na estrutura do DNA. Esses defeitos incluem quebras de fita simples ou dupla de DNA, deleção ou modificação de base, reticulação intercadeia ou intracadeia de DNA e deficiência de protamina e/ou empacotamento incorreto via DNA-proteína defeituosa, podendo ocorrer durante a espermatogênese, a espermiogênese, o trânsito epididimal ou pós-ejaculação (ESTEVEZ *et al.*, 2020).

A maturação da cromatina espermática pós-testicular depende de processos oxidativos. À medida que desce para o túbulo epididimal, a cromatina espermática empacotada em toroides de protaminas é ainda mais condensada por eventos de pontes dissulfeto através da atividade de uma enzima contida no núcleo do esperma, uma variante da glutathione peroxidase 4, snGPx4 no caso de camundongos, e provavelmente peroxirredoxinas no caso de espermatozoides humanos. Regiões de cromatina ainda organizadas como nucleossomos, isto é, associadas a histonas, ou seja, os grandes solenoides e os pequenos ligantes de DNA anexados a toroides adjacentes, são regiões de menor compactação nuclear que se mostraram suscetíveis ao ataque oxidativo (DREVET *et al.*, 2022).

As membranas das células espermáticas aviárias têm uma concentração muito maior de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) do que as células espermáticas de mamíferos e, portanto, são mais suscetíveis à peroxidação lipídica (LPO) na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FUJIHARA; HOWARTH, 1978). Espécies reativas de oxigênio são moléculas reativas produzidas durante a redução de oxigênio que podem deteriorar a função e a viabilidade dos espermatozoides, se produzidas em concentrações superiores às ideais (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989).

A produção de ROS fisiológica em espermatozoides regula características funcionais essenciais, como motilidade, capacitação, reação acrossômica, hiperativação e fusão do espermatozoide com o ovócito. ROS pode ter efeitos prejudiciais sobre função do espermatozoide através da peroxidação lipídica, danos às proteínas e quebra da fita de DNA, que pode eventualmente afetar a fertilidade do macho (GUALTIERI *et al.*, 2021).

2.4 Suplementação com L-arginina na ração de galos

Além do aumento de peso com a idade, a atrofia testicular e o comprometimento da produção de espermatozoides parecem ser as principais razões para a diminuição da fertilidade do galo às 50 semanas de idade (LAGARES *et al.*, 2016), porém a dieta com suplementação de arginina de 0,68% demonstrou efeitos positivos sobre a testosterona no sangue, qualidade do sêmen e índice de espermatogênese de galos adultos (ABBASPOUR *et al.*, 2019).

A L-arginina, um aminoácido básico, é importante para os galos porque eles, como outras aves, não conseguem obter arginina de fontes endógenas, pois carecem de quase todas as enzimas envolvidas no ciclo da ureia (TAMIR; RATNER, 1963). L-arginina é um substrato para a biossíntese de muitas moléculas, incluindo proteínas, óxido nítrico, creatina, ornitina, glutamato, poliaminas, prolina, glutamina, agmatina e dimetil arginina, sendo necessária a várias funções biológicas e fisiológicas importantes em aves (KHAJALI; WIDEMAN, 2010).

Ahangar *et al.* (2017) demonstraram que a L-Arginina dietética de 2,33 g/kg melhorou o peso dos testículos, o volume do sêmen e a motilidade do espermatozoide em galos, apresentando maior número de células de Sertoli e espermatogônias e aumento no diâmetro dos túbulos seminíferos.

A arginina é um dos aminoácidos mais versáteis nas células animais, servindo como precursor para a síntese não só de proteínas, mas também de óxido nítrico, uréia, poliaminas, prolina, glutamato, creatina e agmatina. Das enzimas que catalisam as etapas de controle da taxa na síntese e no catabolismo da arginina, a argininosuccinato sintase, as duas isoenzimas da arginase, as três isoenzimas da sintase do óxido nítrico e a arginina descarboxilase foram reconhecidas nos últimos anos como fatores-chave na regulação de aspectos recém identificados do metabolismo da arginina. Em particular, alterações nas atividades da argininosuccinato sintase, das arginases, da isoenzima induzível da sintase do óxido nítrico e dos transportadores de aminoácidos catiônicos desempenham papéis importantes na determinação dos destinos metabólicos da arginina (WU; MORRIS, 1998).

A L-arginina é um aminoácido nutricionalmente essencial para a espermatogênese e desempenha diferentes papéis na saúde animal, sendo utilizada como um potencial agente para

melhorar o desempenho reprodutivo de javalis sob alta temperatura ambiente (CHEN *et al.*, 2018).

A arginina é também precursora para a biossíntese de moléculas essenciais, proteínas, óxido nítrico, glutamato, glutamina e creatina, necessários para o crescimento, imunidade e resistência a doenças de frangos de corte. A adição de arginina à ração pode maximizar a eficiência alimentar e a agregação de proteína, diminuindo adicionalmente a obesidade e melhorando a saúde geral das aves (MIRI *et al.* 2021; OMIDI *et al.* 2019).

2.5 Métodos de avaliação da cromatina espermática

Uma variedade de ensaios foi desenvolvida para medir os danos no DNA do esperma. Esses ensaios podem ser amplamente categorizados em dois tipos. A primeira categoria inclui ensaios em que a fragmentação do DNA é medida diretamente pela incorporação de sondas no local do dano, que detectam quebras reais na cadeia de DNA. Os sinais dessas sondas quantificam a fragmentação do DNA no esperma. O ensaio de marcação final mediado por desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL) pertence a esta categoria e quantifica a incorporação de dUTP biotinilado em quebras de fita dupla no DNA usando uma reação catalisada por desoxinucleotidil transferase terminal independente de molde, podendo ser aplicado em microscopia de campo claro e de fluorescência, e também usando citometria de fluxo. (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011).

A segunda categoria inclui ensaios que utilizam a propriedade do DNA fragmentado para facilitar a desnaturação sob certas condições. Como o DNA fragmentado desnatura mais facilmente do que o DNA de fita dupla, essa abordagem mede a suscetibilidade do DNA à desnaturação, ou seja, a formação de DNA de fita simples a partir do DNA de fita dupla nativo. O teste de dispersão da cromatina espermática (SCD), eletroforese em gel de célula única (SCGE) ou ensaio cometa (GLIOZZI; ZANIBONI; CEROLINI, 2011), ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA), coloração com laranja de acridina são alguns exemplos, onde a cromatina é submetida a tratamento de desnaturação e, em seguida, o dano ao DNA é quantificado (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011).

No ensaio da estrutura da cromatina do esperma (SCSA) é usado o citômetro de fluxo e coloração com laranja de acridina. Ambos os testes SCSA e laranja de acridina medem a suscetibilidade do DNA nuclear do esperma à transição conformacional induzida por ácido *in situ*, quantificando a mudança metacromática da fluorescência do laranja de acridina de verde (DNA nativo) para vermelho (DNA desnaturado ou relaxado). O laranja de acridina é um

corante catiônico fluorescente específico para ácidos nucleicos. Ele interage com o DNA por intercalação e por interação eletrostática com o RNA ou DNA de fita simples (SALEHI *et al.*, 2020; BLANK *et al.*, 2021).

O ensaio com laranja de acridina se baseia no tratamento com ácido suave que desnatura o DNA que possui quebras de fita simples ou dupla. O laranja de acridina se liga ao DNA não desnaturado para produzir fluorescência verde, enquanto a ligação do laranja de acridina a regiões de DNA de fita simples ou quebras de DNA produz fluorescência vermelha. O parâmetro medido é o número de células com fluorescência vermelha, que é uma aproximação do espermatozoide com DNA danificado na amostra (EVENSON; LARSON; JOST, 2002).

A coloração heterogênea da lâmina e a perda da cor logo após a coloração são desvantagens da técnica. Outras desvantagens são as cores indistintas, ou seja, uma série de cores intermediárias entre vermelho e verde que se relacionam com uma sensibilidade diferencial à desnaturação espermática. Variações entre laboratórios e falta de reprodutibilidade também estão associadas a este ensaio (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011).

Em comparação com a contagem visual de células vermelhas e verdes no teste laranja de acridina, no SCSA a fluorescência vermelho-verde é detectada usando um citômetro de fluxo. Embora a técnica tenha alta robustez estatística e reprodutibilidade inter e intralaboratorial, o ensaio requer um citômetro de fluxo e um software eficientes (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011).

O azul de anilina é um corante ácido que apresenta maior afinidade por proteínas da cromatina frouxa do núcleo espermático. Isso se deve à presença das histonas residuais e ao aumento da acessibilidade dos grupos básicos da nucleoproteína. O aumento da coloração azul de anilina do espermatozoide indica cromatina frouxa. A técnica é simples, econômica e requer um microscópio de campo claro para a análise. Embora os resultados da coloração com azul de anilina se correlacionem bem com o teste laranja de acridina, a coloração heterogênea da lâmina é uma desvantagem importante dessa técnica (ERENPREISS *et al.*, 2001).

No teste de dispersão da cromatina espermática (SCD), os espermatozoides embebidos em agarose são tratados com uma solução ácida desnaturante ou solução alcalina para remover as proteínas nucleares e gerar DNA com fita simples a partir dos cortes. Os espermatozoides são então submetidos à lise. O espermatozoide com DNA intacto produz um halo característico, enquanto no espermatozoide com DNA fragmentado o halo não é observado ou é mínimo (SHANMUGAM *et al.*, 2014; JOHNSTON *et al.*, 2020).

2.6 Azul de toluidina e análise de imagem computacional

A metacromasia induzida, que utiliza o corante catiônico azul de toluidina (AT), é um método simples e eficaz, criado por Mello (1982). As células espermáticas que se encontram com a cromatina compactada, se coram de verde a azul claro. Já nas células com cromatina descompactada, o corante se liga aos grupos fosfatos ionizados do DNA, levando a ressonância de elétrons entre as moléculas de AT, resultando em uma coloração de azul escuro a magenta.

A coloração de esfregaços de sêmen com o azul de toluidina (figura 6) é uma alternativa para avaliar a cromatina espermática de galos, sendo necessário que a solução esteja em pH 4.0 porque somente os radicais fosfatos estarão ionizados, prevenindo a ligação do corante a outros ânions. Como no espermatozoide os fosfatos estão quase que exclusivamente no DNA, a coloração se torna um marcador específico para esta molécula (SOARES; BELETTI, 2006).



