

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO EUGENIO TRIQUES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE
VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DE MACHOS REPRODUTORES
DE FRANGO DE CORTE**

PALOTINA-PR
2014

GUSTAVO EUGENIO TRIQUES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE
VARIÁVEIS REPRODUTIVAS DE MACHOS REPRODUTORES
DE FRANGO DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Produção Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Jovanir Inês Müller
Fernandes

PALOTINA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T836 Triques, Gustavo Eugenio
 Efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre
 variáveis reprodutivas de machos reprodutores de frango de corte /
 Gustavo Eugenio Triques; Orientador, Jovanir Inês Müller Fernandes
 - Palotina, PR, 2014.
 87p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
Palotina – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui referências

1. Antioxidantes. 2. Fertilidade. 3. Peroxidação lipídica .I. Jovanir Inês
Müller Fernandes . III. Universidade Federal do Paraná. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 591.16

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



TERMO DE APROVAÇÃO

GUSTAVO EUGÊNIO TRIQUES

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE VARIÁVEIS
REPRODUTIVAS DE MACHOS REPRODUTORES DE FRANGOS DE CORTE.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção
Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca
examinadora:

Prof.ª Dra. Jovanir Inês Müller Fernandes
Presidente/Orientador(a): Universidade Federal do Paraná

Prof.ª Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Membro: Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton
Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 15 de setembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gustavo Eugenio Triques, filho de Eugenio Triques e Lorete Contini Triques, nasceu em Concórdia, Santa Catarina, no dia 08 de Agosto de 1986.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina em Fevereiro de 2005, concluído em Dezembro de 2009.

Em Janeiro de 2010 foi contratado pela empresa Sadia S.A., na cidade de Dois Vizinhos no Paraná, onde atuou como Assistente Técnico de Granjas de Matrizes de Frango de Corte.

Em Julho de 2011, foi transferido para a unidade de Toledo, também no Paraná. Neste momento, a fusão da Sadia com a Perdigão já acontecera e o profissional já atuava pela BRF S.A. como Sanitarista de Matrizes de Frango de Corte e Incubatório.

Iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UFPR – Campus Palotina em Abril de 2012.

Em Dezembro de 2013, foi contratado pela empresa JBS Foods como Coordenador Corporativo de Sanidade de Matrizes de Frango de Corte e de Incubatórios.

“Nosso medo mais profundo não é que sejamos inadequados. Nosso medo mais profundo é que sejamos poderosos demais. É nossa sabedoria, não nossa ignorância, o que mais nos apavora. (...) Você é um filho de Deus. Seu medo não serve ao mundo. Não há nada de iluminado em se diminuir para que outras pessoas não se sintam inseguras perto de você. Nascemos para expressar a glória de Deus que há em nós. Ela não está em apenas em alguns de nós; está em todas as pessoas. E quando deixamos que essa nossa luz brilhe, inconscientemente permitimos que outras pessoas façam o mesmo. Quando nos libertamos de nosso medo, nossa presença automaticamente liberta as outras pessoas.”

(Nelson Mandela)

Dedico à minha família, Eugenio, Lorete, Patrícia, Carina e Camila, foi por vocês que cheguei até aqui.

Ofereço ao meu pai Eugenio Triques pelo seu exemplo de pessoa e de profissional que me direciona diariamente.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pelo amor e por proporcionar inúmeras oportunidades de felicidade diariamente. Por jamais me abandonar.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná e aos professores da instituição pela oportunidade para a presente formação.

À professora Jovanir Inês Müller Fernandes, pela total confiança em meu trabalho até o último momento, pela orientação e pela oportunidade concedida de compartilhar seu trabalho, complementando a experiência adquirida com ela ainda na graduação. Por abrir meus olhos para a avicultura. Sem dúvidas, eternamente grato.

Agradecimentos especiais para a Cooperativa C.Vale, DSM e BRF, por terem concedido espaço e material para a realização dos trabalhos, pela oportunidade e profissionalismo.

Às minhas irmãs, Patrícia Triques e Carina Contini Triques, sempre acreditaram em mim, pelo incentivo.

Aos meus pais, Eugenio e Lorete, pelos conselhos, orações e palavras certas nos momentos difíceis de 2014.

À minha namorada, Camila Oro, pela parceria em todos os momentos, suporte, insistência e apoio para que esse trabalho fosse concluído.

Aos meus amigos, pela torcida e pela alegria compartilhada com essa conquista, em especial ao Thiago Vinholi Brazil, colega de trabalho e de mestrado.

Aos colegas do LEA – Laboratório de Experimentação Avícola, por ajudar na condução de todos os trabalhos realizados e pela receptividade. Por conceder a oportunidade de retornar ao local onde me despertei para a avicultura. Todos foram fundamentais.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre características espermáticas de galos reprodutores de frango de corte. Foram realizados três experimentos. No primeiro, foram utilizados 12 galos Cobb de 50 semanas de idade distribuídos aleatoriamente em um delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 6 repetições. Amostras de sêmen foram coletadas pelo método de massagem abdominal para avaliação de volume seminal, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. Às 68 semanas de idade, amostras de testículo foram coletadas para determinação da morfometria tubular dos testículos e para análise da proliferação celular no epitélio germinativo pela técnica do PCNA. A morfometria de testículos, cristas e barbelas também foram analisadas. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa Statistical Analysis System com nível de 5% de significância. Houve efeito positivo ($p < 0,05$) do *blend* de antioxidantes no percentual de espermatozoides normais, no peso e largura das barbelas e no peso e comprimento dos testículos. No segundo experimento, foi selecionado um núcleo de matrizes de produção de 4 aviários. Em 2 aviários, os galos receberam dieta comercial para machos e nos outros 2 aviários, os galos receberam a dieta suplementada com antioxidantes (8ppm de cantaxantina + 40 ppm de licopeno + 150 ppm de vitamina C). Na 62ª semana, foram retirados fragmentos da membrana vitelínica sobre o disco germinativo dos ovos para contagem do número de perfurações espermáticas. Foi observado um maior ($p < 0,05$) número de perfurações nos ovos oriundos dos aviários cujos galos receberam antioxidantes na dieta. Na 68ª semana, os galos foram sacrificados e a crista, barbela, peito e testículos foram pesados e medidos. Na 66ª semana de idade, os ovos foram incubados e a progênie foi alojada no aviário experimental de acordo com o delineamento experimental dos reprodutores com 2 tratamentos e 12 repetições com 12 aves cada. Aos 7 dias de idade, foram sacrificadas 24 aves por tratamento para contagem do número de fibras e a mensuração do diâmetros das fibras musculares. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da suplementação do blend de antioxidantes na dieta dos reprodutores sobre o ganho de peso e o peso de peito da progênie aos 7 dias de idade. A contagem e diâmetro da fibra muscular não diferiu ($p > 0,05$) entre a progênie oriunda de galos suplementados ou não. A conversão alimentar e ganho de peso na fase de 14 – 35 dias foram melhores ($p < 0,05$) para a progênie dos reprodutores suplementados. No terceiro experimento, Foram utilizados 24 galos da linhagem Cobb, 12 galos com 25 semanas de idade e 12 galos com 50 semanas de idade. Os reprodutores foram mantidos em gaiolas (1 por gaiola) e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (idades e dietas) totalizando 4 tratamentos e 6 repetições de 1 galo cada. Os tratamentos foram compostos por: Tratamento 1 – galos com 25 semanas de idade e suplementados com licopeno, Tratamento 2 – galos com 50 semanas de idade e suplementados com licopeno, Tratamento 3 – galos com 25 semanas de idade e sem suplementação e Tratamento 4 – galos com 50 semanas de idade e sem suplementação. O licopeno foi fornecido na quantidade de 72 ppm (Licopeno 10%; Roche Vitamins). Após 12 semanas de suplementação, o sêmen foi coletado pelo

método da massagem abdominal. As análises do sêmen, volume de sêmen, concentração espermática e motilidade foram realizadas imediatamente após a coleta. Todos os galos foram sacrificados para medida e pesagem de testículo, crista, barbela e peito. Fragmentos dos testículos foram fixados, emblocados em parafina, cortados e aplicados em lâminas sinalizadas para detecção de células em mitose pela técnica imunohistoquímica. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SAS. O comprimento e largura da crista dos galos mais novos foram maiores ($p < 0,05$) em comparação aos galos mais velhos, independente da adição de licopeno às dietas. Este mesmo resultado foi observado para o peso, comprimento e espessura dos testículos. No desdobramento da interação, idade e tratamento, observou-se que a inclusão do licopeno aumentou ($p < 0,05$) o peso vivo dos galos de 50 semanas de idade.

Palavras chave: antioxidantes, peroxidação lipídica, espermatozoides, fertilidade

ABSTRACT

With the objective of evaluating the effect of dietary supplementation of antioxidants on broiler breeder males' spermatogenic characteristics, three experiments were conducted. At the first experiment, 12 fifty week age Cobb roosters randomly distributed in a totally casual delineation were used with 2 treatments (commercial feed and commercial feed + antioxidant blend canthaxanthin, lycopene and vitamin C) and six repetitions. Samples of semen were collected by abdominal massage method in order to evaluate seminal volume and spermatogenic concentration, motility, vigor and morphology. At 68 weeks of age, testicle samples were collected to tubular morphometry determination and to analyze the cell proliferation on the germinative epithelium by PCNA technique. The testicles, combs and dewlaps morphometry was also analyzed at 68 weeks of age. The data were submitted to statistical analysis using Statistical Analysis System, with 5% of significance. It was observed a positive effect ($p < 0,05$) of the treatment on the percentage of normal spermatozooids, on the weight and width of dewlaps and on weight and length of testicles. At the second experiment, a breeder farm containing 4 houses were chosen. In two of them, the roosters received a commercial male diet and in the other two houses the roosters received the same antioxidant supplemented feed used in the first experiment. At 62 week age, fragments from the vitellinic membrane were taken to spermatogenic perforations count. It was observed a higher ($p < 0,05$) number of perforations in the eggs that came from the houses where the roosters had the antioxidant diet. Fertile eggs were set and the progeny was housed at the experimental barn according to the breeder males delineation with 2 treatments and 12 repetitions with 12 chicks each. At seven days of age, 24 birds per treatment were euthanatized in order to count the number of fibers and to measure the muscular fibers diameter. There was no significant effect ($p > 0,05$) from the breeder male antioxidant supplementation on the 7 day progeny gain of weight and chest weight. The muscular fiber counting and diameter did not differ ($p > 0,05$) between the progeny derived from the supplemented roosters and the control one. The feed conversion and gain of weight of the progeny between the 14 and 35 days of age were better ($p < 0,05$) to the progeny derived from the supplemented males. At the third experiment, 24 Cobb roosters were used, 12 with 25 weeks of age and 12 with 50 weeks of age and distributed in a totally casual delineation in factorial system 2 x 2 (ages and diets) adding 4 treatments and 6 repetitions of 1 bird each. The lycopene were provided at 72 ppm (Lycopene 10%, Roche Vitamins). After 12 weeks of supplementation, the semen was collected by abdominal massage method. The semen analysis, semen volume, spermatogenic concentration and motility were made right after the collect. All the roosters were euthanatized in order to testicle, comb, dewlaps and chest measurement and weighing. Fragments from the testicles were fixed, paraffin blocked, cut and put on marked blades to mitosis cells detection by immunohistochemistry technique. The comb length and width from the younger roosters were bigger ($p < 0,05$) compared to the older roosters, independently from the lycopene added to the diet. The same result was observed to testicle weight, length and thickness. In the interaction unfolding of age and treatment, it was observed that the inclusion of lycopene increased ($p < 0,05$) the weight of the 50 week age roosters. The lycopene added to the diet, independently from the males' age increased the number of positive-PCNA cells in the testicles. The using of specific diets to male is highly viable, not only by the well-known benefits about nutrition requirements on eclobility and fertility, but

also to make possible the use of additives, once the volume of feed for the male is smaller than the female feed.

Keywords: antioxidants, lipid peroxidation, spermatozoids, fertility

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Características seminais de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com *blend* de antioxidantes.....52

Tabela 2. Defeitos espermáticos (%) de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com *blend* de antioxidantes.....53

Tabela 3. . Biometria da barbela (peso, comprimento e largura), crista (espessura e peso) e testículos (peso, comprimento e largura) de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com blend de antioxidantes.....54

Tabela 4. Medidas morfométricas dos túbulos (área, diâmetro e altura do epitélio do túbulo seminífero) e contagem de células PCNA-positivas de testículos de galos suplementados ou não com blend de antioxidantes.....54

Capítulo 2

Tabela 1. Medidas morfométricas de crista, barbela e testículos de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.....66

Tabela 2. Medidas Peso vivo, rendimento de peito e de testículos e contagem do número de perfurações espermáticas na membrana vitelínica dos ovos oriundos de matrizes acasaladas com galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.67

Tabela 3. Desempenho produtivo da progênie de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.....69

Tabela 4. . Avaliação do desenvolvimento muscular aos 7 dias da progênie de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.....69

Tabela 5. Rendimento de carcaça aos 35 dias da progênie de galosem idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.....70

Capítulo 3

Tabela 1. Biometria de crista, barbela e testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.....81

Tabela 2. Peso vivo e percentual de peito e testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.81

Tabela 3. Características do sêmen de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.....82

Tabela 4. Contagem de células PCNA-positivas em testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.....82

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Corte histológico em que são evidenciados o epitélio germinativo (eg) e o lúmen (lu) dos túbulos seminíferos de testículo de galo suplementados com *blend* de antioxidantes. A) Notam-se os núcleos positivos (setas) para a imunohistoquímica anti-PCNA corados em marron por DAB e os núcleos negativos contracorados por Hematoxilina. B) Controle negativo (neg) em que se omitiu o anticorpo primário. Barra 30 μm55

Capítulo 2

Figura 1. Fotomicroscopia de membrana perivitelínica de ovo fértil – perfurações espermáticas na membrana perivitelínica. A) Observa-se a presença de um menor número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica dos ovos férteis provenientes dos aviários sem suplementação com antioxidantes. B) número significativamente maior de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica dos ovos férteis provenientes dos aviários suplementados com *blend* de antioxidantes.....67

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC – Adenosina monofosfato cíclico

cm - Centímetros

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FSH – Hormônio folículo estimulante

g - gramas

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

GPx – Glutaciona peroxidase

kg -Quilogramas

LH – Hormônio luteinizante

mL – Mililitro

PCNA – Proliferating cell nuclear antigen

ppm – Partes por milhão

PUFA – Ácidos graxos poli-insaturados

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

µm - Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Aspectos reprodutivos de galos	18
2.2 Peroxidação lipídica como causa de infertilidade e proteção antioxidante do sêmen.....	25
2.3 Carotenoides e vitaminas utilizados como antioxidantes.....	29
3. REFERÊNCIAS.....	34
4. OBJETIVOS.....	45
4.1 Objetivos específicos	45
CAPÍTULO 1 – Efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre características reprodutivas de machos reprodutores de frangos de corte com idade superior a 50 semanas	46
RESUMO -.....	46
Palavras chave	46
ABSTRACT.....	46
Keywords.....	47
Introdução.....	47
Material e métodos	49
Resultados e discussão	51
Conclusões.....	56
Referências.....	56
CAPÍTULO 2 - Efeito da suplementação de antioxidantes na dieta de reprodutores de frangos de corte com idade superior a 50 semanas sobre características reprodutivas e o desempenho produtivo e muscular da progênie.....	59
RESUMO -.....	59
ABSTRACT -	59

Introdução.....	60
Materiais e métodos.....	63
Resultados e discussão	65
Conclusões.....	70
Referências.....	71
CAPÍTULO 3 – Avaliação do efeito da adição de licopeno e da idade de reprodutores de frangos de corte sobre características reprodutivas	74
RESUMO -.....	74
Palavras chave	74
ABSTRACT.....	74
Introdução.....	75
Materiais e métodos.....	77
Resultados e discussão	79
Conclusão.....	83
Referências.....	84
5. CONCLUSÕES GERAIS	88

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um dos pilares que sustenta a posição de destaque do Brasil na produção e exportação de carne de frango é a produção anual de mais de 6 bilhões de pintos (Avisite, 2014), oriundos dos processos de granjas de matrizes e de incubatórios, fundamentais na cadeia avícola. Na granja de matrizes, responsável por abastecer o incubatório com ovos férteis, os machos representam uma pequena percentagem do plantel, contudo, são responsáveis por 50% do processo de fertilização (Bittar Filho e Ribeiro, 2005), o que torna sua presença indispensável para a reprodução. O aprofundamento nas questões relacionadas à reprodução de aves tem ganhado cada vez mais importância, uma vez que as linhagens genéticas priorizaram, nos últimos anos, parâmetros produtivos em frangos de corte, como conversão alimentar, na década de 80, e rendimento de carcaça, na década de 90 (MENDES et al., 2005). Mesmo sabendo-se da importância de produzir linhagens balanceadas, ou seja, com bons desempenhos tanto no frango quanto nas matrizes, essa tarefa não é fácil. Sabe-se que a principal característica esperada de um macho, a fertilidade, possui uma baixa herdabilidade e correlação negativa com fatores produtivos do frango (CASTELLÓ et al., 1989). Este cenário de correlação negativa entre fatores produtivos e reprodutivos relacionados à genética faz com que outras variáveis como as nutricionais e de manejo ganhem relevância na parte reprodutiva, abrindo portas para novas oportunidades nesses campos e aprofundando o conhecimento na fisiologia reprodutiva de machos e fêmeas.

Além da genética, outros fatores influenciam negativamente a fertilidade. Como o desenvolvimento testicular se inicia logo após o nascimento e as primeiras dez semanas de vida são cruciais para a multiplicação das células de Sertoli (Adjanohoun, 1994), qualquer desvio na condução de peso do macho pode interferir negativamente no desenvolvimento testicular e refletir em infertilidade quando o galo estiver em período de acasalamento. Após o acasalamento, os cuidados com o peso do macho devem ser mantidos, uma vez que galos muito leves ou muito pesados entre as galinhas são indesejáveis para a reprodução (DUNCAN et al., 1990). A temperatura ambiental muito alta (Karaca et al., 2002) e aspectos sanitários (Villarreal, et al., 2007) também podem ser causas de infertilidade num

lote de matrizes e acarretam em uma menor produção de pintos para a agroindústria.

Todas as causas de infertilidade citadas, entretanto, apresentam alguma maneira de prevenção. Dois aspectos, contudo, são inerentes ao próprio animal e, por isto, ações corretivas nem sempre surtem efeito. Os aspectos em questão são a idade e a constituição biológica do espermatozoide do galo. A membrana espermática do galo possui em sua constituição uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (MARTIN-RILLO et al., 1996). Tal característica predispõe a peroxidação lipídica, evento biológico que causa danos aos espermatozoides, diminuindo sua capacidade fertilizante. Esta situação é bem mais evidente com o envelhecimento do galo, tornando o espermatozoide de aves mais idosas mais suscetíveis aos danos oxidativos, como motilidade reduzida, alteração morfológica e até morte celular.

Segundo Surai (2002), há um sistema de proteção antioxidante do espermatozoide composto por enzimas e vitaminas capazes de reduzir os efeitos da peroxidação lipídica. Os principais componentes deste sistema são as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além das vitaminas C e E. Dependendo do grau da peroxidação, no entanto, pode ser necessária a suplementação de substâncias de ação antioxidantes para manter a boa proteção espermática (SURAI, 2007).

Dentre os aditivos com função antioxidante estudados para inclusão na dieta de machos estão os carotenoides. Os carotenoides possuem importante papel antioxidante, pois removem RL, absorvem e dissipam o excesso de energia destes e reciclam a vitamina E (BÖHM et al., 1997). A cantaxantina está incluída no grupo dos carotenoides e, adicionada à dieta dos galos pode exercer seu papel antioxidante no sêmen reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides. Outro carotenoide com destacada ação antioxidante é o licopeno, que possui grande capacidade sequestrante de oxigênio singlete, devido a sua estrutura (KRINSKY, 2001).

Outras substâncias naturais com atividade redutora e neutralizadora de radicais livres são utilizadas como antioxidantes exógenos nas dietas para aves (ROCHA et al., 2007). Dentre estes destacam-se a vitamina E e a vitamina C com mecanismos antioxidantes distintos (Bianchi & Antunes, 1999) e com potencial de melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo de galos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS REPRODUTIVOS DE GALOS

O sistema reprodutivo dos machos, de uma maneira geral, é mais simples que o sistema reprodutor dos mamíferos. Basicamente, é constituído por testículos, epidídimos, vasos deferentes e falo. Não há presença de órgãos acessórios, diferentemente do que ocorre com mamíferos (SESTI, 2003).

Os testículos, em número de dois, encontram-se no interior da cavidade abdominal do galo, localizados na região cranial do rim e aderidos à parede dorsal por uma prega derivada do peritônio chamada mesórquio (BACHA & BACHA, 2003; SESTI, 2003; JOHNSON, 2006). A temperatura na cavidade abdominal varia de 41 a 43°C. Esta condição, entretanto, não afeta a espermatogênese. Segundo Rutz et al. (2005), a razão que viabiliza a espermatogênese nessa condição de temperatura é um possível resfriamento dos testículos por meio dos sacos aéreos abdominais.

Os testículos das aves são relativamente grandes, correspondendo a aproximadamente 1% do peso vivo da ave na fase adulta (RUTZ et al., 2005; JOHNSON, 2006). Externamente, os testículos são envolvidos por uma capsula formada por três camadas: uma túnica serosa externa formada por mesotélio derivado do peritônio; uma camada média formada por tecido conjuntivo, chamada túnica albugínea; e uma camada interna de tecido conjuntivo frouxo e pequenos vasos sanguíneos, chamada túnica vascular (SAMUELSON, 2007). Histologicamente, os testículos são formados por uma grande massa de túbulos seminíferos, revestidos internamente por células de Sertoli e células germinativas, e ainda por um delicado estroma intersticial contendo vasos sanguíneos e linfáticos, além das células de Leydig (JOHNSON, 2006).

Segundo Sesti e Ito (2000), nos machos das espécies de aves, os testículos têm função tanto de produção espermática quanto de produzir e secretar hormônios esteroides, principalmente os andrógenos, sendo a testosterona o mais importante. As células de Leydig são as responsáveis por secretar os andrógenos (BAKST & BAHR, 1995).

O desenvolvimento testicular do galo pode ser dividido em três fases: pré-puberal, puberal e adulta (ADJANOHOUN, 1994; BONI& PONSATI, 2005). Segundo estes autores, a primeira fase compreende do 1º dia de idade até as semanas 10 a 14 de vida da ave, e caracteriza-se por intensa multiplicação das células de Sertoli. A fase puberal, da 12ª a 24ª semana de vida da ave, é caracterizada pelo aparecimento dos primeiros espermatozoides nos tecidos. Os testículos passam de 500 mg de peso para aproximadamente 30 g. Na fase adulta, o peso dos testículos permanece praticamente o mesmo até aproximadamente as 40 semanas de idade, quando começa a decrescer gradativamente. A evolução histológica do testículo é relatada por Gonzáles-Moran et al. (2008), que explica que na primeira fase os túbulos seminíferos dos testículos são formados apenas por uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias, evoluindo, na medida em que o animal amadurece, para um epitélio seminífero estratificado e notória redução de tecido intersticial no galo sexualmente maduro.

O epitélio dos túbulos seminíferos é chamado de epitélio germinativo, pois dá origem às células germinativas masculinas (os espermatozoides). O ciclo desse epitélio compreende a sua proliferação, a qual é seguida de regressão. A proliferação epitelial nesse âmbito é também referida como espermatogênese. A espermatogênese é a diferenciação celular sofrida pelas espermatídes para se tornarem espermatozoides (SESTI, 2003).

Na primeira etapa da espermatogênese as espermatogônias, por serem diploides, se dividem por mitose para manter constante a população de células-tronco da espermatogênese. Estas células dão origem aos espermatócitos, que passam pelo processo de meiose, resultando em células haploides denominadas espermatídes, que sofrem uma série progressiva de modificações estruturais e de desenvolvimento e dão origem aos espermatozoides, tendo aí o processo de espermiogênese (RENEMA, 2001). Tais diferenciações ocorridas durante a espermatogênese somente são possíveis devido ao microambiente ideal proporcionado pelas células de Sertoli, que envolvem as células germinativas durante o seu desenvolvimento (GUIBERT et al, 1982; GARNER, 2004; HAFEZ, 2004).

Cada evento da espermatogênese nos galos tem uma duração curta, quando comparados com os mamíferos. O período entre o início da meiose e a formação completa do espermatozoide é de apenas 14 dias no galo, enquanto nos

touros esse período é de 37 dias, 26 dias para o rato e 34 dias para o suíno (MACIEL, 2006). Ou seja, quando se propõe alguma mudança, seja essa de manejo ou nutricional, na condução de galos, um período mínimo de 14 dias é necessário para poder verificar resultados em fertilidade.

O número de células de Sertoli nos testículos, produzidas no galo entre as semanas 1 e 12 de idade (fase pré-puberal), são proporcionais ao tamanho e peso dos mesmos. Existe uma correlação direta entre a produção de sêmen e o tamanho do testículo, segundo Etches (1996). Ou seja, problemas de fertilidade ocasionados pela produção ineficiente de sêmen na fase de produção têm, muitas vezes, origem na condução do macho na recria.

Os galos não possuem vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e nempróstata. Os órgãos genitais tubulares das aves são relativamente pouco desenvolvidos (JOHNSON, 2006). Justaposto a cada testículo, há uma pequena estrutura tubular chamada epidídimo, um órgão pequeno e complexo que compreende uma rede de ductos, incluindo a rete testis, túbulos eferentes, túbulos conectores e túbulos epididimários. Estes túbulos se conectam, na sua porção distal, ao ducto deferente (AIRE et al., 2008). Rutz et al. (2007) denomina esse conjunto de ductos como região epididimária. Segundo esse autor, é nos epidídimos que a maturação espermática é finalizada. De acordo com o estágio de maturação sexual, uma variação morfológica do epidídimo pode ser observada (OZEGBE et al., 2010).

Galos sexualmente maduros e em atividade sexual apresentam túbulos eferentes revestidos por um epitélio cúbico ou cilíndrico com poucas células ciliadas e túbulos conectores e epididimários revestidos por um epitélio cilíndrico com microvilosidades apicais. Em aves machos sexualmente inativos, podem ser observados túbulos epididimários atrofiados, caracterizados por atrofia epitelial, redução do diâmetro do lúmen e interrupção da atividade funcional e secretória do epitélio (AIRE, 2002).

O ducto do epidídimo abre-se dentro do ducto deferente, primeiro local de armazenamento de espermatozoides no galo (RUTZ et al., 2007). Os ductos deferentes apresentam-se como um par, são longos e pregueados, dilatam-se levemente e projetam-se na cloaca desembocando em um pequeno falo (BACHA & BACHA, 2003; JOHNSON, 2006; RUTZ et al., 2007). O falo não é um órgão

penetrador, apesar de copulatório (HAFEZ, 1988). O sêmen é transferido deste para a vagina evertida da fêmea por contato (BURKE, 1996).

Endocrinologicamente, a espermatogênese e a esteroidogênese no testículo dependem de LH, FSH e androgênios (KIRBY, 1998). A puberdade é o período de produção de maiores taxas de espermatogênese e quando há maior produção de androgênios pelas células de Leydig. Estes eventos resultam da liberação de GnRH do hipotálamo, que faz com que a pituitária libere FSH e LH. Estas glicoproteínas se ligam a receptores, particularmente nas células de Sertoli e de Leydig. A sua ação ocorre através de quinases dependentes de AMPc, que regulam os eventos intracelulares. O FSH regula o número e a atividade das células de Sertoli, promove genes para a síntese de proteínas vitais e regula a produção de androgênios. A inibina e activina são produzidas nos testículos e regulam a atividade do FSH através de feedback e ação parácrina. A inibina controla a ação de androgênios e inibe a secreção de FSH. A activina estimula a secreção de FSH (RUTZ et al., 2007). Ainda, a melatonina, hormônio produzido pela pineal, reduz a atividade gonadal ao inibir a secreção de LH, sugerindo a ação da melatonina em hipotálamo e/ou hipófise (ROZEMBOIM et al., 2002).

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

Segundo Cerolini (1997), outro fator que influencia características seminais é a idade. De acordo com este autor, o volume seminal e a concentração e motilidade espermáticas são maiores no período de pico de produção do plantel, quando o trato reprodutor está sexualmente maduro, e reduzem a partir daí na medida em que as aves envelhecem.

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

A morfologia espermática parece ser uma das mais importantes características qualitativas do sêmen (KUSTER et al., 2004). A avaliação pode ser um indicador básico para prever a capacidade de fertilização do espermatozoide (Lukaszewics, 1988), seleção de machos e também para definição de armazenamento em meios líquidos ou criopreservação para propósitos e inseminação artificial (DONOGUE & WISHART, 2000; LUKASZEWICS, 2002). A morfologia espermática pode também servir como um indicador de desordens na espermatogênese. No entanto, a avaliação da morfologia ainda não é utilizada como rotina de campo. Segundo Maciel (2006), as anomalias espermáticas são incompatíveis com a boa fertilidade e qualquer alteração nas características morfológicas dos espermatozoides pode comprometer a motilidade e sobrevivência espermática.

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

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

a o menor percentual de anomalias espermáticas em galos com maior motilidade espermática.

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

A infertilidade geralmente é medida como forma de se fazer gestão a campo e ainda experimentalmente, como resultado de testes de manejo ou nutrição que visam identificar oportunidades de melhoria na reprodução. Rutz et al. (2005) citam uma identificação de ovos férteis a olho nu. Segundo esses autores, no momento em que ocorre a oviposição o embrião em desenvolvimento possui de 30.000 a 60.000 células já formadas, possibilitando a identificação. Este método é muito utilizado em incubatórios comerciais com o objetivo de avaliar a condição dos machos das granjas fornecedoras de ovos. Outro método, citado por Baskt et al., (2002), consiste na avaliação microscópica da membrana perivitelínica que cobre o disco germinativo, verificando perfurações espermáticas na primeira estrutura. Essas perfurações, segundo Waclaweket al. (1998) nada mais são que orifícios hidrolisados pelos quais os espermatozoides penetraram no oócito. Esse método é importante para comparar a fertilidade em situações experimentais ou de campo submetidas a diferentes variáveis.

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

Além dos fatores já citados que influenciam na fertilidade, como linhagem e idade, outros fatores correlacionam-se positivamente ou negativamente com a fertilidade. O peso corporal de machos tem influência negativa direta na fertilidade

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

Bittar Filho e Ribeiro (2005) citam, ainda como forma da obtenção e manutenção da boa fertilidade do lote, o controle sobre a densidade de machos no galpão durante a fase de recria, realização de seleções com descarte e a manutenção da relação do número de machos em função da quantidade de fêmeas do plantel de acordo com o previsto pela linhagem em questão. Estes mesmos autores citam a possibilidade de introdução de machos novos no plantel quando a fertilidade começa a cair, processo conhecido como *spiking*, e citado também por Canovas (2008). No entanto, os custos agregados para alimentação, criação, manejo e transporte dessas aves, somado ao risco sanitário de se introduzir ao plantel de reprodução aves de outra instalação (Sesti, 2005) fazem com que se opte por outra opção que não esta para a manutenção da fertilidade.

Dentre os fatores intrínsecos ao espermatozoide que influenciam a fertilidade estão os lipídeos (KELSOET al., 1997), constituintes de sua membrana. Em todas as espécies, os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por conter grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados – PUFA, o que sugere que a composição de lipídios e ácidos graxos dos espermatozoides pode ser um fator determinante das taxas de fertilidade (MARTIN RILLO et al., 1996), uma vez que esse tipo de constituição favorece a peroxidação lipídica.

Em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutathione, glutathioneperoxidase e a superóxido dismutase como elementos minimizadores da ação da peroxidação lipídica. A mitocôndria é responsável pela produção de energia

para manter a motilidade espermática. Durante este processo ocorre a formação de radicais livres. Assim, a presença de antioxidantes nesta região auxilia na neutralização de radicais livres, impedindo a peroxidação lipídica e mantendo a qualidade espermática (RUTZ et al., 2007).