Figura 6. Fotomicrografia de esfregaço de sêmen de galo corado com AT pH 4.0, onde é possível visualizar sete cabeças de espermatozoides. Fonte: Autoria própria.

Entretanto, a avaliação visual de esfregaços de sêmen é subjetiva com baixa repetibilidade entre os avaliadores. Para minimizar essa subjetividade, Rodrigues, Rocha e Beletti (2009) desenvolveram um algoritmo para a avaliação de imagens digitais de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina para avaliar a cromatina espermática em galos.

Este algoritmo compara a cor das cabeças padrão altamente compactadas e homogêneas com cada uma das cabeças analisadas. A diferença entre o valor médio dos pixels das cabeças padrão e o valor médio de cada cabeça é calculado e transformado em uma porcentagem do valor médio das cabeças padrão. Assim, é determinada a porcentagem de descompactação para cada cabeça. O mesmo algoritmo calcula também o coeficiente de variação dos valores de pixels para cada cabeça e é utilizado como variável que quantifica a heterogeneidade da cromatina (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

Além disso, a densidade óptica integrada (DOI) é um parâmetro que pode ser usado para a avaliação da compactação da cromatina. A densidade óptica (DO) é definida como o logaritmo com base 10 da relação entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz transmitida, ou seja, é a absorbância (BOSCHI *et al.* 2019). A DOI reflete a quantidade de corante azul de toluidina ligado ao DNA (RODRIGUES *et al.*, 2014), que está diretamente relacionado à compactação da cromatina.

As amplitudes das harmônicas da função de Fourier foram inicialmente sugeridas como descritor da forma da cabeça do espermatozoide de touro (OSTERMEIER *et al.* 2001) e posteriormente foram utilizadas para outras espécies de mamíferos (THURSTON *et al.* 2001; SEVERA *et al.* 2010; KANAYAMA; BELETTI, 2011).

A harmônica zero está mais relacionada com o tamanho da cabeça do espermatozoide, a harmônica 1 com a forma arredondada da porção anterior da cabeça, e a harmônica 2 está mais relacionada com o alongamento da cabeça (Lucio *et al.* 2016).

3 METODOLOGIA

3.1 Amostras de sêmen

As amostras de sêmen dos galos (71/2022/CEUA/PROPP/REITO) foram disponibilizadas pela parceria com a JEB Agropecuária Instituto de Biociências. Foram utilizadas amostras de sêmen de galos da linhagem Ross, de quatro lotes com 52 e 58 semanas de idade, quando a eclodibilidade dos ovos produzidos estava em decréscimo.

Nesta fase, com intuito de melhorar a qualidade do sêmen, os galos de cada lote passaram a receber rações com diferentes níveis de suplementação de arginina.

Um lote (controle) continuou recebendo a mesma ração (Composição nutricional das dietas de cada tratamento - anexo A) que já vinha sendo utilizada; outro lote (tratamento 1) passou a receber essa ração suplementada com 1,15 kg de L-arginina 98,5% por tonelada; outro lote (tratamento 2) passou a receber a mesma ração suplementada com 2,17 kg de L-arginina

98,5% por tonelada e o último lote (tratamento 3) passou a receber a mesma ração suplementada com 3,18 kg de L-arginina 98,5% por tonelada.

Após análises realizadas pela empresa foi verificado que a ração do grupo controle possuía 0,6956% de arginina e 0,6079% de arginina aproveitável pelas aves. Já o tratamento 1 possuía 0,7904% de arginina e 0,6997% de arginina aproveitável, o tratamento 2 possuía 0,8905% de arginina e 0,7998% de arginina aproveitável e o tratamento 3 possuía 0,9921% de arginina e 0,9011% de arginina aproveitável pelas aves.

Independente de nosso trabalho, a empresa parceira tem como rotina coletar aleatoriamente sêmen de seis galos por lote para averiguar a qualidade do sêmen de forma objetiva levando em consideração o volume e motilidade dos espermatozoides.

O presente trabalho aproveitou as seis amostras de cada lote coletadas no dia do início dos tratamentos e outras seis amostras, 6 semanas após, quando o lote estava com 58 semanas. Após as análises de rotina da empresa, uma gota de sêmen de cada galo avaliado foi colocada em um microtubo contendo 1,5 ml de formol salina (SOARES; BELETTI, 2006) e enviada ao laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), para as análises da cromatina. Portanto, foram utilizadas 48 amostras de sêmen de galos, coletadas por massagem cloacal, de acordo com a técnica descrita por WILSON (1988).

3.2 Análise da Cromatina espermática

As avaliações da cromatina espermática foram realizadas por análise computacional de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina. Para tal, foi utilizada uma gota de formol salina com sêmen para obter esfregaços. Logo após, os esfregaços foram secos à temperatura ambiente, e três gotas de azul de toluidina (Sigma-Aldrich, CI52040) 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato) pH 4.0 foram colocadas sobre o esfregaço. Posteriormente, foi colocada uma lamínula sobre a lâmina, e o excesso de corante foi removido com papel filtro. Três minutos mais tarde, uma média de 100 imagens digitais de cada esfregaço foi capturada utilizando um microscópio Olympus BX51 com uma câmera Olympus DP70 ligada a um microcomputador PC pelo sistema de captura DP Controller.

As imagens foram capturadas aleatoriamente movendo-se a lâmina de um lado para o outro ao longo de toda a sua extensão utilizando uma objetiva de 100x com óleo de imersão e uma lente intermediária (optovar 2x). Logo após as capturas, as imagens foram todas

selecionadas visualmente para evitar segmentação de possíveis artefatos presentes nas imagens obtidas das lâminas.

Posteriormente, utilizando um sistema desenvolvido em ambiente de programação Octave®, a segmentação das cabeças dos espermatozoides foi realizada por limiarização baseada em um histograma de intensidade, o que permitiu a identificação da maioria das cabeças na imagem. No processo de segmentação, as imagens foram também submetidas a uma fase em que foi realizada a conversão em escala de cinza e suavização gaussiana (sigma 1.0) (BACKES; TRAVENCOLO; ESCARPINATI, 2016).

Após a segmentação das cabeças, as mesmas foram avaliadas por um programa desenvolvido em ambiente de programação Scilab®, onde foi obtido o valor médio de pixel de cada cabeça. Para referenciar a coloração normal das cabeças de espermatozoides, as 10 cabeças mais claras e de cor mais homogênea foram automaticamente selecionadas em cada esfregaço.

A média dos valores dos pixels destas cabeças foi tomada como valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças padrão) no respectivo esfregaço. Em seguida, foram determinadas as diferenças entre os valores médios das cabeças normais e a média dos valores de pixels de cada cabeça analisada.

Esta diferença foi transformada em porcentagem do valor das cabeças padrão do esfregaço a partir do qual a cabeça foi segmentada, que foi utilizado para caracterizar a descompactação normalizada de cada cabeça.

O coeficiente de variação (CV) dos níveis de cinza (valores de pixel) de cada cabeça foi também calculado para caracterizar a heterogeneidade da cromatina dentro de cada cabeça (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

Além disso, para caracterizar a compactação da cromatina, o programa Scilab® calculou a densidade óptica integrada de cada cabeça (RODRIGUES *et al.*, 2014). DOI é a soma da densidade óptica (DO) de cada pixel que compõe a cabeça do espermatozoide. A densidade óptica (DO) é definida como o logaritmo com base 10 da relação entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz transmitida, ou seja, é a absorbância (BOSCHI *et al.*, 2019).

3.3 Análise morfométrica das cabeças de espermatozoides

O programa Scilab® também calculou a área das cabeças em pixels, converteu em μm^2 e calculou o zero, um e dois das amplitudes harmônicas da função de Fourier como descritor

da forma das cabeças dos espermatozoides (OSTERMEIER *et al.*, 2001, BELETTI; COSTA; VIANA, 2005).

Considerando que a cabeça do espermatozoide de galo tem eventualmente uma forma curva, o programa aplicou um algoritmo de comprimento do esqueleto baseado em morfologia matemática, que permitiu estimar o comprimento das cabeças, independentemente da sua forma (FALCÃO; COSTA; DA CUNHA, 2002).

3.4 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Inicialmente, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam uma distribuição normal. Depois de confirmar a normalidade dos dados, foi realizado o teste ANOVA unidirecional e o teste t não pareado como pós-teste para avaliar se a suplementação de L-arginina na ração influenciou as variáveis analisadas.

Além disso, foram calculados coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis relativas ao tamanho e forma da cabeça (área, comprimento, Fourier 0, Fourier 1 e Fourier 2) e compactação da cromatina (descompactação porcentual, densidade óptica integrada, heterogeneidade).

4 RESULTADOS

4.1 Análise da Cromatina espermática

A avaliação estatística mostrou que houve diferença significativa entre os três tratamentos relativos à descompactação porcentual da cromatina ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$) (figura 7), inclusive no grupo controle, porém com menor intensidade ($p \leq 0,05$).

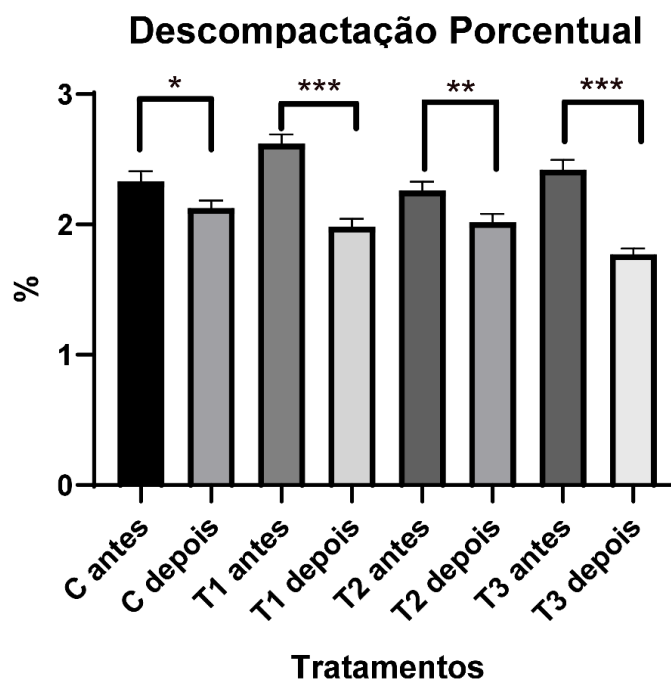


Figura 7. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos com relação à descompactação porcentual da cromatina espermática de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A figura 8 mostra que não houve uma tendência clara relativamente à diferença na compactação percentual da cromatina espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina e que, em geral, não houve aumento da descompactação em nenhum dos tratamentos.