2.2 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA COMO CAUSA DE INFERTILIDADE E PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE DO SÊMEN

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

A peroxidação lipídica é uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados de membranas celulares, levando a uma série de eventos que podem culminar com a morte celular (BENZIE, 1996).

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

celular que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar energia (KUSS, 2005).

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

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

De acordo com Bilodeau et al. (2002), os espermatozoides e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar espécies reativas ao oxigênio (ROS). Segundo esse autor, a susceptibilidade do espermatozoide aos danos oxidativos causados pelas ROS decorrem da alta quantidade de PUFA presentes na sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios. O oxigênio é a maior fonte de ROS produzidas em reações metabólicas para as células obterem energia pela oxidação de nutrientes. As células possuem sistemas pró-oxidantes e antioxidantes que constantemente geram e detoxificam ROS durante metabolismo aeróbico. O estresse oxidativo pode ser causado quando o balanço de pró-oxidantes e antioxidantes está alterado em células com eventos oxidativos

aumentados (ORTEGA, 2003). As ROS incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido, radical hidroxila, radical alquila, alcóxila e peróxila (BARBER et al., 1967; CHANGE et al., 1979; HALLIWELL, 2006).

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

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

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

Os componentes básicos do sistema de proteção antioxidante contra as ROS, segundo Aitken (1995) e Makker et al. (2009), são enzimas, tais como: superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutatona peroxidase (GPx) e redutase; além das vitaminas C e E. Surai (2002), explicou que esses componentes citados por Aitken e outros podem ser distribuídos em três níveis de defesa, responsáveis para manter as funções espermáticas em várias condições de estresse. A superóxido dismutase juntamente com a glutatona peroxidase e proteínas carreadoras de metais, compreendem a primeira linha de defesa antioxidante, responsável por impedir a formação de radicais livres. Antioxidantes naturais, juntamente com a glutatona peroxidase perfazem a segunda linha de defesa antioxidante que atua na

prevenção e neutralização da formação da cadeia e sua propagação. O terceiro nível de defesa é em um sistema enzimático responsável pela reparação e remoção de moléculas lesadas na célula.

Rutz et al. (2005) afirmou que esta proteção é temporária, uma vez que o plasma seminal é rapidamente substituído pelo fluido secretado pelo oviduto. Ainda assim, os espermatozoides continuam sob proteção de enzimas e vitaminas (C e E).

Weir e Robaire (2007) compararam a atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides e a produção de ROS na maturação de espermatozoides de ratos velhos e novos e observaram queda na capacidade antioxidante associada ao aumento na produção de ROS com o envelhecimento dos animais. Os autores concluíram que a queda na qualidade espermática de animais velhos está associada à maior susceptibilidade dos espermatozoides aos danos oxidativos.

Rodrigues et al. (2009) demonstraram que um dos fatores que podem influenciar a fertilidade de galos mais idosos são as alterações na compactação da cromatina espermática. Estes pesquisadores identificaram que o sêmen de galos velhos apresentam mais alterações na cromatina, tanto na homogeneidade como na intensidade de compactação, do que galos jovens. A condensação do material nuclear é um importante evento da diferenciação nuclear durante a espermatogênese. Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou ocorrência de anormalidades nas protaminas podem levar à formação de distúrbios de condensação de cromatina dos espermatozoides que se torna frouxa e influencia a fertilidade.

As atividades da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase estão descritas por alguns autores (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985; SURAI, 1998; HAMMADEH et al., 2009), sendo que estes últimos destacam que essas enzimas juntamente com outros componentes do sistema antioxidante atuam como uma rede protetora, seja neutralizando as ROS, seja regenerando os antioxidantes à estrutura original, como as vitaminas C e E.

Contudo, uma vez que a quantidade de enzimas antioxidantes no citoplasma dos espermatozoides é limitada e a presença destes antioxidantes é fundamental para proteção espermática (HAMMADEH et al., 2009), Makker et al. (2009) e Bansal e Bilaspuri (2010) destacaram antioxidantes adicionados a dieta de machos com a finalidade de reduzir o estresse oxidativo dos espermatozoides.

Dentre os antioxidantes citados, estão as vitaminas C e E, beta-carotenos, carotenoides e flavonoides.

2.3 CAROTENOIDES E VITAMINAS UTILIZADOS COMO ANTIOXIDANTES

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

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

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

Os carotenoides são quimicamente definidos como tetraterpenoides C_{40} (hidrocarbonetos de ocorrência natural e seus derivados), ou seja, união de oito unidades isoprenóides (C_5) de cinco átomos de carbono, formando uma cadeia carbônica de quarenta átomos de carbono, exceto a crocetina e a bixina, que possuem menos. A cadeia carbônica de alguns carotenoides apresenta um ou dois anéis β -ionona nas extremidades (VILLELA, 1976).

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

A propriedade antioxidante dos carotenoides foi descrita por Shami & Moreira (2004), que relataram a proteção proporcionada por esses compostos às células contra danos oxidativos, provocados por radicais livres e por ROS que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA. Os carotenoides são capazes de sequestrar as ROS, como o radical peróxil e o oxigênio singlete, estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância (FOOTE et al., 1970). Por conseguinte, os carotenoides são capazes de retirar do meio espécies altamente reativas (BURTON e INGOLD, 1984). Entretanto, a capacidade de interagir com o oxigênio e neutralizar os radicais livres varia entre os carotenoides, cuja atuação depende do tipo de carotenoide, da sua natureza, quantidade de oxigênio no meio e da interação com outros antioxidantes (ROCK et al., 1997; EDGE et al., 1997).

A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas, eles são capazes de retirar do meio espécies altamente reativas de oxigênio (MCBRIDE, 1996). A ordem crescente de capacidade de sequestrar o oxigênio singlete por parte dos carotenos e xantofilas é: licopeno, cantaxantina, β -caroteno ou bixina, luteína e crocina (FONTANA et al., 2000). O licopeno é mais eficaz que o β -caroteno, por exemplo, por possuir 11 duplas ligações conjugadas e cadeia acíclica, enquanto o β -caroteno possui apenas 9 ligações conjugadas e cadeia cíclica (DI MASCIO et al., 1989).

A função pigmentante dos carotenoides também estão relacionadas com o sistema de duplas ligações conjugadas desses compostos, assim como a função antioxidante (RODRIGUES-AMAYA, 1999). Segundo Bendich e Olson (1989), os carotenoides são associados principalmente com os lipídios dos tecidos e células de origem animal, incluindo membranas. Uma vez que não são sintetizados pelas aves, devem ser ingeridos através da dieta, e a sua concentração na dieta está

relacionada diretamente a sua concentração nos tecidos. Inúmeras experiências comprovam que um dos fatores influente na deposição de carotenoides é que haja disponibilidade de grupos funcionais que contenham oxigênio, como hidroxila, acetona, éster ou outros grupos, que apresente características polares.

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

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

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

Outro carotenoide com considerada ação antioxidante é o licopeno. O licopeno confere a cor vermelha aos tomates, melancia, mamão, goiaba, pitanga e outros alimentos (KRINSKY, 1998). Sua ação antioxidante dá pela capacidade de se unir às ROS (HADLEY et al., 2002), motivo pelo qual tem despertado interesse em pesquisas, principalmente em humanos (VELMURUGAN et al., 2004). Muitos autores destacam o licopeno como potencial fator de prevenção do câncer e

de doenças cardiovasculares (ARAB & STECK, 2000; MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Arab e Steck (2000) destacam a ação antioxidante do licopeno demonstrando que este carotenoide apresenta potencial de provenção de danos oxidativos a lipoproteínas e ao DNA, além da possível habilidade de inibir a síntese do colesterol e aumentar a degradação do LDL-colesterol.

Segundo Rao e Agarwal (2000), a excelente capacidade antioxidante do licopeno deve-se às numerosas insaturações conjugadas presentes na sua estrutura química, o que permite maior habilidade para neutralizar os radicais livres. De acordo com pesquisas realizadas em mamíferos roedores, esta molécula pode doar elétrons para suprimir e neutralizar as ROS, consideradas fonte de envelhecimento e a causa de várias doenças degenerativas, antes que elas prejudiquem as células (LIVNY et al, 2002).

Os efeitos da suplementação de licopeno sobre qualidade seminal foram estudados por Mangiagalli et al. (2010). Esses autores, suplementando o carotenoide via água de bebida para galos, observaram melhores índices de produção e de viabilidade de espermatozoides.

Em outro estudo, dessa vez sobre armazenamento de sêmen, Mangiagalli et al. (2007) observaram efeito positivo da inclusão de licopeno no meio sobre a viabilidade espermática.

Goya et al. (2007) e Turk et al. (2007), avaliando sêmen de outros animais e de humanos, também observaram efeitos positivos significativos com o uso de licopeno sobre características espermáticas.

Outros compostos utilizados com a finalidade antioxidante, sobretudo relacionado à qualidade espermática, são as vitaminas, especialmente a vitamina C e a vitamina E. Cerolini et al. (2006) verificaram melhoras significativas no sêmen de aves após a suplementação dietética de vitamina E.

Em estudo com coelhos, Yousef et al. (2003) observaram influência benéfica da inclusão de vitamina C e vitamina E sobre características seminais desses animais. Além disso, verificaram que a associação das duas vitaminas reduziu o estresse oxidativo no plasma seminal dos coelhos. Resultados similares foram encontrados por (MISHRA, 2004), porém utilizando apenas a vitamina C em ratos suíços. Bansal e Bilaspuri (2009), utilizando apenas a vitamina E verificaram

melhores índices de motilidade e viabilidade espermática em touros, assim como menor taxa de peroxidação lipídica no espermatozoide desses animais.

Segundo Yousef (2003), a vitamina E é componente primário do sistema de proteção antioxidante do espermatozoide e um dos maiores protetores de membrana contra o ataque de ROS e peroxidação lipídica. Horton et al (2002) atribuem o fato de a vitamina E ser a primeira linha de defesa contra os PUFA na membrana celular ao caráter lipofílico da vitamina.

A vitamina E atua na membrana neutralizando diretamente o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (SHARMA & AGARWAL, 1996). A vitamina C possui habilidade de atuar como agente redutor (doador de elétrons). Desta forma reage rapidamente com os radicais livres, além de atuar sinergicamente com a vitamina E, regenerando-a em sistemas biológicos.

3. REFERÊNCIAS

ADJANOHOON, E. 1994. Fertilidade relacionada aos machos. Fisiologia da reprodução de aves. FACTA. Campinas.8:107-115.

ALLEN, T. E.; GRIGG, G. W. 1957. Sperm transport in the fowl. Aust J Agron Res. v 8. 788-789.

AIRE, T. A. 2002. Morphological changes in the efferent ducts during the main phases of the reproductive cycle in birds. J. Morphology. 253:64-75.

AIRE, T. A.; OZEGBE, P. C.; SOLEY, J. T.; MADEKUROZWA, M. C. 2008. Structural and immunohistochemical features of the epididymal duct unit of the ostrich (*Struthio camelus*). Anatomy, Histology and Embryology. 37:296-302.

AITKEN, R. J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod. Fertil. Dev. v 7. 4:659-668.

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

ARAB, L.; STECK, S. 2000. Lycopene and cardiovascular disease. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda. v 71. 1691-1695.

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

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. 2003. Atlas Colorido de Histologia Veterinária. 2ª Edição. Roca. São Paulo. 320p.

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

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. 2009. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Animal Science Pap. Rep.* v 27. 5-14.

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

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

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

BAKST, M. R.; MCGARY, S.; ESTEVEZ, I.; KNAPP, T. 2002. Use of nonsettable eggs to evaluate turkey hen fertility. *J Appl Poult Res.* v 11. 402-405.

BENDICH, A.; OLSON, J. A. 1989. Biological actions of carotenoids. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology – FASEB.* 1989. v 3. 1927-1932

.

BENZIE, I. F.F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut.* v 47. 233-261.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista Nutritime.* v 12. 2:123-130.

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

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

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

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

BONI, I. J.; PONSATI, R. M. 2005. Manejo reprodutivo de machos matrizes. In: Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Anais. Santos. 75-84.

BOWLING, E. R. et al. Attributes of boiler breeder males characterizes by low and high sperm mobility. *Poultry Science*. v 82. 1796-1801.

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

BURKE, W. H. 1996. Reprodução das Aves. In: Dukes, H. H. Dukes: fisiologia dos animais domésticos. 11ª edição. Guanabara. Rio de Janeiro. V 38. 660-680.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. 1984. Beta-caroteno: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. v 244. 569-573.

CASTELLÓ, J. A. L.; LLEONART, F. R.; CAMPO, J. L. C.; OROZCO, F. P. 1989. *Biología de la Gallina*. Real Escuela de Avicultura. 1ª ed. Espanha. 307p.

CEROLINI, S. 1997. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chicken. *Biology of Reproduction*. V 57. 5:976-980.

CEROLINI, S.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T. 2006. Effect of docosahexaenoic acid and alfa-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Theriogenology*. 66:877-886.

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

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

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

DUNCAN, I. J. H.; HOCKING, P. M.; SEAWRIGHT, E. 1990. Sexual behaviour and fertility in broiler breeder domestic fowl. *App. An. Beh. Sci*. v26. 3:201-213.

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

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

FERREIRA, P. B. 2010. Cantaxantina e 25-hidroxicolecalciferol e seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos de galos. *Dissertação de Mestrado em Zootecnia*. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. 2000. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*. 13:40-45.

FOOTE, C. S.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W. 1970. Chemistry of singlet oxygen x carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Oil Chemists Society*. v 92. 5216-5218.

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

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

GARDNER, H. W. 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free radical Biol. Med*. v 7. 65-86.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. 2004. Espermatózoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. Manole. São Paulo. 7:167-189.

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

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

GOODWIN, T. W. 1965. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press.

GOYAL, A.; CHOPRA, M.; LWALEED, B. A.; BIRCH, B.; COOPER, A. J. 2007. The effects of dietary lycopene supplementation on human seminal plasma. *BJU International*. 99:1456-1460.

GUIBERT, E.; BRIÈRE, S.; PELLETIER, R.; BRILLARD, J. P.; FROMENT, P. 1982. Characterization of chicken Sertoli cells in vitro. *Poultry Science*. 61(3):531-539.

HADLEY, C. W.; MILLER, E. C.; SCWATZ, S. J.; CLINTON, S. K. 2002. Tomatoes, lycopene and prostate cancer: progress and promise. *Experimental Biology and Medicine*.

HAFEZ, E. S. E. 1988. Reprodução animal. 4ª Edição. Manole. São Paulo. 720p.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. 2004. Reprodução Animal. 7ª Edição. Barueri. 237-257.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1985. Free radicals in Biology and Medicine. 3ª edição. Oxford University.

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

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

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

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

HORTON, H. R.; MORAN, L. H.; OCHS, R. S.; ROWN, J. D.; SCRIMGLOUR, K. G. 2002. Principles of Biochemistry. 3ª Ed. 221-222.

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

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

JOHNSON, P. A. 2006. Reprodução das aves. In: Reece, W. O. *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12ª Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 691-701.

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

KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; SPEAKE, B. K.; CAVALCHINI, L. G.; NOBLE, R. C. 1997. Effects of dietary supplementation with alpha-linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *J Reprod Fertil.* v 110. 53-59.

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

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

KRINSKY, N. I. 1998. Overview of lycopene, carotenoids and disease prevention. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* v 215. 95-97.

KRINSKY, N. I. 2001. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition.* 17:815-817.

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

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

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

LIVNY, O.; KAPLAN, I.; REIFEN, R.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. 2002. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junctional communication of KB-1 human oral tumor cells. *Journal of Nutrition*. v 132, 3754-3759.

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

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

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

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

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

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

MANGIAGALLI, M. G.; MARELLI, S. P.; GUIDOBONO CAVALCHINI, L. 2007. Effect of lycopene on fowl sperm characteristics during in vitro storage. *Archive Geflügelkunde*. 71:25-29.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res*. v 129. 597-603.

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

MATIOLI, G.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. 2003. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas. v 23.