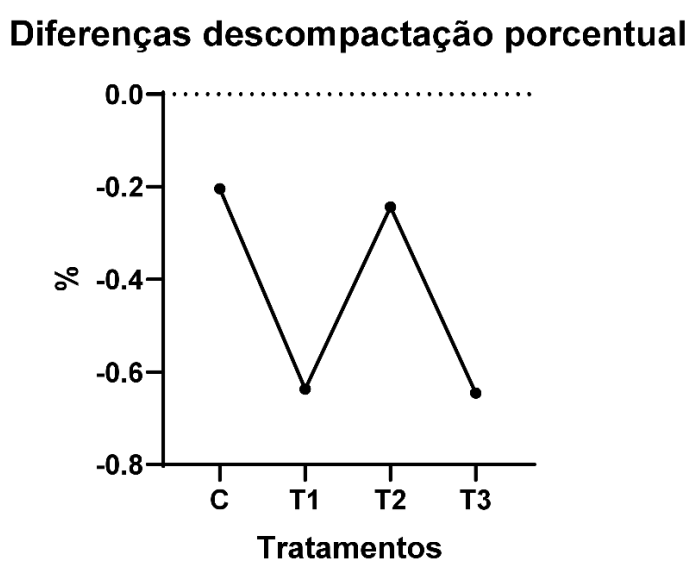


Figura 8. Diferenças entre as médias na descompactação porcentual da cromatina espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

Em relação à densidade óptica integrada (DOI), observou-se que no grupo controle (C), houve uma tendência para aumentar ($p \leq 0,001$) durante o período experimental, o que significa uma maior descompactação da cromatina. Com relação aos tratamentos 1 e 2, foram observadas diferenças na DOI quando comparados antes e depois do tratamento com tendência a aumentar a descompactação da cromatina após os tratamentos (figura 9), porém no tratamento 3, houve uma tendência a estabilizar a descompactação da cromatina.

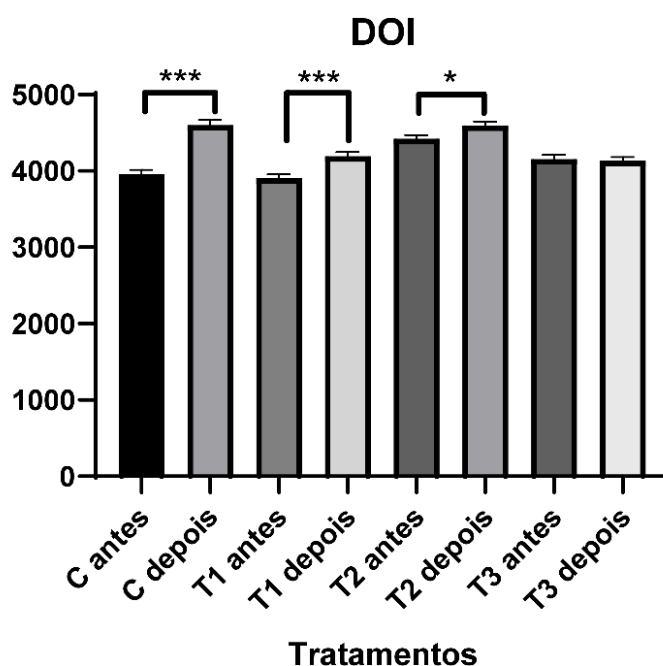


Figura 9. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação à densidade óptica integrada (DOI) da cromatina em espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Apesar de serem observadas diferenças, em todos os tratamentos, inclusive no grupo controle, a DOI não apresentou aumento significativo após o tratamento 3. Contudo, verificou-se que a diferença entre antes e depois dos tratamentos tende a ser menor com doses crescentes de suplementação de arginina na ração (figura 10).

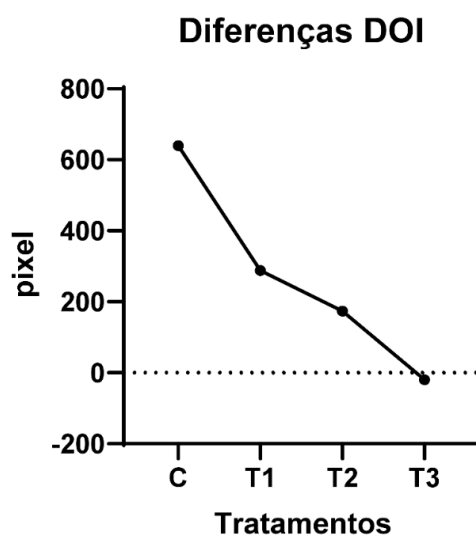


Figura 10. Diferenças entre as médias na densidade óptica integrada (DOI) da cromatina antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

As análises estatísticas não mostraram diferenças entre antes e depois do tratamento em todos os grupos, inclusive no controle, no que diz respeito à heterogeneidade da cromatina espermática (figura 11).

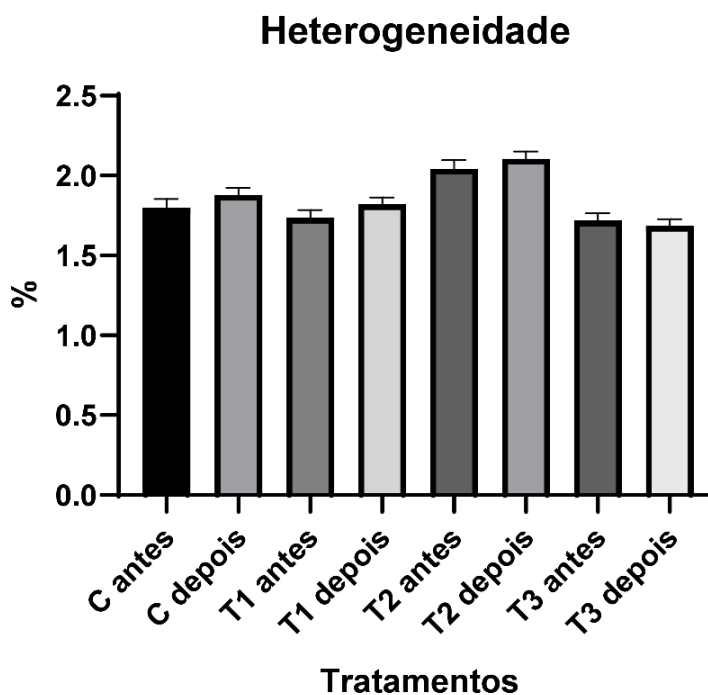


Figura 11. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação à heterogeneidade da cromatina em espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas.

Contudo, à semelhança do que foi observado na DOI, verificou-se que a diferença antes e depois do tratamento tende a ser menor com doses crescentes de suplementação de arginina na ração (figura 12).

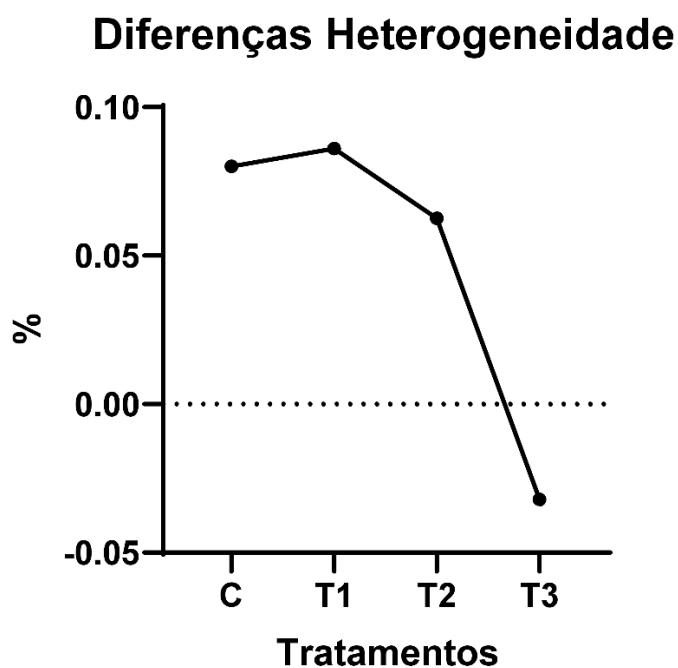


Figura 12. Diferenças entre as médias na heterogeneidade da cromatina antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

4.2 Análise morfométrica das cabeças de espermatozoides

A avaliação estatística mostrou uma diferença entre a área das cabeças de espermatozoide antes e depois dos tratamentos 1 ($p \leq 0,001$) e 3 ($p \leq 0,05$), o que não foi

observado no tratamento 2 (figura 13). O grupo controle apresentou aumento significativo ($p \leq 0,001$) da área das cabeças dos espermatozoides de galos com 58 semanas de idade.

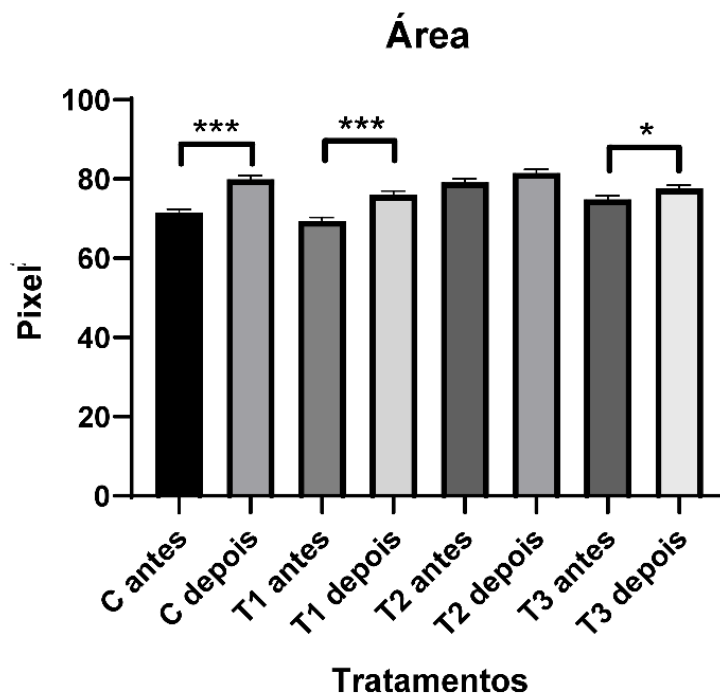


Figura 13. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação à área da cabeça de espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Em todos os tratamentos, o valor nominal da área foi mais elevado após o tratamento, inclusive no grupo controle, e houve uma tendência para esta diferença diminuir até ao tratamento 2 (figura 14).