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

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

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

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

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

MENDES, A. A.; PAZ, I. C. L. A.; MOREIRA, J. 2005. Produção e características das linhagens para corte. *Manejo de Matrizes de Corte*. FACTA. Campinas. 1:1-9.

MISHRA, M.; ACHARYA, U. R. 2004. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *J Trace Elem. Med. Biol*. 18:173-178.

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

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

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

OZEGBE, P. C.; KIMARO, W.; MADEKUROZWA, M. C.; SOLEY, J. T.; AIRE, T. A. 2010. The excurrent ducts of the testis of the emu (*Dromaius novaehollandiae*) and ostrich (*Struthio camelus*): microstereology of the epididymis and immunohistochemistry of its cytoskeletal system. *Anatomy, Histology and Embryology*. 39:07-16.

RAO, A. V.; AGARWAL, S. 2000. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of American College of Nutrition*. v 19. 5:563-569.

RENEMA, R. A. 2001. Reproductive function in the male. In: ROBINSON, F.; FASENKO, G. M.; RENEMA, R. A. *Optimizing chick production in broiler breeders*. 65-74.

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

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

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v 17. 4:631-639.

ROCK, C. L. et al. 1997. Carotenoids: biology and treatment. *Pharmacol. Ther.* v 75. 185-197.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. 2009. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v 61. 6:1302-1307.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. 1999. *A guide to carotenoid analysis in food*. ILSI Press. Washington. 37-51.

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

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M. A.; PAN, E. A. 2005. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. *Manejo de Matrizes de Corte*. FACTA. Campinas. 6:75-122.

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. 2007. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v 31. 3:307-317.

SAMUELSON, D. A. 2007. Textbook of Veterinary Histology. Saunders. 546p.

SESTI, L. A. C.; ITO, I. K. 2000. Fisiologia do sistema reprodutor. In: Berchieri, A.; Macari, M. Doença das Aves. FACTA. Campinas. 242-322.

SESTI, L. A. C. 2003. Órgãos reprodutivos e reprodução das aves domésticas. In: MACARI, M.; GONZÁLES, E. Manejo da Incubação. FACTA. Jaboticabal. 1:8-33.

SESTI, L. A. C. 2005. Biosseguridade em granjas de reprodutores. Manejo de Matrizes de Corte. FACTA. Campinas. 12:343-317

.

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

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. Journal of Urology. 48:835-850.

SOUTHON, S. 2000. Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. Food Res. Inter. v 33. 211-227.

SPITELLER, P.; SPITELLER, G. 1998. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe^{2+}/O_2 or Fe^{3+}/O_2 is used as oxidant. Biochim. Biophys. Acta. v 1392. 23-40.

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

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

SURAI, P. F. 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press.

SURAI, P. F. 2007. Natural antioxidants in poultry nutrition; new developments. 16th European Symposium on Poultry Nutrition. 669-676.

TURK, G.; ATESSAHIN, A.; SONMEZ, M.; YUCE, A.; CERIBASI, A. O. 2007. Lycopene protects against cyclosporin A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology*. 67:778-785.

VELMURUGAN, B.; SANTHIYA, S. T.; NAGINI, S. 2004. Protective effect of S-allylcysteine and lycopene in combination against N-methyl_-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity. *Polish Journal of Pharmacology*. v 56. 241-245.

VILLARREAL, L. Y. B; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; ASSAYAG, M. S.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. 2007. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. *Avian Diseases*.

VILLELA, G. G. 1976. *Pigmentos animais: Zocromos*. Editado pela Academia Brasileira de Ciências.

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

WEIR, C. P.; ROBAIRE, B. 2007. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. *Journal of Andrology*. v 28. 2:229-240.

WHITTOW, G. C. 2000. *Sturkie's avian physiology*. 5ª Edição. San Diego.

WILLIAMS, A. W.; BOILEAU, T. W. M.; ERDMAN, J. W. Jr. 1998. Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*. 76:99-111.

4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da suplementação dietética de antioxidantes sobre características reprodutivas de machos reprodutores de frango de corte.

4.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação dietética de antioxidantes em galos na fase pós-pico sobre suas características espermáticas (motilidade, volume, concentração, vigor e morfologia), sobre a morfometria de testículos, crista e barbelas, morfometria tubular e análise da proliferação celular no epitélio germinativo.

Avaliar o efeito da suplementação dietética de antioxidantes em galos na fase pós-pico a campo sobre características reprodutivas, assim como avaliar o efeito no desempenho produtivo e muscular. Avaliar o efeito da suplementação de antioxidantes sobre a fertilidade, medida através da técnica de perfuração da membrana perivitelínica.

Avaliar o efeito da suplementação dietética de licopeno sobre parâmetros reprodutivos em galos jovens e em galos velhos e analisar a interação entre a idade e o consumo do licopeno.

CAPÍTULO 1 – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DE MACHOS REPRODUTORES DE FRANGOS DE CORTECOM IDADE SUPERIOR A 50 SEMANAS.

RESUMO -Os espermatozoides de machos reprodutores de frango de corte são células propensas a peroxidação lipídica, dada à constituição biológica de sua membrana, influenciando a capacidade fertilizante do macho. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre características reprodutivas de machos reprodutores de frangos de corte com idade superior a 50 semanas. Foram utilizados 12 galos Cobb de 50 semanas de idade distribuídos aleatoriamente em um delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos (tratamento 1: ração comercial; tratamento 2: ração comercial suplementada de cantaxantina, licopeno e vitamina C) e 6 repetições. Amostras de sêmen foram coletadas pelo método de massagem abdominal e acondicionadas para avaliação de volume seminal, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. Às 68 semanas de idade, amostras de testículo foram coletadas para determinação da morfometria tubular dos testículos e para análise da proliferação celular no epitélio germinativo através de imunohistoquímica anti-PCNA. A morfometria de testículos, cristas e barbelas também foram analisadas nas 68 semanas de idade. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1999), com nível de 5% de significância. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) com a adição dos antioxidantes sobre as características seminais. Houve efeito positivo ($p < 0,05$) do *blend* de antioxidantes no percentual de espermatozoides normais (82,33% de espermatozoides normais no tratamento 2 e 75,69% no tratamento 1), no peso e largura das barbelas e no peso e comprimento dos testículos. A contagem de células PCNA-positivas e as medidas morfométrias dos túbulos seminíferos dos testículos dos galos não sofreram influência do tratamento. A adição de antioxidantes na dieta de machos reprodutores de frango de corte na fase pós-pico pode ser uma ferramenta para melhorar o índice de fertilidade do lote de matrizes por proporcionar maior percentual de espermatozoides normais.

Palavras chave: galos, peroxidação lipídica, cantaxantina, licopeno, vitamina C.

ABSTRACT- The broiler breeder males' spermatozoids are prone to lipid peroxidation because of its membrane biologic composition, basically constituted by polyunsaturated fatty acids. This fact directly influences the male's fertilizing capacity, reducing the livestock parameters related to broiler reproduction, especially

when the roosters is aged. The objective of this study was to evaluate the effect of antioxidant dietary supplementation on reproductive parameters of broiler breeder males at the post peak period. At the first experiment, 12 fifty week age Cobb roosters randomly distributed in a totally casual delineation were used with 2 treatments (commercial feed and commercial feed + antioxidant blend canthaxanthin, lycopene and vitamin C) and six repetitions. Samples of semen were collected by abdominal massage method in order to evaluate seminal volume and spermatic concentration, motility, vigor and morphology. At 68 weeks of age, testicle samples were collected to tubular morphometry determination and to analyze the cell proliferation on the germinative epithelium by PCNA technique. The testicles, combs and dewlaps morphometry was also analyzed at 68 weeks of age. The data were submitted to statistical analysis using Statistical Analysis System, with 5% of significance. It was observed a positive effect ($p < 0,05$) of the treatment on the percentage of normal spermatozoids, on the weight and width of dewlaps and on weight and length of testicles. The positive-PCNA cells count and the testicle tubular morphometry were not influenced by the treatment. The antioxidant addition to broiler breeder male's diet at the post peak period can be a tool to improve fertility at the breeders flock by keeping a major percentage of normal spermatozoids.

Keywords: male breeders, lipid peroxidation, canthaxantin, lycopene, vitamin C.

Introdução

Vários fatores contribuem com a redução da fertilidade no lote de matrizes, como a própria genética das aves, nutrição, ambiência, além de fatores de manejo, que abrangem desde a condução de peso do macho reprodutor na fase de recria, como qualidade de arraçamento, frequência de seleções, relação macho x fêmea, entre outros. Outro fator que pode influenciar em maior ou menor queda da taxa de fertilidade do lote é a própria constituição do espermatozoide e características do sêmen do galo. Bongalhardo et al (1994), estudando as características seminais dos galos, encontraram correlações positivas entre características seminais de galos e fertilidade de ovos. Maciel (2006) ratifica que as anomalias espermáticas são incompatíveis com a boa fertilidade e que qualquer alteração nas características morfológicas pode comprometer a motilidade e a sobrevivência do espermatozoide.

Os espermatozoides devem apresentar motilidade e sobreviver no ambiente vaginal da galinha para alcançar as glândulas hospedeiras de espermatozoides. Este armazenamento assegura a disponibilidade espermática e a probabilidade de fertilização (RUTZ et al, 2007).

Em todas as espécies, os fosfolípidos são os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por conter grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), fato que pode ser determinante nas taxas de fertilidade em matrizes pesadas (MARTIN RILLO et al., 1996).

Os PUFAs são materiais oxidáveis, por possuírem duplas ligações que formam radicais livres ao se juntarem ao oxigênio metabólico, dando origem aos peróxidos. De acordo com Bilodeau et al. (2002), os próprios espermatozoides e leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar espécies reativas ao oxigênio (ROS), sendo que este fator associado a alta quantidade de PUFAs na membrana plasmática tornam os espermatozoides suscetíveis aos danos oxidativos. Esse processo é chamado de peroxidação lipídica, e pode causar disfunção e morte celular (Surai, 2002). Em termos práticos, a peroxidação lipídica no sêmen pode influenciar negativamente a taxa de fertilidade do lote por diminuir a fluidez do espermatozoide peroxidado, assim como sua capacidade de fertilização (AITKEN, 1995).

Hammadeh et al. (2009) citam a presença de antioxidantes no sêmen das aves que têm como função preservar os espermatozoides das ROS, uma vez que a quantidade desses compostos no citoplasma dos espermatozoides é limitada. Dentre os antioxidantes presentes no líquido seminal, destacam-se a superóxido dismutase, catalase, glutationaperoxidase e vitaminas C e E.

Quando o balanço entre fatores oxidantes e substâncias antioxidantes está alterado, o sistema encontra-se num processo conhecido como estresse oxidativo (Kim et al., 2010), tornando o espermatozoide mais suscetível aos danos peroxidativos e, conseqüentemente, reduzindo sua capacidade de fertilização. Neste âmbito, alguns autores como Makker et al. (2009) e Bansal e Bilaspuri (2010) têm destacado a suplementação dietética de antioxidantes como vitaminas (C e E) e carotenoides como agentes redutores do estresse oxidativo.

Os carotenoides acíclicos, que possuem nove ou mais duplas ligações conjugadas, são capazes de retirar do meio espécies altamente reativas de oxigênio (MCBRIDE, 1996). Segundo Fontana et al., (2000), o licopeno e a cantaxantina

destacam-se entre os carotenoides como substâncias de alto poder sequestrante de oxigênio singlete quando comparados a outras substâncias do mesmo grupo.

Em relação à vitamina C, sua propriedade antioxidante é caracterizada pela capacidade de atuar como agente redutor, doando elétrons e reagindo rapidamente com os radicais livres. Além disso, atua em sinergia com a vitamina E, regenerando-a em sistemas biológicos como o plasma seminal.

O objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação dietética de antioxidantes sobre parâmetros reprodutivos de machos reprodutores de frango de corte.

Material e métodos

O experimento foi realizado no aviário experimental da UFPR Campus Palotina. Foram utilizados 12 galos da linhagem Cobb, com 50 semanas de idade, provenientes do mesmo lote de matrizes de uma agroindústria local. Os reprodutores foram mantidos em gaiolas (1 por gaiola) e distribuídos aleatoriamente em um delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 6 repetições.

A dieta, a base de milho e farelo de soja, foi formulada de acordo com as orientações do manual da linhagem e com a fase de vida das aves. Os tratamentos experimentais consistiram de tratamento 1: ração comercial e tratamento 2: ração comercial + 8ppm de cantaxantina (CarophyllRed; DSM NutritionalProducts) + Licopeno40ppm (Lycopene 10%; Roche Vitamins) + 150 ppm de Vitamina C (Rovimix C-EC 97,5% - DSM NutritionalProducts). No período experimental, o arraçoamento foi realizado diariamente às 8 horas da manhã, sendo fornecida a quantidade preconizada pelo manual da linhagem. A partir da segunda semana de alojamento, foi feita a estimulação diária dos galos para as coletas de sêmen para que os mesmos fossem condicionados ao procedimento. A estimulação foi realizada pelo método de massagem abdominal, conforme Burrows & Quinn (1937) e os galos foram estimulados sempre pela mesma pessoa. Foram feitas 3 coletas de sêmen ao longo do período experimental.

O sêmen foi colhido com seringa de insulina e o volume foi obtido por meio da leitura direta. Para medir a concentração de células espermáticas, foi realizada

uma diluição de 1/200 seguindo a análise da técnica de Brillard (1992). O diluente foi uma solução de formol salina tamponada, composta de citrato de sódio 29% e formol 37%. O sêmen foi analisado em cinco campos de cada lado da Câmara de Neubauer. Após obtenção da média, o valor foi multiplicado pela constante de diluição (10000) e expresso em número de células espermáticas/mm⁻³. O número total de células foi calculado pelo produto da concentração com o volume do ejaculado. A motilidade e o vigor foram estimados pela porcentagem e pelo tipo de movimento destas células em microscópio com aumento de 400x.

Nos exames morfológicos do espermatozóide foram avaliadas as ocorrências de espermatozóide normal ou anormal, com problemas na cabeça, peça intermediária ou cauda. Para este procedimento foram feitos esfregaços de sêmen corados pela solução de azul de bromofenol. Para se preparar o esfregaço juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante sendo homogeneizadas. Após 30 segundos retira-se uma gota desta mistura para se preparar o esfregaço que deve secar a temperatura ambiente antes da análise. O sêmen e o corante foram mantidos a mesma temperatura (37 °C). Foram contados 200 espermatozoides por amostra, através de microscopia óptica com lente de imersão, a um aumento de 100x.

Na última semana do experimento às 68 semanas de idade foram avaliadas crista (espessura e peso) e barbela (comprimento, largura e peso) de todos os galos. Os galos foram pesados e em seguida sacrificados. O procedimento de eutanásia dos animais experimentais seguiu as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foi realizado por meio da contenção física, seguida de fixação de cateter n. 22 na veia femoral para infusão de propofol (Propovan 10mg/mL, Laboratório Cristália) em *bolus*, até a confirmação da inconsciência. Imediatamente, administrou-se por esta mesma via, cloreto de potássio (Cloreto de potássio 19,1%, Laboratório Isofarma), até a confirmação do óbito.

Os testículos foram medidos e pesados. Em seguida, fragmentos transversais dos testículos foram mergulhados em solução de formol tamponado, incluídos em parafina e submetidos à cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Os fragmentos dos testículos foram incluídos e orientados de tal maneira que permitissem obter cortes para observação dos túbulos seminíferos e corados por hematoxilina-eosina. Para o estudo morfométrico, as imagens foram capturadas em da microscópio de

luz (Olympus BX 50), utilizando-se o sistema analisador de imagens computadorizado (ImagePro-Plus - Versão 5.2 – Média Cibernética). A área intersticial, o diâmetro e a altura do epitélio de cada túbulo seminífero foram medidos de 10 áreas de cada testículo.