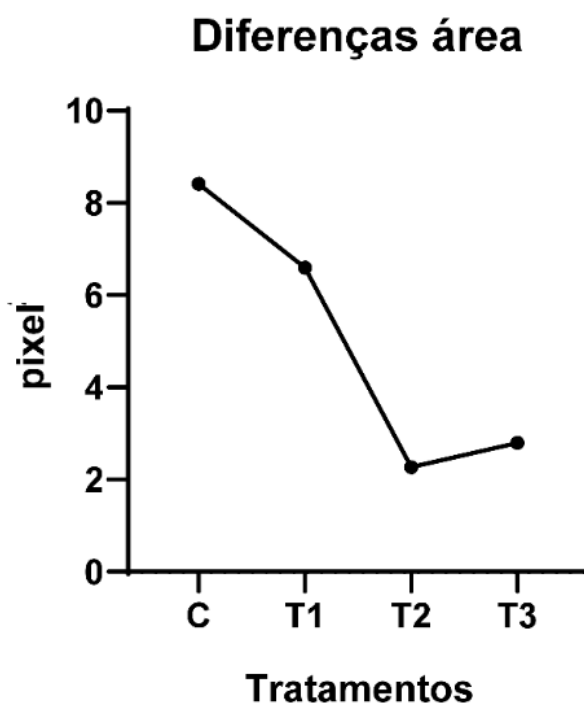


Figura 14. Diferenças entre as médias na área da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

A esqueletização permitiu verificar o comprimento da cabeça, mesmo quando esta estava curva. No grupo controle, o comprimento das cabeças foi maior ($p \leq 0,001$) com 58 semanas de idade do que com 52. O tratamento 1 apresentou uma diferença significativa ($p \leq 0,001$). Já nos demais tratamentos não foram observadas qualquer diferença antes e depois do tratamento. O comprimento das cabeças de espermatozoide apresentou valores nominais mais

elevados no grupo controle e no tratamento 1, com exceção dos tratamentos 2 e 3, onde não houve diferenças significativas após os tratamentos (figura 15).

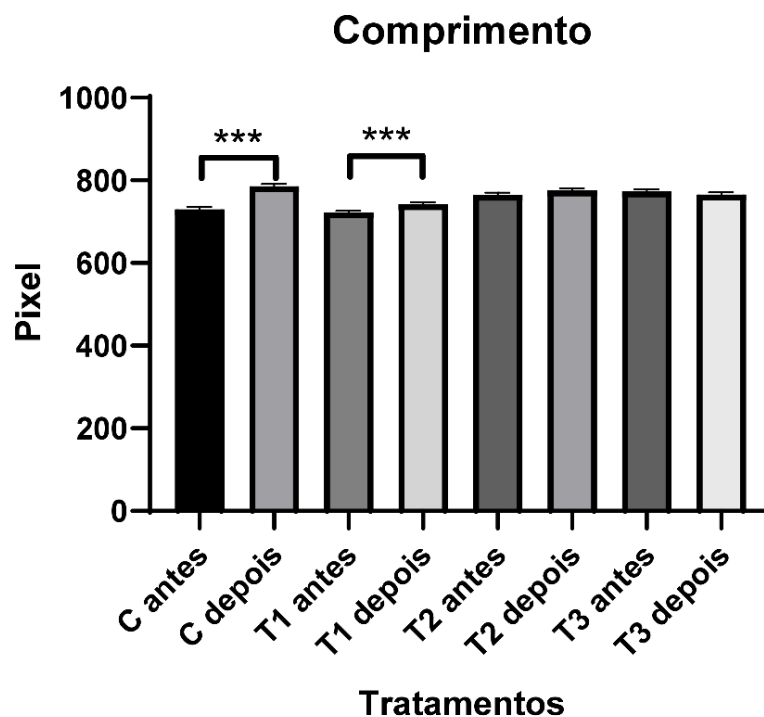


Figura 15. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao comprimento da cabeça de espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Em todos os casos, a tendência de diminuição do comprimento das cabeças com o aumento da concentração de arginina na ração é evidente (figura 16).

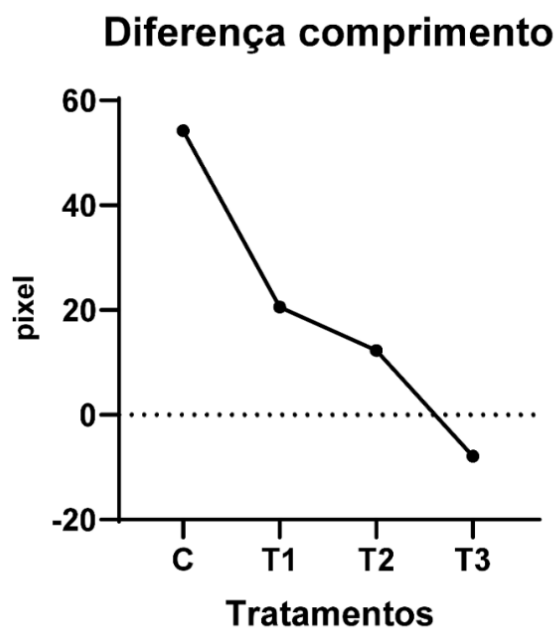


Figura 16. Diferenças entre as médias no comprimento da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

As amplitudes zero, um e dois das harmônicas da função Fourier foram utilizadas como descritores de forma para as cabeças dos espermatozoides. A harmônica zero da função de Fourier mostrou diferença no grupo controle antes e depois, e nos tratamentos 1 e 2 (figura 17) e uma tendência para que as diferenças após o tratamento diminuam com o aumento da concentração de arginina na ração (figura 18).

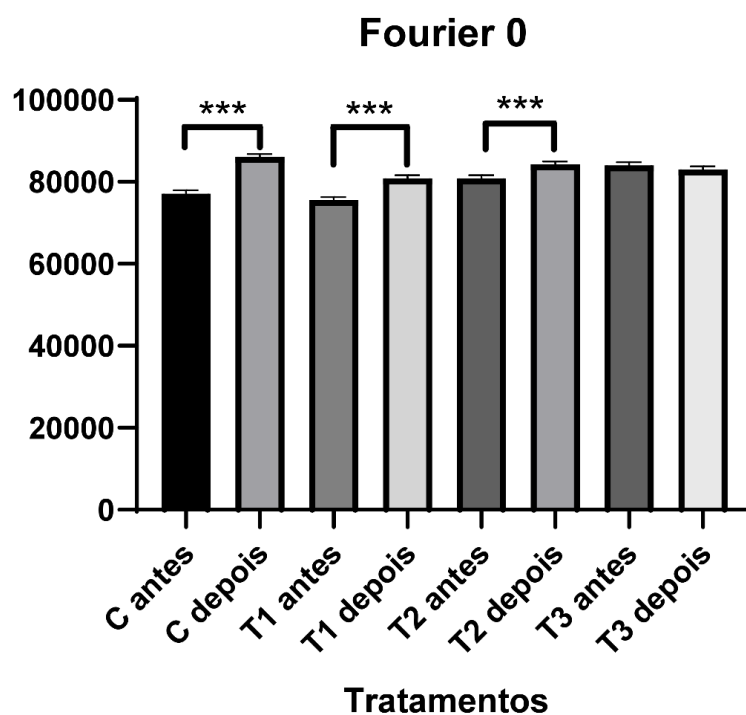


Figura 17. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao Fourier zero da cabeça dos espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

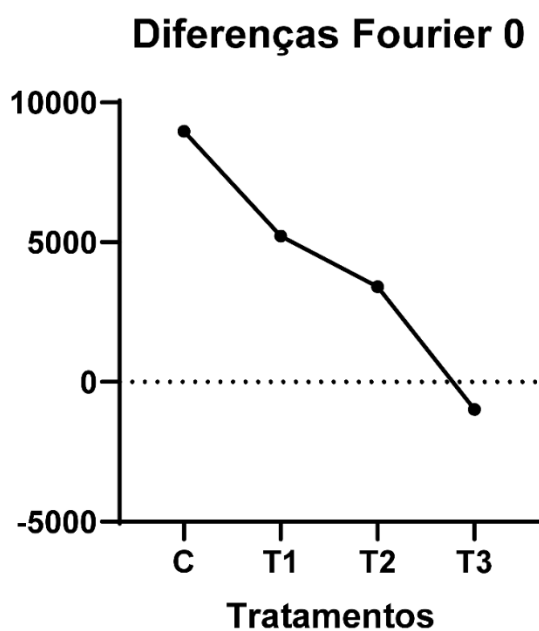


Figura 18. Diferenças entre as médias no Fourier zero da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

A harmônica 1 da função Fourier mostrou diferença antes e depois apenas no grupo controle ($p \leq 0,001$) (figura 19).