Para a análise da proliferação celular no epitélio germinativo, novos fragmentos de testículos de 5 μm de espessura foram preparados em lâminas sinalizadas para detecção de células em mitose pela técnica imunohistoquímica. Para o procedimento utilizou-se anticorpo monoclonal anti-PCNA (Antígeno Nuclear da Proliferação Celular - Santa Cruz®). A reação de imunohistoquímica foi realizada conforme Gosselin et al. (1986), com modificações. De cada lâmina foram capturadas 10 imagens e quantificadas as células PCNA positivas e negativas.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (*outliers*) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Após constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002) com nível de 5% de significância. Os dados médios de número de células positivas para PCNA no epitélio dos tubos seminíferos foram avaliados considerando distribuição de Poisson com função de ligação log implementados no PROC GENMOD do SAS. .

Resultados e discussão

Os resultados da tabela 1 demonstram que não houve efeito da adição do *blend* de antioxidantes sobre o volume, a motilidade, o vigor e a concentração espermáticas. Essas características parecem ter relação com o número de células de Sertoli, produzidas na fase pré-puberal do galo e que influenciam diretamente no tamanho testicular e na produção de sêmen (ETCHES, 1996). Uma vez que a suplementação iniciou-se no período pós-pico, as características avaliadas não foram alterados com a suplementação do *blend* de antioxidantes.

Tabela 1. Características seminais de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com *blend* de antioxidantes

	Volume, ml	Motilidade %	Vigor (escore)	Concentração bilhões sptz/ml
Controle	0,25	86,67	4,06	3,393
Blend antioxidante	0,24	87,39	4,44	4,693
CV %	62,47	5,30	12,28	92,00
Valor de P	0,8789	0,7578	0,0723	0,2988

Akhlaghi et al. (2014), buscando melhores parâmetros reprodutivos frente a suplementação de compostos com propriedades antioxidantes não encontraram efeito do tratamento sobre a concentração e viabilidade espermáticas, o que segundo estes autores, foi devido a idade dos galos, semelhante a idade dos galos deste experimento.

Em relação à avaliação da morfologia espermática, observou-se, conforme Tabela 2, que os galos suplementados com o *blend* de antioxidantes apresentaram um maior percentual de espermatozoides normais quando comparados com o grupo controle. Os percentuais de espermatozoides normais tanto do grupo controle como do tratamento com antioxidantes ficaram próximos a faixa encontrada por (LUKASZEWICS, 2008).

Espermatozoides anormais podem ter sua motilidade e até sua sobrevivência comprometidas, portanto, o quão maior for o percentual de espermatozoides normais melhor será o índice de fertilidade do lote (MACIEL, 2006). O percentual maior de espermatozoides anormais no grupo controle em relação ao grupo tratamento pode ter ocorrido devido à menor proteção antioxidante em relação ao grupo que recebeu o *blend* de antioxidantes, uma vez que, devido à composição lipídica dos espermatozoides, a predisposição a peroxidação é maior em sistemas menos protegidos.

Tabela 2. Defeitos espermáticos (%) de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com *blend* de antioxidantes.

	Normal	Cabeça	Cauda	Peça intermediária
Controle	75,69 ^b	10,5	11,06	2,75
Blend antioxidante	82,33 ^a	7,92	8,17	1,58
CV %	5,22	25,39	28,82	60,92
Valor de P	0,0366	0,0849	0,1829	0,8366

Os resultados da biometria de barbelas, cristas e testículos estão demonstrados na Tabela 3. Os galos do grupo que receberam o *blend* de antioxidantes apresentaram peso e comprimento de testículos maiores ($p < 0,05$) que os galos do grupo controle. Os parâmetros peso e largura de barbela, assim como peso de crista também foram maiores ($p < 0,05$) no grupo tratamento.

Há uma correlação positiva entre o peso dos testículos e a produção espermática (MCGARY, 2002). Esse pode ser um dos fatores que diferenciam o índice de fertilidade do lote. As características de crista e barbelas são amplamente observadas como maneira de avaliação fenotípica da condição sexual de machos de um lote de matrizes. Em relação à biometria de crista e barbela, McGary & Brougher (2005) relacionando características sexuais secundárias a fatores como fertilidade, peso dos testículos e penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica e concluíram que há correlação positiva entre peso testicular e área de crista, assim como altura de crista e comprimento de barbela com penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica.

Considerando estas observações, os resultados apresentados na Tabela 3 são um indicativo de que a suplementação de antioxidantes pode influenciar positivamente a taxa de fertilidade no lote de matrizes e, ainda, que a observação de características sexuais secundárias (cristas e barbelas) pode ser critério de eliminação de galos do plantel por não apresentarem condições satisfatórias para a reprodução, principalmente quando o lote tem idade avançada e a relação macho x fêmea preconizada é menor.

Tabela 3. Biometria da barbela (peso, comprimento e largura), crista (espessura e peso) e testículos (peso, comprimento e largura) de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com blend de antioxidantes.

	Barbela			Crista		Testículo		
	Peso(g)	Compr. (cm)	Larg. (cm)	Espes. (mm)	Peso (g)	Peso (g)	Compr. (cm)	Larg. (cm)
Controle	13,66 ^b	6,50	5,79 ^b	47,32	12,18	19,09 ^b	3,73 ^b	2,30
Blend antiox.	21,18 ^a	7,33	7,18 ^a	66,89	14,33	32,73 ^a	4,66 ^a	2,66
CV, %	25,52	11,01	12,78	28,97	19,75	23,07	11,36	14,4
Valor de P	0,010	0,274	0,008	0,359	0,148	0,001	0,004	0,097

Tabela 4. Medidas morfométricas dos túbulos seminíferos e contagem de células PCNA-positivas de testículos de galos suplementados ou não com blend de antioxidantes.

	Área intersticial(μm^2)	Diâmetro (μm)	Epitélio(μm)	Células PCNA-positivas
Controle	131,89	442,60	116,34	97,1
Blend antioxidante	119,97	440,77	103,85	80,2
CV %	23,45	12,33	17,89	18,23
Valor de P	0,346	0,224	0,122	0,098

Um dos meios utilizados para identificar quantitativamente e de maneira mais sensível as injúrias testiculares, dentre elas danos causados pela peroxidação lipídica, é o PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (D'ANDREA et al, 2008). Esta análise proporciona avaliação da condição testicular pouco tempo após a injúria sofrida pelo testículo, diferentemente de análises de volume e concentração. PCNA é um cofator do DNA polimerase e necessário para a síntese do DNA, tendo papel crítico no início da proliferação testicular (CELIS&CELIS, 1985).

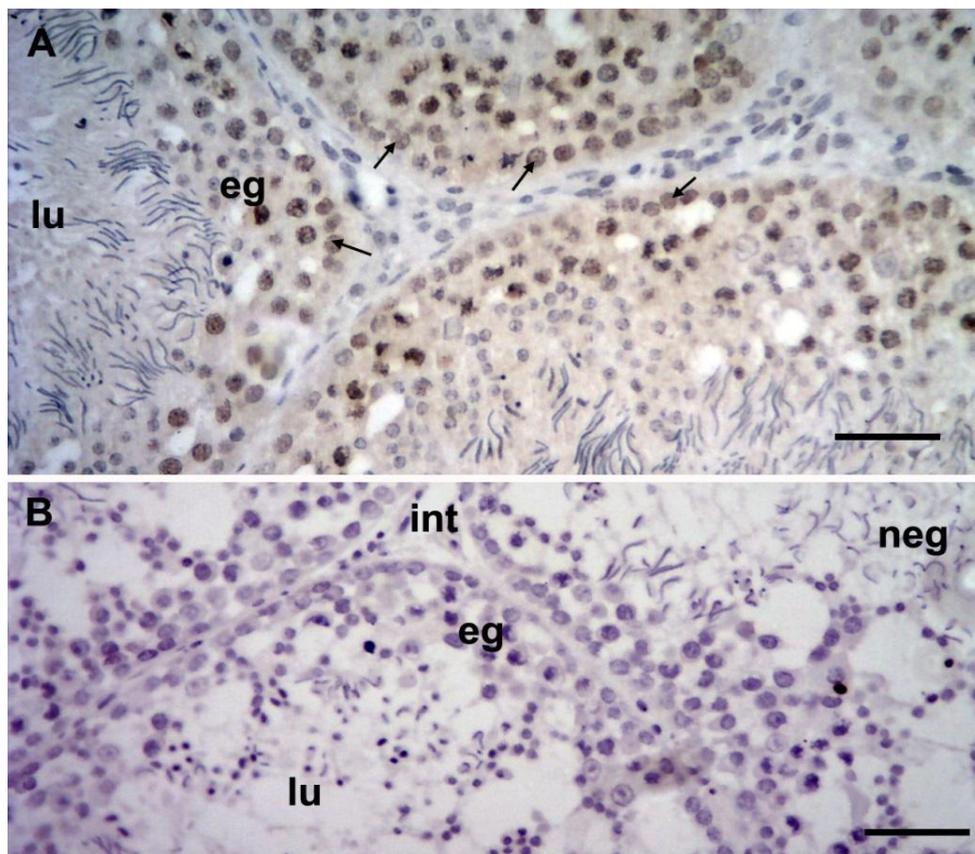


Figura 01. – Corte histológico em que são evidenciados o epitélio germinativo (eg) e o lúmen (lu) dos túbulos seminíferos de testículo de galo suplementados com *blend* de antioxidantes. A) Notam-se os núcleos positivos (setas) para a imunohistoquímica anti-PCNA corados em marron por DAB e os núcleos negativos contracorados por Hematoxilina. B) Controle negativo (neg) em que se omitiu o anticorpo primário. Barra 30 µm.

Os resultados de medidas morfométricas dos túbulos seminíferos e da contagem de células PCNA-positivas estão descritos na Tabela 4. A suplementação dietética do *blend* de antioxidantes não influenciou significativamente estes parâmetros. O PCNA é um cofator da DNA polimerase e necessário para a síntese do mesmo, tendo assim papel fundamental na proliferação celular (Jaskulskiet al., 1988). Este método é utilizado para detectar precocemente injúrias testiculares, as quais parecem não ter manifestado diferenças significativas entre os grupos tratamento e controle durante o experimento. Em relação à morfometria dos túbulos, Gonzáles-Moran (2008) explica que até as 12 semanas de vida do galo os túbulos seminíferos dos testículos são formados apenas por uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias, evoluindo, na medida em que o animal amadurece, para um epitélio seminífero estratificado e notória redução de tecido intersticial no galo sexualmente maduro. A suplementação de antioxidantes desde a fase inicial da

vida do galo, e não apenas na fase pós-pico como neste experimento, poderia surtir algum efeito na morfometria tubular.

Conclusões

A adição de antioxidantes na dieta de machos reprodutores de frango de corte na fase pós-pico pode ser uma ferramenta para melhorar o índice de fertilidade do lote de matrizes por proporcionar maior percentual de espermatozoides normais.

Características biométricas de crista, barbela e testículos foram superiores quando os machos recebem suplementação de antioxidantes em sua dieta.

Referências

AITKEN, R. J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* v 7. 4:659-668.

AKHLAGHI, A.; JAFARI AHANGARI, Y.; NAVIDSHAD, B.; ANSARI PIRSARAEI, Z.; ZHANDI, M.; DELDAR, H.; REZVANI, M. R.; DADPASAND, M.; HASHEMI, S.R.; POURESLAMI, R.; PEEBLES, E. D. 2014. Improvements in semen quality, sperm fatty acids, and reproductive performance in aged Cobb 500 breeder roosters fed diets containing dried ginger rhizomes (*Zingiber officinale*). *Poultry Science Association.* 93:1236-1243.

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

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

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

BONGALHARDO, D. C. et al. 1994. Repetibilidade e correlações fenotípicas do caráter volume de sêmen de galos White Leghorn. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. v 23. 6:1002-1007.

CANOVAS, 2008. Efeito spiking e intraspiking na fertilidade. In: CARVALHO, C. R. F. *Fertilidade em Reprodutoras Pesadas*. Disponível em: <http://www.nftalliance.com.br/artigos/aves/fertilidade-em-reprodutoras-pesadas>. Publicado em 24/07/2012.

CELIS, J. E.; CELIS, A. 1985. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S-phase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:3262-3266.

D'ANDREA, M.R.; LAWRENCE, D.; NAGELE, R. G.; WANG, C.Y; DAMIANO, B. P. 2008. PCNA indexing as a preclinical biomarker for testicular toxicity. *Biotechnic and Histochemistry*. v 83. 5:211-220.

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

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. 2000. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*. 13:40-45.

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

GOSELIN, E. J.; CATE, C. C; PETTENGIL, O. S.; SORENSON, G. D. 1986. Immunocytochemistry: its evaluation and criteria for its application in the study of epon-embedded cell and tissue. *American Journal of Anatomy*, Philadelphia, v 175. 2-3:135-160.

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

JASKULSKI, D.; DERIEL, J. K.; MERCER, W. E.; CALABRETTA, B.; BASERGA, R. 1988. Inhibition of cellular proliferation by anisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science*. 240:1544-1546.

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

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

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

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res.* v 129. 597-603.

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

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

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

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

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. 2007. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v 31. 3:307-317.

SURAI, P. F. 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University Press.

CAPÍTULO 2 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA DIETA DE REPRODUTORES DE FRANGOS DE CORTE COM IDADE SUPERIOR A 50 SEMANAS SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS E O DESEMPENHO PRODUTIVO E MUSCULAR DA PROGÊNIE.

RESUMO -A adição de substâncias antioxidantes nas dietas para reprodutores pode, além de exercer efeitos benéficos na proteção da célula espermática frente à ação de radicais livres, melhorar os índices de fertilidade e proteger o DNA espermático dos efeitos oxidativos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de antioxidantes em dietas de reprodutores machos de frangos de corte na fase pós-pico sobre características reprodutivas e o desempenho produtivo e muscular da progênie. O experimento foi conduzido no matrizeiro de uma Agroindústria local. Foi selecionado um núcleo de produção com 4 aviários contendo. Em 2 aviários, os galos receberam dieta comercial para machos e nos outros 2 aviários, os galos receberam a dieta suplementada com antioxidantes (8ppm de cantaxantina + 40 ppm de licopeno + 150 ppm de vitamina C). Na 62ª semana, foram retirados fragmentos da membrana vitelínica sobre o disco germinativo dos ovos para contagem do número de perfurações espermáticas. Foi observado um maior ($p < 0,05$) número de perfurações nos ovos oriundos dos aviários cujos galos receberam antioxidantes na dieta. Na 68ª semana, os galos foram sacrificados e a crista, barbela, peito e testículos foram pesados e medidos. Na 66ª semana de idade, os ovos foram incubados e a progênie foi alojada no aviário experimental de acordo com o delineamento experimental dos reprodutores com 2 tratamentos e 12 repetições com 12 aves cada. Aos 7 dias de idade, foram sacrificadas 24 aves por tratamento para contagem do número de fibras e a mensuração do diâmetros das fibras musculares. Não houve efeito significativo ($p > 0,05$) da suplementação do blend de antioxidantes na dieta dos reprodutores sobre o ganho de peso e o peso de peito da progênie aos 7 dias de idade. A contagem e diâmetro da fibra muscular não diferiram ($p > 0,05$) entre a progênie oriunda de galos suplementados ou não. A conversão alimentar e ganho de peso na fase de 14 – 35 dias foram melhores ($p < 0,05$) para a progênie dos reprodutores suplementados.

Palavras chave: reprodução, peroxidação lipídica, antioxidantes, espermatozoides, progênie.