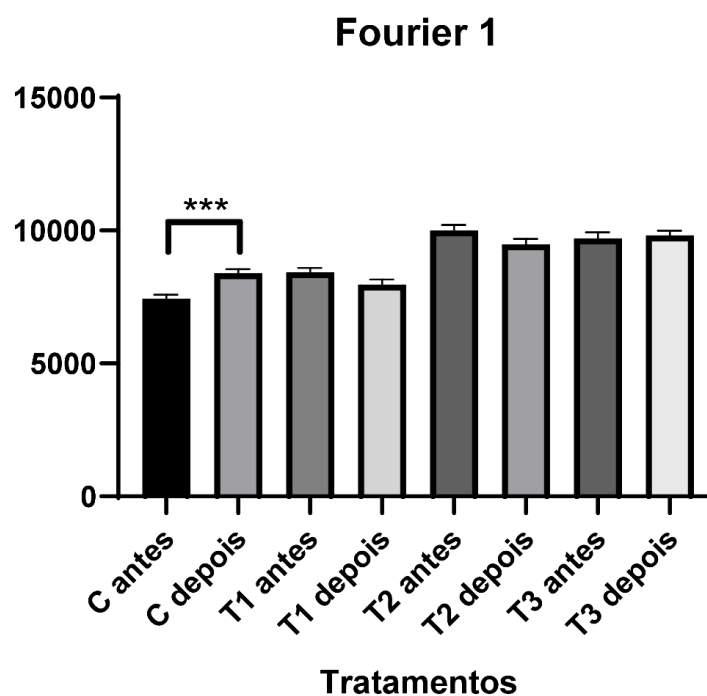


Figura 19. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao Fourier 1 da cabeça dos espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

A figura 20 mostra que não houve uma tendência clara relativamente à diferença no Fourier 1 assim como na descompactação porcentual da cromatina espermática antes e depois

dos tratamentos e no grupo controle com diferentes concentrações de arginina e que, em geral, não houve aumento da descompactação em nenhum dos tratamentos.

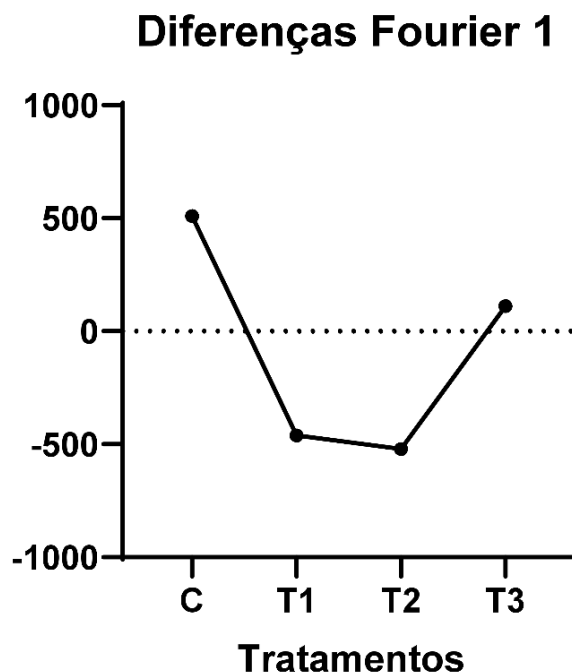


Figura 20. Diferenças entre as médias no Fourier 1 da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

A função harmônica de Fourier 2 mostrou uma diferença entre antes e depois no grupo controle ($p \leq 0,001$) e uma diferença entre antes e depois do tratamento 1 ($p \leq 0,001$) (figura 21). Nos demais grupos não apresentou diferenças significativas. Além disso, mostrou uma tendência para diminuir as diferenças no Fourier 2 antes e depois dos tratamentos com o aumento da concentração de arginina na ração (figura 22).

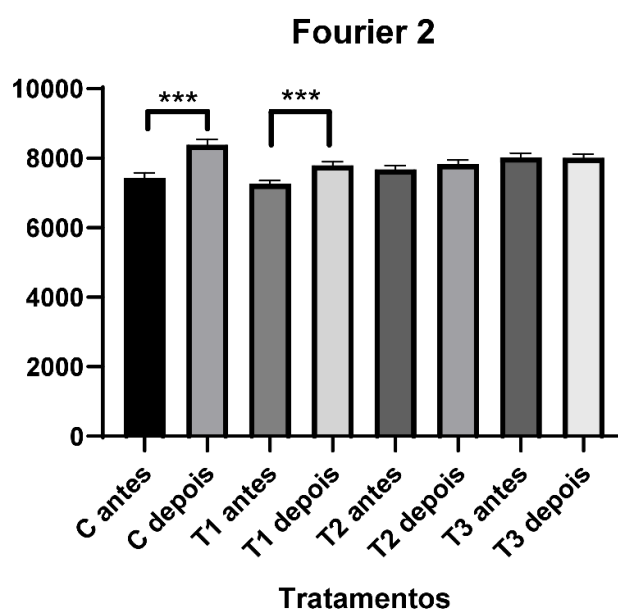


Figura 21. Teste t não pareado entre o grupo controle e os três tratamentos em relação ao Fourier 2 da cabeça dos espermatozoides de galos com 52 e 58 semanas. Onde: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

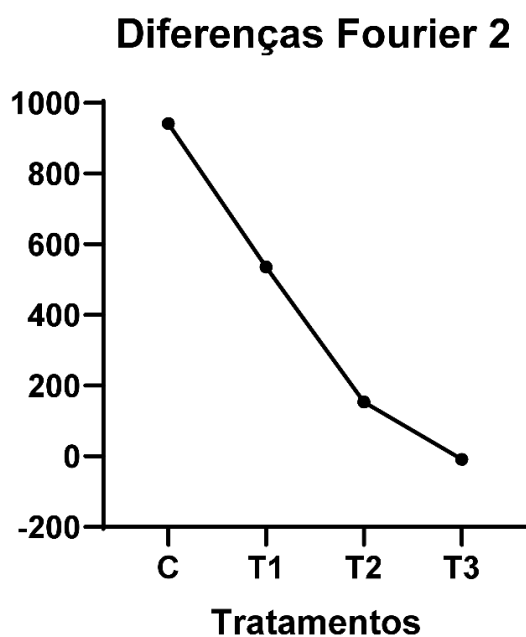


Figura 22. Diferenças entre as médias no Fourier 2 da cabeça espermática antes e depois dos tratamentos com diferentes concentrações de arginina na ração de galos com 52 e 58 semanas.

4.3 Correlações entre as variáveis morfométricas e de compactação de cromatina

As variáveis de caracterização da cromatina apresentaram uma correlação positiva significativa entre elas (Tabela 1), o que demonstrou alguma semelhança entre as alterações identificadas por estas variáveis, especialmente entre a DOI e a heterogeneidade.

Tabela 1. Correlação entre as variáveis relacionadas à compactação da cromatina espermática

	Descompactação	DOI	Heterogeneidade
Descompactação	1,00	0,39*	0,63*
DOI		1,00	0,85*
Heterogeneidade			1,00

*Coeficiente de correlação significativa ($p \leq 0,05$).

Em relação à correlação entre a caracterização da cromatina e as variáveis morfométricas, a descompactação correlacionou negativamente apenas com Fourier 1, que está relacionado com a circularidade da porção anterior da cabeça. Ou seja, quanto mais alto for Fourier 1, menos circular é a porção anterior da cabeça. A densidade óptica integrada correlacionou positivamente com a área, comprimento, Fourier 0 e Fourier 2, que estão todos relacionados com o tamanho da cabeça. A heterogeneidade da cromatina também correlacionou positivamente com estas variáveis de tamanho e negativamente com Fourier 1, que está relacionado com a forma (Tabela 2).

Tabela 2. Correlação entre as variáveis morfométricas e de compactação da cromatina espermática

	Área	Comprimento	Fourier 0	Fourier 1	Fourier 2
Descompactação	0,19	-0,08	0,14	-0,54*	0,20
DOI	0,85*	0,58*	0,58*	-0,09	0,46*
Heterogeneidade	0,73*	0,34*	0,44*	-0,37*	0,35*

*Coeficiente de correlação significativa ($p \leq 0,05$).

Em relação à correlação entre as variáveis morfométricas (Tabela 3), a área mostrou uma correlação positiva significativa com o comprimento, Fourier 0 e Fourier 2, e a maior correlação foi entre a área e o comprimento. O comprimento correlacionou-se positivamente com Fourier 0, Fourier 1 e Fourier 2, sendo que a correlação mais elevada foi do comprimento com o Fourier 0. Fourier 0 também apresentou uma correlação positiva elevada com Fourier 2, ambas relacionadas com o tamanho.

Tabela 3. Correlação entre as variáveis morfométricas

	Área	Comprimento	Fourier 0	Fourier 1	Fourier 2
Área	1,00	0,81*	0,64*	0,07	0,44*
Comprimento		1,00	0,78*	0,43*	0,58*
Fourier 0			1,00	0,19	0,92*
Fourier 1				1,00	0,09
Fourier 2					1,00

*Coeficiente de correlação significativa ($p \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou claramente que entre a 52^a e a 58^a semanas de idade, a suplementação de arginina na ração pode melhorar a compactação da cromatina espermática de galos com o avanço da idade, prolongando a vida útil dos reprodutores. Ahangar et al. (2017) concluíram que a arginina na dieta a uma concentração de 2,33 g/kg apresentou efeitos positivos nas características reprodutivas dos galos, melhorando o peso dos testículos, o volume do sêmen e a motilidade do espermatozoide. Além disso, os resultados obtidos demonstraram que o aumento da concentração de arginina na ração pode minimizar a descompactação da cromatina espermática em galos com o avanço da idade.

Após 45 semanas de idade, há uma redução da fertilidade dos galos reprodutores (FRAGOSO *et al.*, 2012; AVITAL-COHEN *et al.*, 2013, LAGARES *et al.*, 2016), piorando gradualmente a qualidade do sêmen, incluindo a compactação da cromatina (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009) ou a fragmentação do DNA (SHANMUGAM *et al.*, 2014). No

início do presente estudo, os galos estavam com 52 semanas de idade, pois a intenção era avaliar a influência da suplementação com arginina nesta piora progressiva da compactação da cromatina espermática.

A integridade do DNA do espermatozoide é uma variável importante associada à fertilidade e ao desenvolvimento embrionário inicial (HAMILTON; ASSUMPÇÃO, 2020) e pode ser avaliada em galos pelo ensaio cometa (GLIOZZI; ZANIBONI; CEROLINI, 2011), pelo ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) (SALEHI *et al.*, 2020, BLANK *et al.*, 2021) e pela dispersão da cromatina espermática (SCD) (SHANMUGAM *et al.*, 2014, JOHNSTON *et al.*, 2020).

A coloração de esfregaços de sêmen com azul de toluidina pH 4.0 é uma alternativa para avaliar a cromatina dos espermatozoides de galos, sendo necessário que o pH da solução de azul de toluidina seja 4.0 porque apenas os radicais fosfatos serão ionizados, impedindo que o corante se ligue a outros ânions. Como nos espermatozoides, os fosfatos estão quase exclusivamente no DNA, a coloração torna-se um marcador específico para esta molécula (SOARES; BELETTI, 2006).