ABSTRACT-The addition of antioxidants on reproducers diets can, besides the beneficial effects provided to spermatic cell front of free radicals action, improve the fertility rates and to protect the spermatic DNA from oxidative effects. During DNA replication, which precedes meiosis, the germinative mutation, occurred from the free radical injuries, can affect the spermatozoids and all the cells that appear after fecundation, being transmitted to progeny. The objective of this study was to evaluate the antioxidants supplementation on broiler breeder males' diets at the post

peak period on reproductive parameters and on productive and muscular performance of the progeny. For the experiment, a breeder farm containing 4 houses were chosen. In two of them, the roosters received a commercial male diet and in the other two houses the roosters received a antioxidant supplemented feed (canthaxanthin 8 ppm + Lycopene 40ppm + Vitamin C 150 ppm). At 62 week age, fragments from the vitellinic membrane were taken to spermatic perforations count. It was observed a higher ($p < 0,05$) number of perforations in the eggs that came from the houses where the roosters had the antioxidant diet. Fertile eggs were set and the progeny was housed at the experimental barn according to the breeder males delineation with 2 treatments and 12 repetitions with 12 chicks each. At seven days of age, 24 birds per treatment were euthanatized in order to count the number of fibers and to measure the muscular fibers diameter. There was no significant effect ($p > 0,05$) from the breeder male antioxidant supplementation on the 7 day progeny gain of weight and chest weight. The muscular fiber counting and diameter did not differed ($p > 0,05$) between the progeny derived from the supplemented roosters and the control one. The feed conversion and gain of weight of the progeny between the 14 and 35 days of age were better ($p < 0,05$) to the progeny derived from the supplemented males. At the third experiment, 24 Cobb roosters were used, 12 with 25 weeks of age and 12 with 50 weeks of age and distributed in a totally casual delineation in factorial system 2 x 2 (ages and diets) adding 4 treatments and 6 repetitions of 1 bird each. The lycopene were provided at 72 ppm (Lycopene 10%, Roche Vitamins). After 12 weeks of supplementation, the semen was collected by abdominal massage mthod. The semen analysis, semen volume, spermatic concentration and motility were made right after the collect. All the roosters were euthanized in order to testicle, comb, dewlaps and chest measurement and weighing. Fragments from the testicles were fixed, paraffin blocked, cut and put on marked blades to mitosis cells detection by immunohistochemistry technique. The comb length and width from the younger roosters were bigger ($p < 0,05$) compared to the older roosters, independently from the lycopene added to the diet. The same result was observed to testicle weight, length and thickness. In the interaction unfolding of age and treatment, it was observed that the inclusion of lycopene increased ($p < 0,05$) the weight of the 50 week age roosters. The lycopene added to the diet, independently from the males' age increased the number of positive-PCNA cells in the testicles. The using of specific diets to male is highly viable, not only by the well-known benefits about nutrition requirements on eclodibility and fertility, but also to make possible the use of additives, once the volume of feed for the male is smaller than the female feed.

Keywords: reproduction, lipid peroxidation, antioxidants, spermatozoids, progeny

Introdução

Os aspectos voltados ao processo reprodutivo são de grande importância, considerando que exercem influência não somente sobre a produtividade dos

reprodutores, mas também no desenvolvimento de futuras progênie. O macho tem um papel fundamental num sistema de criação de matrizes pesadas. Ele tem como objetivo principal fertilizar o ovo da galinha e transferir todo o seu potencial genético para sua progênie (MENDES et al., 2005). Segundo Leandro et al. (2006), o maior peso inicial do pinto de corte favorece o desempenho posterior de frangos e resulta em maior peso final de carcaça. Além do fator qualidade do pinto de 1 dia, os parâmetros reprodutivos dos lotes de matrizes têm um peso significativo na composição dos custos de produção.

Espera-se dos machos reprodutores de frango de corte libido para copular com as fêmeas e que seus espermatozoides apresentem motilidade e possam sobreviver no ambiente vaginal das reprodutoras (RUTZ et al., 2007). Kelso et al. (1997) citam que não só em aves, mas em todas as espécies, os espermatozoides, compostos basicamente por fosfolipídeos, caracterizam-se por conter grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's). Estes ácidos graxos insaturados proporcionam fluidez que é necessária para os eventos de fusão da membrana (por exemplo, a reação do acrosoma e a interação esperma-ovo), e para a motilidade do esperma (MENEZO et al., 2007). Por outro lado, os PUFA's predisõem a peroxidação lipídica, com conseqüente risco de danos à estrutura celular e influenciando diretamente na fertilidade do lote (MARTIN RILLO et al., 1996). Esse processo é favorecido pela presença das espécies reativas ao oxigênio (ROS), geradas durante o metabolismo aeróbio do organismo (KIM et al., 2010).

Acredita-se que os danos causados pela peroxidação dos lipídios dos espermatozoides sejam a principal causa de subfertilidade dos machos (HAMMERSTEDT, 1993). Esta situação acentua-se com o avançar da idade dos machos. Além de se observar redução de espermatozoides no ejaculado, estas células apresentam redução da motilidade, viabilidade e integridade (IAFFALDANO et al., 2003). Estas condições não só diminuem a capacidade fertilizante do macho como também comprometem a sobrevivência dos espermatozoides no ambiente vaginal da galinha. (DE AMBROGI et al., 2006).

O sistema antioxidante presente no sêmen, responsável por reduzir os efeitos da peroxidação lipídica e manter a integridade e função espermáticas, é composto basicamente por vitaminas C e E e ainda algumas enzimas, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase (MAKKER et al., 2009). Este sistema atuará neutralizando as espécies reativas ao oxigênio (ROS) e regenerando

os antioxidantes principalmente as vitaminas C e E (HAMMADEH et al., 2009). Para suprir a possível limitação do sistema antioxidante do sêmen aditivos com essa função podem ser utilizados na dieta dos machos. Dentre os aditivos antioxidantes, Bansal e Bilaspuri (2010) destacaram para redução do estresse oxidativo dos espermatozoides as vitaminas C e E e os carotenoides.

Os carotenoides são moléculas orgânicas com funções pigmentantes e antioxidantes e, uma vez que não são sintetizados pelas aves, devem ser adicionados através da dieta (BENDICH e OLSON, 1989). Ainda segundo esse autor, a concentração de carotenoides a dieta está relacionada diretamente com sua concentração nos tecidos. Os carotenoides atuam removendo radicais livres e como atenuadores físicos, absorvendo e dissipando o excesso de energia das ROS (BÖHM, et al., 1997).

Alguns autores demonstraram efeitos na progênie utilizando-se carotenoides na dieta de matrizes fêmeas. Surai (2003) demonstrou, incluindo a cantaxantina na dieta materna, redução na suscetibilidade de tecidos de pintos de 1 dia à peroxidação lipídica. Em relação à reprodução, Souza et al. (2008) demonstraram redução no número de ovos inférteis e também na mortalidade embrionária ao adicionar cantaxantina na dieta de matrizes.

Em contrapartida, são poucos os estudos avaliando a inclusão de antioxidantes na dieta dos machos com o intuito de avaliar o desempenho da progênie. Nos processos de melhoramento genético, o trabalho de seleção é feito tanto na linha macho quanto na linha fêmea, de acordo com as características que estão sendo trabalhadas, em ordem de importância. As três características mais selecionadas em machos, segundo Mendes (2005), são: crescimento muscular, conversão alimentar e conformação e rendimento de carcaça. Neste âmbito, melhores espermatozoides poderiam influenciar em melhores índices para essas características na progênie. De acordo com Gonzáles e Sartori (2002), os mecanismos que regulam o número, tipo e tamanho das fibras musculares são fundamentais para o entendimento do desenvolvimento muscular. Esses autores afirmam que o número de fibras em frangos de corte aumenta com o ganho de peso e que machos tendem a apresentar maior diâmetro de fibra.

Os objetivos desse estudo foram avaliar a inclusão de antioxidantes na dieta de machos reprodutores de frango de corte com idade acima de 50 semanas sobre parâmetros reprodutivos e sobre o desempenho produtivo e muscular da progênie.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em um núcleo de matrizes de uma agroindústria localizada na região oeste do estado do Paraná. Foi selecionado um núcleo de matrizes na fase produção com 4 aviários contendo em cada aviário 9000 matrizes fêmeas e 1000 machos reprodutores. A idade do lote onde aconteceu o experimento era de 50 semanas. Em 2 aviários, os galos receberam dieta comercial específica para machos e nos outros 2 aviários, os galos receberam a dieta suplementada com antioxidantes. Os tratamentos foram compostos por: A - ração comercial e B – ração comercial + blend composto por 8ppm de cantaxantina (CarophyllRed 10%; DSM NutritionalProducts) + licopeno 40ppm (Lycopene 10%; Roche Vitamins) + 150 ppm de vitamina C (Rovimix C-EC 97,5% - DSM NutritionalProducts).

Às 62 semanas, ovos de cada galpão (60 ovos/tratamento) foram enviados ao Laboratório de Experimentação Avícola da UFPR para avaliação da perfuração da membrana perivitelínica. Após a localização da membrana perivitelínica, um corte de 1 cm² foi feito ao redor desta e sucessivas lavagens com solução salina foram feitas para a retirada da gema e do albúmen aderidos. Após a colocação na lâmina, fixou-se a membrana com formaldeído e corou-se a mesma com reativo de Schiff para leitura em microscópio óptico na lente de aumento de 40 vezes.

Na 66^a semana foram coletados ovos dos 4 aviários. Os ovos foram identificados e incubados em incubatório comercial da mesma agroindústria. Foram utilizados 288 pintos de corte machos de 1 dia de idade, os quais foram alojados de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 6 repetições com 24 aves cada. Os tratamentos foram compostos por: A - progênie oriunda de galos alimentados com ração comercial e B: – progênie oriunda de galos alimentados com ração comercial e suplementados com blend de antioxidantes. A ração e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período experimental.

O programa nutricional foi dividido em duas fases, uma inicial (1 a 21 dias) e outra de crescimento e final (22 a 42 dias). Essas dietas, à base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com os valores de composição química dos alimentos e as recomendações nutricionais das Agroindústrias locais. Foram

registrados o peso médio das aves e o consumo de ração, por parcela experimental, aos 7, 14 e 35 dias de idade das aves e calculada a conversão alimentar.

Aos 7 dias foram sacrificadas 4 aves por repetição (24 aves por tratamento) por deslocamento cervical. Após a pesagem das aves e do peito, foram retiradas amostras da porção superficial do músculo Peitoral menor esquerdo. Fragmentos de aproximadamente 1 cm x 0,5 cm, foram imersos em n-hexana, resfriadas a -70°C, em nitrogênio líquido.

A partir do 15º dia de vida, as aves foram realocadas de acordo com o delineamento: 2 tratamentos e 12 repetições de 10 aves cada.

Para determinação do rendimento de carcaça, foram identificadas 2 aves de cada unidade experimental e submetidas ao jejum alimentar por seis horas. Para o cálculo de rendimento de carcaça, foi considerado o peso da carcaça eviscerada quente, sem os pés, cabeça e gordura abdominal, em relação ao peso vivo. Para o rendimento dos cortes nobres, foi considerado o rendimento do peito inteiro com pele e ossos e das pernas (coxa e sobrecoxa com ossos e pele) que foi calculado em relação ao peso da carcaça eviscerada. A gordura abdominal presente ao redor da cloaca, da bolsa cloacal, moela, proventrículo e dos músculos abdominais adjacentes foi retirada e pesada e também calculada em relação ao peso da carcaça eviscerada.

Os segmentos de músculo obtidos aos 7 dias de idade e congelados em nitrogênio líquido foram orientados para a obtenção de cortes transversais das fibras em criostato. Após o processamento, as amostras foram utilizadas para cálculo do número de fibras do músculo e os diâmetros das fibras foram mensurados para avaliar o grau de hipertrofia, utilizando-se para isso o método do menor diâmetro das fibras. Os cortes (8 micrômetros de espessura) foram corados com Hematoxilina e Eosina.

Foram analisadas 500 fibras por lâmina, com ampliação final equivalente a ocular 10X e objetiva 40X. A captura de imagens para análise morfométrica foi realizada através de câmera digital de alta resolução PRO SERIES da Mídia Cibertecnics, acoplada ao microscópio OlympusBx 40. Para a leitura das imagens foi utilizado um analisador de imagem computadorizado IMAGE PROPLUS 4.1, da Mídia Cibertecnics.

Após 18 semanas de suplementação os galos foram pesados e em seguida sacrificados. O procedimento de eutanásia dos animais experimentais seguiu as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foi realizado por meio da contenção física, seguida de fixação de cateter n. 22 na veia femoral para infusão de propofol (Propovan 10mg/mL, Laboratório Cristália) em bolus, até a confirmação da inconsciência. Imediatamente, administrou-se por esta mesma via, cloreto de potássio (Cloreto de potássio 19,1%, Laboratório Isofarma), até a confirmação do óbito. Em seguida foram avaliadas as cristas (peso, comprimento e espessura) e barbela (peso, comprimento e espessura) de todos os galos. O peito e testículos foram extraídos da carcaça e pesados.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (*outliers*) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Após constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002) com nível de 5% de significância.

Resultados e discussão

Os resultados de biometria de testículo, crista e barbelas estão descritos na Tabela 1. O peso de testículo, crista e barbelas, assim como a espessura de barbelas foi maior ($p < 0,05$) em galos suplementados com o *blend* de antioxidantes. Muitos estudos procuram relacionar as características sexuais secundárias de machos com capacidade fertilizante do macho. McGary et al. (2002) relatam que o peso testicular está diretamente associado com a produção espermática diária e com a taxa de fertilidade do plantel. McGary Brougher et al. (2005), relacionando características sexuais secundárias a fatores como fertilidade, peso dos testículos e penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica concluíram que há correlação positiva entre peso testicular e área de crista, assim como altura de crista e comprimento de barbela com penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica.

Na tabela 2, observa-se que os galos suplementados com o *blend* de antioxidantes apresentaram maior peso corporal e maior relação de peso de testículo sobre o peso corporal. O percentual de peito em relação ao peso dos galos não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$).

Em relação ao número de perfurações espermáticas na membrana vitelínica (Figura 1), os ovos oriundos de galpões com galos suplementados com o *blend* de antioxidantes apresentaram maior número em comparação ao controle. Essas perfurações, segundo Waclawek et al. (1998) são um orifícios hidrolisados pelos quais os espermatozoides penetraram o oócito. As perfurações na membrana vitelínica são causadas pela liberação de enzimas pelos espermatozoides para hidrolisar a membrana e atingir o núcleo. As aves são sabidamente poliespermáticas e um único ovo pode conter centenas de perfurações. Esse método, citado por Baskt et al., (2002), consiste na avaliação microscópica da membrana perivitelínica que cobre o disco germinativo, verificando perfurações espermáticas na primeira estrutura.

Tabela 1. Medidas morfométricas de crista, barbela e testículos de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.

	Testículo		
	Peso(g)	Comprimento (cm)	Espessura (cm)
Controle	11,20 ^b	2,22	1,23
Blend antioxidante	17,19 ^a	3,53	1,74
CV, %	42,34	35,50	33,98
Valor de p	0,0484	0,2310	0,1107
	Barbela		
	Peso (g)	Comprimento (cm)	Espessura (mm)
Controle	9,13 ^b	6,38	3,59 ^b
Blend antioxidante	16,26 ^a	5,28	4,96 ^a
CV, %	24,56	14,78	21,32
Valor de p	0,0296	0,0516	0,0261
	Crista		
	Peso(g)	Comprimento (cm)	Espessura (mm)
Controle	18,57 ^b	5,48	10,55
Blend antioxidante	30,37 ^a	6,72	10,90
CV, %	18,98	19,48	10,56
Valor de p	0,0332	0,1014	0,6053

Tabela 2. Medidas Peso vivo, rendimento de peito e de testículos e contagem do número de perfurações espermáticas na membrana vitelínica dos ovos oriundos de matrizes acasaladas com galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.

	Peso vivo(kg)	% peito	% testículo	Número de perfurações
Controle	3,84 ^b	21,48	0,17 ^b	25,30
Blend antioxidante	4,69 ^a	22,68	0,35 ^a	53,35
CV, %	13,51	17,98	34,56	46,63
Valor de p	*	ns	*	**

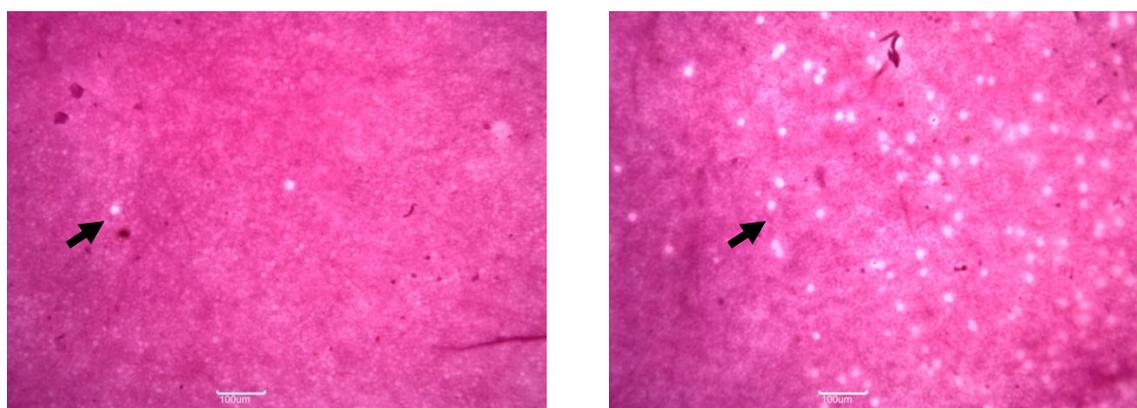


Figura 1. Fotomicroscopia de membrana perivitelínica de ovo fértil – perfurações espermáticas na membrana perivitelínica. A) Observa-se a presença de um menor número de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica dos ovos férteis provenientes dos aviários sem suplementação com antioxidantes. B) número significativamente maior de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica dos ovos férteis provenientes dos aviários suplementados com *blend* de antioxidantes.

Esse método é importante para comparar a fertilidade em situações experimentais ou de campo submetidas a diferentes variáveis, como o teste realizado no presente experimento. Segundo Rutz et al (2007), os espermatozoides devem ser capazes de penetrar a membrana perivitelínica para fertilizar o óvulo. A peroxidação lipídica é uma das principais causas de danos à morfologia espermática, podendo influenciar na motilidade e penetração do espermatozoide na membrana perivitelínica, comprometendo a fertilidade do lote (MACIEL, 2006).

Apesar do conhecimento de que apenas um espermatozoide seja necessário para fertilizar um ovo, alguns autores (ROBERTSON, et al., 1998; CRISTHENSEN & FAIRCHILD, 2005, MALGORZATA et al., 2005) correlacionam o número de

perfurações espermáticas com baixas taxas de fertilidade e altos índices de mortalidade embrionária.

O aumento no número de perfurações está diretamente ligado ao número de espermatozoides que conseguem atingir o oócito no infundíbulo, indicando, desta forma, de maneira indireta a capacidade reprodutiva dos galos. Os resultados sugerem que adicionar antioxidantes na ração de galos reprodutores acarreta em um aumento no número de espermatozoides produzidos pelos machos ou que as células depositadas na vagina tiveram melhores condições de sobrevivência no oviduto e conseguiram atingir o infundíbulo logo após a ovulação.

Um outro método para estudar e quantificar a eficiência reprodutiva em aves é estimar o número de espermatozoides que interagem com o oócito, no infundíbulo, como, por exemplo, o número de espermatozoides na membrana vitelínica externa. Utilizando essa metodologia, Murakami et al (2013) não observaram diferenças na contagem espermatozoides na membrana vitelínica de ovos férteis de matrizes (fêmeas e machos) suplementados com vitamina E. O fato da suplementação ter sido realizada também em fêmeas pode ter interferido no resultado.

Os resultados de desempenho produtivo da progênie estão demonstrados na Tabela 3. Observa-se que houve efeito significativo ($p < 0,05$) da inclusão de antioxidantes na dieta do reprodutor sobre o ganho de peso e conversão alimentar dos 14 aos 35 dias. Mendes et al. (2005) explicam que essas características estão ligadas mais aos machos que às fêmeas, o que justificaria um melhor desempenho da progênie quando esta fosse oriunda de machos com melhor qualidade seminal. Mais estudos, entretanto, devem avaliar os efeitos da suplementação de antioxidantes na dieta do macho reprodutor sobre a progênie. Barreto et al. (1997), avaliando níveis de vitamina E na dieta de fêmeas reprodutoras concluíram que a progênie apresenta melhores índices zootécnicos quando a matriz recebe a suplementação da vitamina. Fernandes et al. (2010), também observaram efeitos positivos após a suplementação dietética de vitamina E em matriz sobre a qualidade da carne da progênie. As pesquisas relacionando dieta do macho reprodutor sobre a progênie são escassos.

Tabela 3. Desempenho produtivo da progênie de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.

	Consumo de ração(g)	Ganho de	
		peso(g)	Conversão alimentar
1 a 7 dias			
Controle	176,18	154,99	1,140
Antioxidantes	172,72	152,81	1,130
Média	174,45	153,90	1,134
CV, %	5,53	3,44	4,92
Valor de P	0,5487	0,4912	0,8676
1 a 14 dias			
Controle	490,92	361,08	1,363
Antioxidantes	486,62	361,83	1,352
Média	488,77	361,46	1,358
CV, %	4,03	7,45	8,57
Valor de P	0,7133	0,5280	0,8543
14 a 35 dias			
Controle	2456,40	1595,73 ^b	1,550 ^a
Antioxidantes	2405,69	1673,91 ^a	1,450 ^b
Média	2431,04	1634,82	1,500
CV, %	7,97	6,55	12,45
Valor de P	0,5280	0,0575	0,0207

Na avaliação de desenvolvimento muscular aos 7 dias (Tabela 4), foram mensurados número e diâmetro de fibras musculares, assim como peso e rendimento de peito. Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos tratamento e controle.

Tabela 4. Avaliação do desenvolvimento muscular aos 7 dias da progênie de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.

	Peito, g	Peito, %	Número de fibras	
			Musculares	Diâmetro de fibras musculares, μm
1 a 7 dias				
Controle	32,79	15,73	126,87	77,06
Antioxidantes	31,05	15,48	124,28	76,43
Média	31,94	15,61	125,66	76,78
CV, %	9,45	5,66	11,48	10,86
Valor de P	0,1741	0,3306	0,6284	0,8381

Na Tabela 5, os dados referentes ao rendimento de carcaça aos 35 dias da progênie de galos em idade pós-pico suplementados ou não com antioxidantes. Não houve efeito do tratamento ($p>0,05$) sobre essas características.

Tabela 5. Rendimento de carcaça aos 35 dias da progênie de galos em idade superior a 50 semanas suplementados ou não com antioxidantes.

	Carcaça(g)	Carcaça(%)	Peito(g)	Peito (%)	Pernas (g)	Pernas (%)
Controle	1645,17	73,31	608,50	36,95	461,08	28,06
Antioxidantes	1646,08	73,06	619,33	37,62	449,75	27,35
Média	1645,63	73,18	613,92	37,29	455,42	27,71
CV, %	6,03	5,36	8,71	5,36	5,88	4,63
Valor de P	0,9746	0,8260	0,4866	0,2529	0,1496	0,079

Com relação aos resultados de desenvolvimento muscular e rendimento de carcaça da progênie, apresentados nas tabelas 4 e 5, mesmo sabendo-se que características de desenvolvimento muscular e crescimento estão relacionadas mais aos machos que às fêmeas (Mendes et al., 2005), a suplementação de antioxidantes a dieta do reprodutor parece não influenciar no desempenho da progênie nessas variáveis avaliadas.

Conclusões

A suplementação de *blend* de antioxidantes composto por Cantaxantina, Vitamina C e Licopeno em machos reprodutores de frango de corte resulta em maior peso corporal e de testículos nessas aves. Características sexuais secundárias como peso de crista, peso e espessura de barbelas apresentaram maior valor em galos suplementados com o *blend* de antioxidantes em relação ao grupo controle.

Ovos provenientes de galpões onde os galos foram suplementados com *blend* de antioxidantes apresentaram maior quantidade de perfurações espermáticas em membrana perivitelínica, indicando a possibilidade de ganhos em fertilidade utilizando esses aditivos.

A suplementação do *blend* de antioxidantes em machos reprodutores de frango de corte não influenciou desempenho muscular da progênie. No entanto, a progênie oriunda dos galos suplementados apresentou maior ganho de peso e menor conversão alimentar entre os 14 e 35 dias de idade.

Referências

BAKST, M. R.; MCGARY, S.; ESTEVEZ, I.; KNAPP, T. 2002. Use of nonsettable eggs to evaluate turkey hen fertility. *J Appl Poult Res.* v 11. 402-405.

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

BARRETO, S. L. T.; HOSSAIN, S. M.; MOURÃO, G. B. 1997. Níveis de vitamina E na dieta e desempenho produtivo e reprodutivo de reprodutoras de frango de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 51(2):193-199.

BENDICH, A.; OLSON, J. A. 1989. Biological actions of carotenoids. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology – FASEB.* 1989. v 3. 1927-1932.

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

CHRISTENSEN, V. L.; FAIRCHILD, B. D. 2005. The relationship between sperm hydrolysis of the perivitelline layer and embryonic livability. *Journal of Applied Poultry Research.* v 14. 60-68.

DE AMBROGI, M.; SPINACI, M. GALEATI, G.; TAMANINI, C. 2006. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* v 66. 1994-2000.

FERNANDES, J. I. M.; MURAKAMI, A. E.; POTENÇA, A.; KOSMANN, C.; GARCEZ NETO, A. 2010. Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas – Prêmio Lamas 2010.

GONZÁLES, E.; SARTORI, J. R. 2002. Crescimento e metabolismo muscular. *Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte.* FAPESP. 21:279-298.

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

HAMMERSTEDT, R. H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod. Fertil. Dev.* V5. 675-690.

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

KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; SPEAKE, B. K.; CAVALCHINI, L. G.; NOBLE, R. C. 1997. Effects of dietary supplementation with alpha-linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *J Reprod Fertil.* v 110. 53-59.

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

LEANDRO, N. S. M.; CUNHA, W. C. P.; STRINGHINI, J. H.; CRUZ, C. P.; CAFÉ, M. C.; MATOS, M. S. 2006. Influência do peso inicial de pintos de corte sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos e a viabilidade econômica da produção. *Revista Brasileira de Zootecnia.* v 35. 6:2314-2321.

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

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res.* v 129. 597-603.

MALGORZATA, G.; KAPKOWSKA, A. 2005. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. *Animal Reproduction Science.* v 90 135-148.

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

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

MCGARY BROUGHER, S.; ESTEVEZ, I.; OTTINGER, M. A. 2005. Can testosterone and corticosterone predicted the rate of display of male sexual behavior,

development of secondary characters and fertility potential in primary broiler breeders? Poultry Science. v 46. 621-625.

MENDES, A. A.; PAZ, I. C. L. A.; MOREIRA, J. 2005. Produção e características das linhagens para corte. Manejo de Matrizes de Corte. FACTA. Campinas. 1:1-9.

MENEZO YJ, HAZOUT A, PANTEIX G, ROBERT F, ROLLET J, COHEN-BACRIE P, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. Reprod Biomed Online. 2007;14:418–21.

MURAKAMI, A. E.; SANTOS, T. C.; FERNANDES, J. I. M.; BORTOLUZZI, C.; MARTINEZ, A. C. 2013. Desempenho produtivo e reprodutivo de matrizes de frangos de corte com dietas suplementadas com vitamina E, óleo de soja e óleo de peixe. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v 37. 3:285-294.

ROBERTSON, L.; WILSON, Y. I.; LINDSAY, C.; WISHART, G. J. 1998. Evaluation of semen from individual male domestic fowl by assessment of sperm: perivitelline interaction in vitro and in vivo. British Poultry Science. v 39. 278-281.

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. 2007. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v 31. 3:307-317.

SOUZA, R. A.; SOUZA, P. A.; SOUZA, R. C.; NEVES, A. C. R. S.; Efeito da utilização de Carophyll Red nos índices reprodutivos de matrizes de frango de corte. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 10:32.

SURAI, P. F. 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. British Poultry Science. v 44. 612-619.

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

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE LICOPENO E DA IDADE DE REPRODUTORES DE FRANGOS DE CORTE SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS

RESUMO -A adição de substâncias antioxidantes nas dietas para reprodutores podem melhorar os índices de fertilidade e proteger o DNA espermático dos efeitos oxidativos. O objetivo deste estudo foi avaliar efeito da suplementação de licopeno e da idade de reprodutores machos de frangos de corte sobre parâmetros reprodutivos. Foram utilizados 24 galos da linhagem Cobb, 12 com 25 semanas e 12 galos com 50 semanas de idade. Os reprodutores foram mantidos em gaiolas (1 por gaiola) e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (idades e dietas) totalizando 4 tratamentos e 6 repetições de 1 galo cada. Os tratamentos foram compostos por: Tratamento 1 – galos com 25 semanas de idade e suplementados com licopeno, Tratamento 2 – galos com 50 semanas de idade e suplementados com licopeno, Tratamento 3 – galos com 25 semanas de idade e sem suplementação e Tratamento 4 – galos com 50 semanas de idade e sem suplementação. O licopeno foi fornecido na quantidade de 72 ppm (Lycopene 10%; Roche Vitamins). Após 12 semanas de suplementação, o sêmen foi coletado pelo método da massagem abdominal. As análises do sêmen, volume de sêmen, concentração espermática e motilidade foram realizadas imediatamente após a coleta. Todos os galos foram sacrificados para medida e pesagem de testículo, crista, barbela e peito. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o programa SAS. O comprimento e largura da crista dos galos mais novos foram maiores ($p < 0,05$) em comparação aos galos mais velhos, independente da adição de licopeno às dietas. Este mesmo resultado foi observado para o peso, comprimento e espessura dos testículos. No desdobramento da interação, idade e tratamento, observou-se que a inclusão do licopeno aumentou ($p < 0,05$) o peso vivo dos galos de 50 semanas de idade. A inclusão do licopeno na dieta, independente da idade dos galos aumentou o número de células PCNA-positivas dos testículos.

Palavras chave: licopeno, peroxidação lipídica, espermatozoide

ABSTRACT-The addition of antioxidants on reproducers diets can, besides the beneficial effects provided to spermatic cell front of free radicals action, improve the fertility rates and to protect the spermatic DNA from oxidative effects. The small number of males in a broiler breeder flock compared to the females is a factor of great economic impact in adding dietary additives. The objective of this study was to evaluate the effect of lycopene supplementation and the age of broiler breeder males on reproductive parameters. At the experiment, 24 Cobb roosters were used, 12 with 25 weeks of age and 12 with 50 weeks of age and distributed in a totally casual delineation in factorial system 2 x 2 (ages and diets) adding 4 treatments and 6 repetitions of 1 bird each. The lycopene were provided at 72 ppm (Lycopene 10%, Roche Vitamins) and the treatments were: Treatment 1: 25 week age roosters

antioxidant supplemented; Treatment 2: 50 week age roosters antioxidants supplemented; Treatment 3: 25 week age roosters without supplementation; Treatment 4: 50 week age roosters without supplementation. After 12 weeks of supplementation, the semen was collected by abdominal massage method. The semen analysis, semen volume, spermatic concentration and motility were made right after the collect. All the roosters were euthanized in order to testicle, comb, dewlaps and chest measurement and weighing. Fragments from the testicles were fixed, paraffin blocked, cut and put on marked blades to mitosis cells detection by immunohistochemistry technique. The data were submitted to statistical analysis using the SAS program. The comb length and width from the younger roosters were bigger ($p < 0,05$) compared to the older roosters, independently from the lycopene added to the diet. The same result was observed to testicle weight, length and thickness. In the interaction unfolding of age and treatment, it was observed that the inclusion of lycopene increased ($p < 0,05$) the weight of the 50 week age roosters. The lycopene added to the diet, independently from the males' age increased the number of positive-PCNA cells in the testicles.

Keywords: lycopene, lipid peroxidation, spermatozoid.

Introdução

A reprodução de frangos de corte tem recebido cada vez mais atenção devido à importância sobre a qualidade da progênie (SURAI, 2003), a composição deste processo no custo de produção e ainda devido a correlação negativa entre características reprodutivas e as características selecionadas pelos geneticistas para o bom desempenho produtivo do frango de corte (LEESON, 1999).

O pico de produção de espermatozoides em galos se dá entre as 24 e 30 semanas, mantendo-se assim até as 40 semanas e, a partir daí, decresce gradativamente com o envelhecimento das aves (ADJANOHOON, 1994). Em condições comerciais, é feita a reposição de machos mais velhos por novos em plantéis de reprodutoras com mais de 40 semanas, procedimento conhecido como *spiking*. Entretanto, o *spiking*, utilizado como forma de melhorar ou manter a fertilidade do lote (CANOVAS, 2008), agrega custos de produção por conta da alimentação e mão-de-obra dispendida na criação dos machos de reposição, além do potencial risco de introdução de doenças ao plantel. Sesti (2009) considera a introdução de aves oriundas de diferentes granjas a um plantel de matrizes uma das principais formas de se introduzir doença.