No entanto, a avaliação visual dos esfregaços é subjetiva, com baixa repetibilidade entre os avaliadores. Para minimizar a subjetividade, Rodrigues, Rocha e Beletti (2009) desenvolveram um algoritmo para a avaliação da descompactação da cromatina através de imagens digitais de esfregaços de espermatozoides de galo. Este algoritmo compara a cor das cabeças padrão altamente compactadas e homogêneas com cada uma das cabeças analisadas. A diferença entre o valor médio dos pixels das cabeças padrão e o valor médio de cada cabeça é calculado e transformado em uma porcentagem do valor médio das cabeças padrão. Assim, é determinada a porcentagem de descompactação para cada cabeça (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

O mesmo algoritmo calcula também o coeficiente de variação dos valores de pixels para cada cabeça e é utilizado como variável que quantifica a heterogeneidade da cromatina. Espera-se que as cabeças com cromatina mais frouxa tenham áreas maiores do que as cabeças com cromatina mais compacta, pois ocorreria um aumento do volume desta cromatina (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

No presente trabalho, quando se utilizou o algoritmo de Rodrigues, Rocha e Beletti (2009), não houve correlação entre a porcentagem de descompactação e as variáveis relacionadas com o tamanho da cabeça (área, comprimento, Fourier 0 e Fourier 2). Isto mostra que a porcentagem de descompactação provavelmente não foi eficiente na caracterização de alterações cromatínicas, como foi observado por Rodrigues, Rocha e Beletti (2009). Já a

heterogeneidade da cromatina correlacionou-se positivamente com estas variáveis, mostrando que é provavelmente uma boa variável para caracterizar as alterações cromatínicas nos espermatozoides de galo.

As análises de cromatina de acordo com Rodrigues, Rocha e Beletti (2009) mostraram diferença na descompactação da cromatina espermática antes e depois de qualquer tratamento, incluindo o grupo controle. A menor descompactação apresentada no grupo controle com idade de 58 semanas em relação a idade de 52 semanas contradiz alguns trabalhos que demonstraram que quanto mais velho for o galo, pior é a qualidade da cromatina (SOARES; BELETTI, 2006; RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009; SHANMUGAM *et al.*, 2014). Isso demonstra mais uma vez que a porcentagem de descompactação provavelmente não é um bom método para identificar alterações cromatínicas espermáticas em galos. Provavelmente, esta metodologia também não foi capaz de identificar possíveis diferenças antes e depois dos tratamentos, com diferentes concentrações de arginina na ração, não havendo alteração da descompactação em nenhum dos grupos analisados.

Uma vez que a porcentagem de descompactação da cromatina mostrou resultados questionáveis, a densidade óptica integrada (DOI) foi utilizada pela primeira vez no presente trabalho como parâmetro para a avaliação da compactação da cromatina de galo, sendo que a DOI é a soma da densidade óptica (DO) de cada pixel que compõe a cabeça do espermatozoide.

A densidade óptica (DO) é definida como o logaritmo com base 10 da relação entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz transmitida, ou seja, é a absorbância (BOSCHI *et al.*, 2019). Semelhante à heterogeneidade, a DOI mostrou uma correlação positiva com todas as variáveis relacionadas com o tamanho da cabeça do espermatozoide, ou seja, esta é uma indicação de que seria uma boa variável para caracterizar as alterações cromatínicas.

A DOI reflete a quantidade de corante (azul de toluidina) ligado ao DNA (RODRIGUES *et al.*, 2014), que está diretamente relacionado à compactação da cromatina. Quanto mais compactada for a cromatina, menos azul de toluidina se ligará ao DNA. Por conseguinte, uma maior densidade óptica integrada está relacionada com uma maior descompactação da cromatina. No método de Rodrigues, Rocha e Beletti (2009), o valor médio dos valores dos pixels é utilizado para determinar a compactação da cromatina. Uma vez que a cabeça do espermatozoide de galo aumenta a sua área e comprimento quando a cromatina é descondensada, a média dos valores dos pixels não reflete exatamente a quantidade de azul de toluidina em toda a cabeça, mas em cada pixel. A DOI, por outro lado, é a soma da

absorbância de cada pixel, refletindo melhor a quantidade de azul de toluidina ligado ao DNA de toda a cabeça.

Como resultado da DOI, no grupo controle e no tratamento 1 observou-se uma grande diferença ($p \leq 0,001$) para uma maior descompactação da cromatina das cabeças dos espermatozoides de galos com 58 semanas em relação aos com 52 semanas. Em relação ao tratamento 2, foi observada diferença ($p \leq 0,05$) na DOI ao comparar antes e depois do tratamento com a suplementação de arginina, porém menor que no controle e tratamento 1. Já no tratamento 3, não foi observada diferença na descompactação da cromatina, evidenciando que a suplementação foi capaz de conter o agravamento da descompactação da cromatina espermática com o envelhecimento até 58 semanas de idade.

Em relação às várias concentrações de arginina testadas, percebe-se que a diferença antes e depois do tratamento tende a ser menor com o aumento da dose de suplementação. A arginina é o principal aminoácido da *gallina*, uma proteína espermática responsável pela compactação da cromatina dos espermatozoides de galos, que nas aves é considerado um aminoácido essencial; portanto, a dosagem de 3,18 kg de L-arginina/tonelada de ração na dieta (tratamento 3) contribuiu certamente para reduzir a descompactação da cromatina espermática em galos com 58 semanas.

As análises estatísticas não mostraram diferenças entre antes e depois do tratamento em todos os grupos, inclusive no controle, no que diz respeito à heterogeneidade da cromatina espermática. Contudo, à semelhança do que foi observado na DOI, foi possível observar que a diferença antes e depois do tratamento tende a ser menor com doses crescentes de suplementação de arginina na ração até o tratamento 3, indicando mais uma vez que a heterogeneidade pode ser considerada uma boa variável para caracterizar alterações cromatínicas em espermatozoides de galos.

Outro resultado que corrobora para uma provável ação benéfica da suplementação com arginina é o grande aumento da área ($p \leq 0,001$) e do comprimento ($p \leq 0,001$) no controle e tratamento 1 nos animais com 58 semanas em relação aos com 52 semanas. Isso significa que a suplementação com arginina na ração, impediu até certo ponto, o aumento do volume da cabeça do espermatozoide com o envelhecimento observado no grupo controle, pois é esperado que a descompactação da cromatina do espermatozoide aumente o volume da cabeça.

Por conseguinte, é provável que o aumento do volume da cabeça do espermatozoide observado no grupo controle esteja relacionado com alterações na compactação da cromatina,

o que não foi perceptível com o método descompactação porcentual. Martins *et al.* (2021) demonstraram que a cabeça de espermatozoides de touro tem uma forma espatular e que quando ocorre uma grande descompactação de cromatina, há um aumento do volume da cabeça que tende a tornar-se esférica. Quando fotografada em esfregaço, a cabeça tende a tornar-se esférica, apesar de ter um volume maior, apresentando uma área menor do que a cabeça compactada, que tem uma forma espatular. A cabeça do espermatozoide do galo tem uma forma de bastão ligeiramente espiralado, e quando ocorre a descompactação da cromatina, apresenta uma tendência a tornar-se mais longa, o que levaria a um aumento de área, mesmo em esfregaços de sêmen. Contudo, muito raramente os espermatozoides aparecem com cabeças esféricas, que neste caso, teriam uma área menor.

As amplitudes das harmônicas da função de Fourier foram inicialmente sugeridas como descritor da forma da cabeça do espermatozoide de touro (OSTERMEIER *et al.*, 2001) e foram posteriormente utilizadas para outras espécies de mamíferos (THURSTON *et al.*, 2001; SEVERA *et al.*, 2010; KANAYAMA; BELETTI, 2011).

A harmônica zero estaria mais relacionada com o tamanho da cabeça do espermatozoide, a harmônica 1 com a forma arredondada da porção anterior da cabeça, e a harmônica 2 estaria mais relacionada com o alongamento da cabeça (LUCIO *et al.*, 2016). No presente trabalho, esta é a primeira vez que as amplitudes zero, 1 e 2 das harmônicas da função Fourier foram utilizadas como descritor de forma para as cabeças de espermatozoides de galo.

A harmônica zero da função de Fourier mostrou diferença antes e depois no grupo controle e nos tratamentos 1 e 2 e uma tendência para que as diferenças após o tratamento diminuam com o aumento da concentração de arginina na ração, mostrando um comportamento linear em relação à dose de suplementação de arginina. Isso evidencia que o aumento da concentração de arginina na ração, pode estabilizar a descompactação da cromatina espermática de galos com o avanço da idade. Esta harmônica mostrou uma correlação positiva com a área e comprimento da cabeça e com a DOI e a heterogeneidade da cromatina, demonstrando que pode ser utilizada como variável para caracterizar a cabeça e a cromatina dos espermatozoides de galos.

A harmônica da função Fourier 1 mostrou uma diferença significativa antes e depois apenas no grupo controle ($p \leq 0,001$), e nos demais grupos não houve diferenças, porém não mostrou uma tendência para diminuir a diferença antes e depois dos tratamentos com doses mais elevadas de arginina. Estes resultados mostram que há uma mudança na forma da cabeça do espermatozoide com o envelhecimento que pode ser minimizada com a suplementação de arginina.

A harmônica 1 mostrou uma correlação negativa com a descompactação e a heterogeneidade da cromatina e uma correlação positiva com o comprimento. Portanto, a alteração morfológica da cabeça do espermatozoide de galo identificada pela harmônica 1 seria causada principalmente pela heterogeneidade da cromatina e também estaria relacionada com o aumento do comprimento da cabeça.

A harmônica da função Fourier 2 mostrou uma diferença entre antes e depois no grupo controle ($p \leq 0.001$) e no tratamento 1 ($p \leq 0.001$), sendo maior depois do tratamento. Porém, não apresentou diferença significativa após os tratamentos 2 e 3, evidenciando uma tendência para a diminuição da diferença entre antes e depois dos tratamentos com doses mais elevadas de arginina.

Como já foi mencionado, a descompactação da cromatina no espermatozoide de galo leva a um aumento do comprimento da cabeça do espermatozoide, e como a harmônica 2 está relacionada com o alongamento da cabeça, houve uma correlação desta variável com área, comprimento, Fourier zero, com a DOI e heterogeneidade. Todos estes resultados relativos às harmônicas 1 e 2 apoiam a hipótese de que a suplementação de arginina na ração impede uma maior descompactação da cromatina dos espermatozoides de galos com o avanço da idade.

Segundo Abbaspour et al. (2019), a suplementação alimentar com arginina a uma concentração de 0,68% mostrou efeitos positivos na qualidade do sêmen e melhorou a espermatogênese em galos idosos, mas não avaliaram a cromatina ou os danos no DNA do espermatozoide. No presente trabalho, foram utilizados galos com a idade reprodutiva um pouco mais avançada com o objetivo de verificar se a suplementação de arginina na ração aumentaria a vida útil do animal, melhorando ou mantendo a compactação da cromatina espermática, uma vez que o envelhecimento do galo é geralmente acompanhado por um agravamento na qualidade da cromatina.

Além disso, a arginina é o principal aminoácido que constitui a protamina espermática de galo, chamada *gallina*. Esta proteína se complexa com o DNA espermático, permitindo uma alta compactação da cromatina do espermatozoide (CHIVA; KASINSKY; SUBIRANA, 1987). Assim, esperava-se que a suplementação com arginina melhorasse a compactação da cromatina espermática, como foi observado.

6 CONCLUSÃO

A suplementação de L-arginina na ração contribuiu para minimizar a descompactação da cromatina espermática de galos com 52 e 58 semanas de idade, prolongando assim, a vida útil dos reprodutores.

REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR, B.; SHARIFI, S.D.; GHAZANFARI, S.; HONARBAKHS, S.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A. The effect of l- arginine and flaxseed on plasma testosterone concentration, semen quality and some testicular histology parameters in old broiler breeder roosters. **Theriogenology**, v. 128, p. 101-109, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.034>. Acesso em: 08 jun. 2021.
- 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**, p.241–249, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjas-2016-0068>. Acesso em: 01 dec. 2022.
- AHANGAR, M.; ASADZADEH, S.; REZAEIPOUR, V.; SHAHNEH, A.Z. Effects of L- Arginine supplementation on semen quality, testosterone concentration and testes histological parameters of Ross 308 breeder roosters. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 6, p. 133-135, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12980/apjr.6.20170307>. Acesso em 05 jun. 2021.
- AIRE, T.A. Spermiogenesis in birds. **Spermatogenesis**, v.30, n. 4 (3), p. e9593921-35, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/21565554.2014.959392>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v.41, n. 1, p.183-197, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.1.183>. Acesso em: 20 jul. 2021.
- AUSIÓ, J.; GONZÁLEZ-ROMERO, R.; WOODCOCK, C.L. Comparative structure of vertebrate sperm chromatin. **Journal of Structural Biology**, v. 188, n. 2, p. 142-55, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.09.004>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- AVITAL-COHEN, N.; HEIBLUM, R.; ARGOV-ARGAMAN, N.; ROSENSTRAUCH, A.; CHAISEHA, Y.; MOBARKEY, N.; ROZENBOIM, I. Age-related changes in gonadal and serotonergic axes of broiler breeder roosters. **Domestic Animal Endocrinology**, v.44, n. 3, p. 145-50, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.01.002>. Acesso em: 11 fev. 2021.
- BACHA JR, W. J.; BACHA, L. M. **Color atlas of veterinary histology** 3. ed. New Jersey: Wiley-BlackWell, 2011. cap. 17, p. 227-242.
- BACKES, A. R.; TRAVENCOLO, B.A.N.; ESCARPINATI, M.C. A derivative based algorithm for image thresholding. *In: Proceedings of the XII Workshop of computacional vision*, p. 189-194, 2016.
- BANKS, J. W. **Applied Veterinary Histology**. 3 ed., Saint Louis: Mosby, 1992, cap. 26, p. 429-444.

BARBEITO, C. G.; GONZÁLEZ, N. V. **Histología de las aves**. 1 ed. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2014. cap. 10, p. 367-390. <https://doi.org/10.35537/10915/43129>.

BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas Sperm chromatin: breaking paradigms. In: **Revista. Brasileira de. Reprodução Animal**, v.37, n. 2, p. 92-96, 2013. Disponível em: www.cbpa.org.br. Acesso em: 20 jul. 2021.

BELETTI, M.E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M.M. A Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in Bull Spermatozoa. **Journal of Morphological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005. Disponível em: <https://www.jms.periodikos.com.br>. Acesso em 14 jul. 2021.

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**, v. 85, n. 1-2, p. 105-116, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.019>. Acesso em 20 jun 2021.

BLANK, M.H.; RUIVO, L.P.; NOVAES, G.A.; LEMOS, E.C.; LOSANO, J.D.A.; SIQUEIRA, A.F.P.; PEREIRA, R.J.G. Assessing different liquid-storage temperatures for rooster spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 233, p. 1068-1045, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106845>. Acesso em: 20 jul. 2022.

BIZZARO, D.; MANICARDI, G.C.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U.; MARIETHOZ, E.; SAKKAS, D. *In situ* competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. **Molecular Human Reproduction**, v.4, n. 2, p. 127-132, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/4.2.127>. Acesso em: 28 jul. 2021.

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**, v. 63, n. (1) 3017, p. 53-57, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4081/ejh.2019.3017>. Acesso em: 12 fev. 2021.

BRAUN, R. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**, v. 28, p. 10 - 12, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng0501-10>. Acesso em: 23 nov. 2021.

CHEN, J.Q.; LI, Y.S.; LI, Z.J.; LU, H.X.; ZHU, P.Q.; LI, C.M. Dietary l-arginine supplementation improves semen quality and libido of boars under high ambient temperature. **Animal**, v.12, n. 8, p. 1611-1620, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731117003147>. Acesso em: 19 jan 2021.

CHIVA, M.; KASINSKY, H.F.; SUBIRANA, J.A. Characterization of protamines from four avian species. **FEBS Letters**11, v. 215, n. 2, p. 237-40, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80153-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80153-9). Acesso em: 22 mar. 2021.

DEVICHE, P.; HURLEY, I. L.; FOKIDIS, H. B. Chapter 2 - Avian Testicular Structure, Function, and Regulation. Academic Press, 2011, Pages 27-70, ISBN 9780123749291.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374929-1.10002-2>. Acesso em: 01 dec. 2022.

DREVET, J.R.; HALLAK, J.; NASR-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, R.J. Reactive Oxygen Species and Their Consequences on the Structure and Function of Mammalian Spermatozoa. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.37, n. (7-9), p.481-500, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0235>. Acesso em: 20 nov. 2022.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative Study of Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Integrity. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 45-53, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02152.x>. Acesso em: 16 nov. 2021.

ESTEVES, S.C.; ZINI, A.; COWARD, R.M.; EVENSON, D.P.; GOSÁLVEZ, J.; LEWIS, S.E.M.; SHARMA, R.; HUMAIDAN, P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. **Andrologia**, v. 53, n. 2, e13874, p. 1-41, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/and.13874>. Acesso em: 28 jul. 2022.

EURELL, J.A.; FRAPPIER, B. L. **Histologia veterinária de Dellmann**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2003, cap. 12, p. 233-255.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v.23, n. 1, p.25-43, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>. Acesso em: 19 oct. 2021.

FRAGOSO, J.S.; PIZARRO DÍAZ, M.; ABAD MORENO, J.C.; CASANOVAS INFESTA, P.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; BARGER, K. Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 345-52, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02161.x>. Acesso em: 24 mar. 2021.

FALCÃO, A.X.; COSTA, L. F.; DA CUNHA, B.S. Multiscale skeletons by image foresting transform and its application to neuromorphometry. **Pattern Recognition**, v. 35, n. 7, p. 1571-1582, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-3203\(01\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0031-3203(01)00148-0). Acesso em: 04 aug. 2020.

FUJIIHARA, N.; HOWARTH, B. JR. Lipid peroxidation in fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 57, n. 6, p. 1766-1768, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.3382/ps.0571766>. Acesso em: 12 nov. 2021.

GLIOZZI, T.M.; ZANIBONI, L.; CEROLINI, S. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1613-1622, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.001>. Acesso em: 06 nov. 2020.

GUALTIERI, R.; KALTHUR, G.; BARBATO, V.; LONGOBARDI, S.; DI RELLE, F.; ADIGA, S.K.; TALEVI, R. Sperm Oxidative Stress during *In Vitro* Manipulation and Its

Effects on Sperm Function and Embryo Development. **Antioxidants** (Basel), v. 25, n.10(7), p.1-24, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10071025>. Acesso em: 20 nov. 2022.

GRIBBINS, K.M. Reptilian spermatogenesis: A histological and ultrastructural perspective. **Spermatogenesis**, v.1, n. 3, p. 250-269, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.18092>. Acesso em: 16 jul. 2021.

HAMILTON, T.; ASSUMPÇÃO, M. Sperm DNA fragmentation: Causes and identification. **Zygote**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0967199419000595>. Acesso em: 10 jul. 2022.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD19420>. Acesso em: 12 jul. 2022.

JONES, R.C.; LIN, M. Spermatogenesis in birds. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**. 1993. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/8336978>. Acesso em 01 dec. 2022.

KANAYAMA, C.Y.; BELETTI, M.E. Computational evaluation of chromatin condensation and morphometric characteristics of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) sperm head. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 94-99, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100015>. Acesso em: 26 mar. 2021.

KHAJALI, F.; WIDEMAN, R. Dietary arginine: Metabolic, environmental, immunological and physiological interrelationships. **World's Poultry Science Journal**, v. 66, n. 4, p. 751-766, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0043933910000711>. Acesso em: 25 may. 2022.

LAGARES, M.A.; ECCO, R.; MARTINS, N.; LARA, L.; ROCHA, J.; VILELA, D.; BARBOSA, V.M.; MANTOVANI, P.F.; BRAGA, J.; PREIS, I.S.; GHELLER, V.A.; CARDEAL, P.C.; BAIÃO, N.C. Detecting reproductive system abnormalities of broiler breeder roosters at different ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 1, p. 67-75, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.12804>. Acesso em: 24 jun. 2021.

LOUIE, A.J.; DIXON, G.H. Kinetics of enzymatic modification of the protamines and a proposal for their binding to chromatin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, n. 247 (24), p.7962-7968, 1972. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81796-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81796-7). Acesso em: 22 jun. 2021.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>. Acesso em: 22 jun. 2021.

MARTINS, M.C.; GONÇALVES, L.M.; NONATO, A.; NASSIF TRAVENÇOLO, B.A.; ALVES, B.G.; BELETTI, M.E. Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. **Theriogenology**, v. 161, p. 200-209, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004>. Acesso em: 14 jul. 2022.

MELLO, M.L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387-92, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00493438>. Acesso em: 26 nov. 2021.

MEZQUITA, C.; TENG, C.S. Studies on sex-organ development. Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis. **Biochemical Journal**, v.15 n. 164 (1), p.99-111, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj1640099>. Acesso em: 11 jun. 2021.

MIRI, B.; GHASEMI, H.A.; HAJKHODADADI, I.; KHALTABADI FARAHANI, A.H. Effects of low eggshell temperatures during incubation, in ovo feeding of L-arginine, and post-hatch dietary guanidinoacetic acid on hatching traits, performance, and physiological responses of broilers reared at low ambient temperature. **Poultry Science**, v. 101, n. 1, p.1-13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101548>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MORAIS, M. R. P. T.; DE SOUZA VELHO, A. L.M.C.; DANTAS, S. E. S.; FONTENELE-NETO, J. D. Morphophysiology of avian reproduction I: Embryonic development, anatomy and histology of the reproductive system. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.3, p.165-176, 2012 a. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2012.6.3.2965>. Acesso em: 15 jun. 2021.

MORAIS, M. R. P. T.; DE SOUZA VELHO, A. L.M.C.; DANTAS, S. E. S.; FONTENELE-NETO, J. D. Morphophysiology of avian reproduction: Endocrine control of the avian sexual cycle. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.285-293, 2012 b. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2012.6.4>. Acesso em: 15 jun. 2021.

NAKANO, M.; TOBITA, T.; ANDO, T. Studies om a protamine (*Galline*) from fowl sperm: 1. fractionation and some characterization. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 5, n. 3, p. 149–159, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1973.tb02330.x>. Acesso em: 26 jun 2021.

NAKANO, M.; KASAI, K.; YOSHIDA, K.; TANIMOTO, T.; TAMAKI, Y.; TOBITA, T. Conformation of the fowl protamine, *galline*, and its binding properties to DNA. **The Journal of Biochemistry**, v. 105, n. 1, p. 133-137, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122607>. Acesso em: 22 dec. 2021.

NISHIMURA, H.; L'HERNAULT, S. W. Spermatogenesis. **Current Biology**, v. 27, n. 18, p. R988-R994, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>. Acesso em: 23 jul. 2021.

OLIVA, R.; DIXON, G.H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.

40, p.25-94, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60839-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60839-9). Acesso em: 10 jun. 2021.

OLIVA, R.; MEZQUITA, C. Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. **Biochemistry**, v. 21, n.25 (21), p. 6508-6511, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00369a025>. Acesso em: 11 mar. 2021.

OMIDI, S.; EBRAHIMI, M.; JANMOHAMMADI, H.; MOGHADDAM, G.; RAJABI, Z.; HOSSEINTABAR-GHASEMABAD, B. The impact of in ovo injection of l-arginine on hatchability, immune system and caecum microflora of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.104, n. 1, p.178-185, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jpn.13222>. Acesso em: 20 dec. 2021.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, T.B.S.; PARRISH, J.J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, v.22, n. 4, p. 584-594, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451355/>. Acesso em: 11 jan 2021.

RHIM, J.A.; CONNOR, W.; DIXON, G.H.; HARENDZA, C.J.; EVENSON, D.P.; PALMITER, R.D.; BRINSTER, R.L. Expression of an avian protamine in transgenic mice disrupts chromatin structure in spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. (1), p.20-32, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.1.20>. Acesso em: 13 jul. 2021.

RODRIGUES, A.C.N.; ROCHA, J.V.; BELETTI, M.E. Computational analysis of chromatin condensation of rooster spermatozoa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 1302-1307, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000600008>. Acesso em: 23 jan. 2021.

RODRIGUES, H.F.; SOUZA, T.A.; GHIRALDINI, F.G.; MELLO, M.L.; MORAES, A.S. Increased age is associated with epigenetic and structural changes in chromatin from neuronal nuclei. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 4, p. 659-665, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.24705>. PMID: 24166948. Acesso em: 14 jul 2022.

SALEHI, M.; MAHDAVI, A.H.; SHARAFI, M.; SHAHVERDI, A. Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm. **Theriogenology**, v.142, p. 15-25, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.030>. Acesso em: 17 mar. 2021.

SEVERA, L.; MÁCHAL, L.; SVÁBOVÁ, L.; MAMICA, O. Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. **Animal Reproduction Science**, v.119, n.1-2, p. 50-55, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.007>. Acesso em: 15 jul 2021.

SHAMSI, M.B.; IMAM, S.N.; DADA, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, n. 11, p. 1073-1085, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9631-8>. Acesso em: 20 nov. 2021.

SHANMUGAM, M.; VINOOTH, 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.015>. Acesso em: 27 jun 2021.

SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoidetozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. In: **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, p. 543-553, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26471>. Acesso em: 28 jul. 2021.

TAMIR, H.; RATNER, S. Enzymes of arginine metabolism in chicks. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.102, p. 249-258, 1963. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90178-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90178-4). Acesso em: 22 may. 2021.

THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.22, n. 3, p. 382-394, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02194.x>. Acesso em: 27 jul. 2021.

VIEIRA, G.H.; COLLI, G.R.; BÃO, S.N. The ultrastructure of the spermatozoon of the lizard Iguana iguana (*Reptilia, Squamata, Iguanidae*) and the variability of sperm morphology among iguanian lizards. **Journal of Anatomy**, v.204, n. 6, p. 451-64, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00300.x>. Acesso em: 11 jun. 2021.

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

WISHART, G. J.; HORROCKS, A. J. **Fertilization in birds**. In: TARÍN, J. J. & CANO, A. Fertilization in protozoa and metazoan animals: cellular and molecular aspects. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2000, p. 193-222. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-58301-8_5. Acesso em: 22 jul. 2021.

WU, G.; MORRIS, S.M. JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 15, n.336, p. 1-17, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj3360001>. Acesso em: 22 nov. 2021.

ANEXO A – Composição nutricional das dietas de cada tratamento

INGREDIENTES	COMPOSIÇÃO DAS DIETAS (Kg)				NUTRIENTES CALCULADOS				
	C	T1	T2	T 3		C	T1	T 2	T 3
Trigo, Fo	335,000	335,000	335,000	335,000	En.Met.Aparente Aves Kcal/KG	2.800,46	2.800,46	2.800,46	2.800,46
Milho, Grao moido	298,360	298,360	298,360	298,360	Proteína Bruta %	12,175	12,175	12,175	12,175
SORGO,Grao Moido	250,000	250,000	250,000	250,000	Fibra Bruta %	4,350	4,350	4,350	4,350
Soja Extrusada	59,000	59,000	59,000	59,000	Calcio Total %	0,689	0,689	0,689	0,689
Oleo, Soja Degomado	25,000	25,000	25,000	25,000	Fosforo Total %	0,604	0,604	0,604	0,604
Calcario 37% granulado	9,000	9,000	9,000	9,000	Fosforo Disp %	0,361	0,361	0,361	0,361
Fosfato Bicalcico	6,800	6,800	6,800	6,800	Sodio %	0,201	0,201	0,201	0,201
Sal comum	4,050	4,050	4,050	4,050	Potassio %	0,750	0,750	0,750	0,750
SVIT REPRODUÇÃO 2:1	2,200	2,200	2,200	2,200	Arginina total %	0,700	0,813	0,913	1,013
K,Cloreto 52%	1,330	1,330	1,330	1,330	Isoleucina %	0,421	0,421	0,421	0,421
DL-Metionina 99%	1,300	1,300	1,300	1,300	Lisina %	0,516	0,516	0,516	0,516
Biolys 60 (Evonik)	0,860	0,860	0,860	0,860	Metionina %	0,322	0,322	0,322	0,322
L-Treonina 98%	0,120	0,120	0,120	0,120	Treonina %	0,420	0,420	0,420	0,420
Colina, Cl 60%	1,080	1,080	1,080	1,080	Triptofano %	0,168	0,168	0,168	0,168
Bactonew (Anti Salmonella)	1,000	1,000	1,000	1,000	Valina %	0,563	0,563	0,563	0,563
MT.X+ (Adsorvente micotoxina)	1,000	1,000	1,000	1,000	Metionina+Cistina %	0,552	0,552	0,552	0,552
Rovimix MaxiChick 250	0,250	0,250	0,250	0,250	Arginina Dig Aves %	0,603	0,716	0,817	0,916
Bacitracina, Zn 15%	0,350	0,350	0,350	0,350	Isoleucina Aves %	0,371	0,371	0,371	0,371
Enviva Pro 202 BA (Bacillus subtilis)	0,060	0,060	0,060	0,060	Lisina Aves %	0,441	0,441	0,441	0,441
Axtra Phy 10000 TPT (Fitase)	0,030	0,030	0,030	0,030	Metionina Aves %	0,301	0,301	0,301	0,301
LAZ DRY PLUS (Antiox blend)	0,030	0,030	0,030	0,030	Treonina Aves %	0,351	0,351	0,351	0,351
FILITO/VEICULO INERTE	3,18	2,03	1,01		Triptofano Aves %	0,142	0,142	0,142	0,142
L-ARGININA 98,5%		1,15	2,17	3,18	Valina Aves %	0,485	0,485	0,485	0,485
					Glicina Aves %	0,207	0,207	0,207	0,207
					Metionin+Cistin Aves %	0,486	0,486	0,486	0,486
					Extrato Etereo %	6,816	6,816	6,816	6,816
					Colina Total mg/Kg	1501,150	1501,150	1501,150	1501,150
					Balanço Eletrolitico mEq/kg	183,523	183,523	183,523	183,523
TOTAL	1000,000	1000,000	1000,000	1000,000					

Fonte: JEB Agropecuária Instituto de Biociências. (C): Grupo controle; (T1): Tratamento 1; (T2): Tratamento 2; (T3): Tratamento 3.