Outro fator que influencia negativamente a manutenção da taxa de fertilidade do lote é a própria constituição da membrana espermática, composta basicamente por ácidos graxos poli-insaturados, ou PUFA's (SURAI, 2002). Bilodeau (2002) afirma que a presença dos PUFA's torna o espermatozoide mais suscetível aos danos oxidativos causados pelo ataque das espécies reativas ao oxigênio (ROS), que são gerados pelo próprio sêmen. A peroxidação lipídica, resultante de todo esse processo, impacta negativamente na capacidade fertilizante do galo devido à disfunção e morte celular causadas (Aitken, 1995; Bilodeau, 2002), e pode ser acentuada por fatores ambientais.

Como forma de manutenção da integridade da membrana dos espermatozoides, assim como das suas propriedades fisiológicas, principalmente relacionadas à fluidez de membrana, flexibilidade e permeabilidade necessária para a fertilização, um sistema antioxidante para minimizar os impactos da peroxidação lipídica é fundamental (RUTZ et al., 2007). Este sistema, segundo Surai (2002), inclui três níveis de defesa, da qual participam enzimas, como a superóxido dismutase e a glutationaperoxidase, proteínas carreadoras de metais e vitaminas (C e E). Quando a concentração de fatores oxidativos estão em concentração elevada a ponto de o sistema antioxidante não suprimir os efeitos da oxidação, tem-se o estresse oxidativo (KIM et al., 2010).

Dentre os antioxidantes que vem sendo estudados com esta finalidade, estão as vitaminas (C e E), beta carotenos, carotenoides e flavonoides (MAKKER et al., 2009 e BANSAL e BILASPURI, 2010). A propriedade antioxidante do carotenoide é proporcionada pela presença de um sistema de duplas ligações conjugadas, o que também proporciona poder corante a esses elementos (Rodrigues-Amaya, 1999). De acordo com Di Mascio et al. (1989) e Fontana et al. (2000), o licopeno, um carotenóide presente principalmente no tomate (*Lycopersicon esculentum*) tem sido estudado devido ao alto poder antioxidante, considerando a capacidade de sequestrar moléculas de oxigênio singlete. Como a luteína, o licopeno não é convertido em retinol, pertencendo ao grupo de carotenóides não-provitamina A.

O fato de o licopeno ter capacidade de se unir às ROS tem gerado interesse nas pesquisas realizadas principalmente em humanos (Velmurugan et al., 2004). Em humanos, a suplementação dietética de licopeno resulta em benefícios a saúde por manter uma condição antioxidante e por prevenir doenças crônicas (RAO et al.,

2006; AVCI & DURAK, 2007). Nos últimos anos, estudos com licopeno avaliaram os efeitos deste no status bacteriológico do sêmen, qualidade seminal e desempenho do macho em aves e mamíferos (MARTINO et al., 2006; GOYAL et al., 2007; TURK et al., 2007; MANGIAGALLI et al, 2010;MANGIAGALLI et al., 2012).

Mangiagalli et al (2010) demonstraram um efeito positivo da suplementação de licopeno na água de bebida de galos entre 25 e 42 semanas de idade sobre a produção e atividade bactericida do sêmen, viabilidade de espermatozóides e fertilidade. Estes autores consideram que essas melhorias no desempenho produtivo e reprodutivo dos galos em função da suplementação de licopeno devem ser melhor investigadas no intuito de otimizar o uso prático em criações comerciais. Em coelhos, Mangiagalli et al. (2012) observaram efeitos positivos da suplementação de licopeno sobre a produção e estocagem de sêmen.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição de licopeno a dieta de machos reprodutores de frango de corte de 25 e 50 semanas sobre parâmetros reprodutivos e produtivos.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Aviário Experimental da UFPR Campus Palotina e todos procedimentos de criação dos animais e de coleta de material biológico foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação conforme preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados 24 galos da linhagem Cobb, 12 galos de 25 semanas de idade oriundos de um mesmo lote de matrizes e 12 galos de 50 semanas de idade, provenientes de um mesmo lote de matrizes de uma agroindústria local. Os reprodutores foram mantidos em gaiolas (1 por gaiola) e distribuídos aleatoriamente em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2 (2 idades e duas dietas) totalizando 4 tratamentos e 6 repetições de 1 galo cada. Os tratamentos forma compostos por: Tratamento 1 – galos com 25 semanas de idade e suplementados com licopeno; Tratamento 2 – galos com 50 semanas de idade e suplementados com licopeno; Tratamento 3 – galos com 25 semanas de idade e

sem suplementação e Tratamento 4 – galos com 50 semanas de idade e sem suplementação.

O licopeno foi fornecido na quantidade de 72 ppm (Lycopene 10%; Roche Vitamins). As dietas experimentais, a base de milho e farelo de soja, foram formuladas de acordo com as orientações do manual da linhagem e com a fase de vida das aves.

Após 12 semanas de suplementação foram feitas coletas de sêmen através do método de massagem abdominal para avaliação seminal. Os galos foram pesados e em seguida sacrificados. O procedimento de eutanásia dos animais experimentais seguiu as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e foi realizado por meio da contenção física, seguida de fixação de cateter n. 22 na veia femoral para infusão de propofol (Propovan 10mg/mL, Laboratório Cristália) em bolus, até a confirmação da inconsciência. Imediatamente, administrou-se por esta mesma via, cloreto de potássio (Cloreto de potássio 19,1%, Laboratório Isofarma), até a confirmação do óbito.

Em seguida foram avaliadas as cristas (espessura e peso) e barbela (comprimento, largura e peso) de todos os galos. O peito e testículos foram extraídos da carcaça e pesados. Fragmentos dos testículos foram mergulhados em solução de formol tamponado, incluídos em parafina e submetidos à cortes semi-seriados de 5 μ m de espessura. Os fragmentos dos testículos foram incluídos e orientados de tal maneira que permitissem obter cortes para observação dos túbulos seminíferos, os quais foram aplicados em lâminas silanizadas para detecção de células em mitose pela técnica imunohistoquímica. Para o procedimento utilizou-se anticorpo monoclonal anti-PCNA (Antígeno Nuclear da Proliferação Celular - Santa Cruz®). A reação de imunohistoquímica foi realizada conforme Gosselin et al. (1986), com modificações. De cada lâmina foram capturadas 10 imagens e quantificadas as células PCNA positivas.

Para a análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de valores discrepantes (*outliers*) e testaram-se as pressuposições de normalidade dos erros studentizados (teste de Cramer Von Mises) e de homogeneidade de variância (teste de Brown-Forsythe). Após constatada a não violação dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM do programa SAS (SAS Institute, 2002) com nível de 5% de significância. Os dados médios de número de células positivas para PCNA no epitélio dos tubos seminíferos

foram avaliados considerando distribuição de Poisson com função de ligação log implementados no PROC GENMOD do SAS. Para a análise das características seminais assumiu-se a distribuição binominal negativa, a qual mostrou-se mais robusta, ajustando-se melhor ao modelo assumido.

Resultados e discussão

Os resultados de biometria de crista, barbela e testículos estão descritos na Tabela 1. Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e as idades dos galos. O comprimento e largura da crista dos galos mais novos foram maiores ($p < 0,05$) em comparação aos galos mais velhos, independente da adição de licopeno às dietas. Este mesmo resultado foi observado para o peso, comprimento e espessura dos testículos. Não houve efeito ($p > 0,05$) da suplementação do licopeno ou da idade dos galos sobre a biometria da barbela.

Os resultados apresentados estão de acordo com Adjanohoun (1994). Segundo este autor, o peso dos testículos aumenta exponencialmente até as 24 semanas, permanecendo até aproximadamente as 39 semanas. A partir daí, o peso dos testículos começa a decrescer. Há uma correlação positiva entre o peso dos testículos e a produção espermática (MCGARY, 2002). Esse pode ser um dos fatores que diferenciam o índice de fertilidade do lote. Em relação à biometria de crista e barbela, McGary e Brougher (2005) relacionando características sexuais secundárias a fatores como fertilidade, peso dos testículos e penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica concluíram que há correlação positiva entre peso testicular e área de crista, assim como altura de crista e comprimento de barbela com penetração de espermatozoides na membrana perivitelínica.

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos e a idade para o peso vivo dos galos (Tabela 2). No desdobramento da interação, observou-se que a inclusão do licopeno aumentou o peso vivo dos galos de 50 semanas de idade. Segundo o Cobb-Vantress (2008) os incrementos de ração com 25 semanas de idade são maiores em relação aos incrementos no período pós-maturidade sexual. Desta forma, a suplementação de aditivos nutricionais extra na dieta dos machos nesse período apresenta uma relevância maior que o período de altos incrementos, como no início do período reprodutivo.

A suplementação do licopeno na água de bebida de coelhos resultou em aumento no consumo de água (MANGIAGALLI et al., 2012). Os mesmos autores (Mangiagalli et al, 2010) utilizando também a suplementação de licopeno na água não avaliaram o consumo por galos, da mesma forma do presente estudo, o que torna inconsistente a relação com o melhor peso vivo dos galos, já que coelhos e aves apresentam diferenças anatômicas e fisiológicas no controle da ingestão de água e ração.

Sahin et al. (2006) observaram que codornas submetidas ao estresse por calor e que receberam licopeno na ração apresentaram melhor ganho de peso do que codornas alimentadas com ração isenta do aditivo. O fato de o calor ser um fator estressante e que pode desencadear um processo oxidativo pode justificar seu uso em determinadas situações.

O percentual de peito em relação ao peso dos galos foi maior para galos suplementados com licopeno e para os galos de 50 semanas em relação aos de 25 semanas (Tabela 2). Por outro lado, observou-se maior ($p < 0,05$) percentual de testículos em relação ao peso vivo para galos de 25 semanas em relação aos galos de 50 semanas.

Tabela 1. Biometria de crista, barbela e testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.

	Crista								
	Comprimento(cm)			Largura(cm)			Espessura (cm)		
	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média
25 sem.	15,02	13,28	14,07 ^a	5,10	4,75	4,91 ^a	12,07	12,67	12,40
50 sem.	12,18	11,08	11,63 ^b	3,85	3,33	3,59 ^b	11,34	9,73	10,53
Média	13,47	12,18		4,42	4,04		11,67	11,20	
CV, %		9,59			16,20			20,56	
L vs T*		0,3209			0,1133			0,2758	
	Barbela								
	Comprimento(cm)			Largura (cm)			Espessura (cm)		
	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média
25 sem.	7,08	6,33	6,67	6,68	6,20	6,42 ^a	2,08	2,12	2,10
50 sem.	6,28	6,15	6,22	5,67	5,42	5,54 ^b	1,77	2,05	2,10
Média	6,65	6,24		6,13	5,81		1,91	2,08	
CV, %		12,18			16,74			15,86	
L vs T		0,4409			0,2233			0,3842	
	Testículos								
		Peso(g)		Comprimento(cm)			Espessura (cm)		
	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média
25 sem.	43,16	40,99	42,08 ^a	48,20	44,75	46,72 ^a	29,63	28,30	29,06 ^a
50 sem.	19,38	14,98	17,18 ^b	35,13	34,65	34,89 ^b	20,18	18,57	19,38 ^b
Média	31,27	27,99		41,67	38,98		24,91	22,74	
CV, %		29,16			18,38			22,87	
L vs T		0,2267			0,1523			0,0983ns	

* L x T: interação idade e tratamento.

Tabela 2. Peso vivo e percentual de peito e testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.

	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média
	Peso vivo(g)			Peito (%)			Testículos(%)		
25 sem.	4,75 ^{bA}	4,71 ^{bA}	4,73	22,30	23,43	22,87 ^b	0,91	0,87	0,89 ^a
50 sem.	5,37 ^{aB}	6,11 ^{aA}	5,74	26,13	30,69	28,41 ^a	0,35	0,24	0,30 ^b
Média	5,06	5,41		24,21 ^b	27,06 ^a		0,63	0,56	
CV, %		6,31			7,18			25,37	
I vs T		0,0001			0,0872			0,6275	

* I vs T: interação idade e tratamento. Médias seguidas de letras distintas minúsculas na coluna deferem entre si ($p < 0,05$). Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Shi et al. (2014) observaram que a dieta suplementada com selênio pode influenciar a população de espermatogônias durante a espermatogênese e que o estresse oxidativo pode modular o comportamento destas células através da regulação alguns fatores-chave durante a espermatogênese de galos.

Pode-se observar na Tabela 3 que a concentração espermática (células/mL) foi influenciada pela idade. As aves mais jovens, independente de consumir ou não o licopeno, tiveram uma média de células/mL maior que os galos mais velhos. Cerolini et al. (1997) estudando as relações entre a composição do espermatozoide, a fertilidade e a idade de galos também observaram que a concentração espermática aumenta até a maturidade sexual do galo e, após a fase de pico de produção, tende a diminuir. O mesmo efeito, segundo este autor, ocorre para a motilidade. Outros autores também relataram o efeito da idade sobre a concentração espermática de galos (ROSENTRAUCH et al., 1994; HOCKING et al., 1997).

Trabalhando com subproduto de tomate, Saemi et al. (2012) observaram que a inclusão deste produto na dieta de machos aumentou a concentração espermática que foi acompanhada pelo decréscimo no volume seminal dos galos (Saemi et al., 2012).

Na Tabela 4 estão demonstrados os resultados referentes a contagem de células PCNA-positivas em testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno. Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre a idade e a suplementação. Entretanto, galos, independente da idade, apresentaram um maior ($p < 0,05$) número de células PCNA

positivas. O PCNA é um cofator da DNA polimerase e necessário para a síntese do mesmo, tendo assim papel fundamental na proliferação celular (JAKULSKI et al., 1988).

Tabela 3. Características do sêmen de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.

	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média	Contr.	Licopeno	Média
	Motilidade			Volume(ml)			Células/ml		
25 sem.	77,17	90,00	80,38	0,53	0,33	0,41	204,50	158,38	178,14 ^a
50 sem.	88,75	75,00	81,88	0,22	0,25	0,23	197,75	121,17	159,46 ^b
Média	81,80	80,00		0,38	0,26		201,13	116,88	
CV, %		57,27			55,38			37,83	
L vs T		0,5590			0,1043			0,0659	

* I vs T: interação idade e tratamento

Tabela 4. Contagem de células PCNA-positivas em testículos de galos de 25 e 50 semanas de idade alimentados com dietas acrescidas ou não de licopeno.

	Controle	Licopeno	Média
25 semanas	135	165	153
50 semanas	119	174	142
Média	125 ^b	170 ^a	
CV, %		16,66	
Idade x Tratamento		0,3917	

A literatura não apresenta resultados desta técnica na avaliação da capacidade reprodutiva de galos. Schlatt e Weinbauer (1994) relatam que com o avançar da idade e a queda hormonal há uma indução na diminuição do número de células PCNA positivas em ratos, hamsters e macacos. Pelos resultados observados neste experimento é possível inferir que a suplementação de licopeno influencia positivamente a proliferação das células germinativas.

Em mamíferos, a elevada concentração de testosterona melhora a espermatogênese, mas em aves, as células de Sertoli tem como função assegurar espermatozoides maduros nos túbulos seminíferos e regular a liberação das células espermáticas (EDENS & SEFTON, 2009). Sharpe (1994) encontrou uma correlação positiva entre células de Sertoli e o número de células germinativas. Já Thurston e

Korn (2000) relatam correlação positiva e significativa entre testosterona plasmática e o número e função das células de Sertoli.

Rosenstrauch et al. (1994) relatam ainda que em galos com baixa fertilidade, as células de Sertoli são menores que aquelas observadas em galos com altos índices de fertilidade. Além disso, estes autores também observaram que o número dessas células reduz com a queda da fertilidade.

A influência dos antioxidantes já é muito conhecida sobre a fertilidade de matrizes, entretanto, mais pesquisas direcionadas a melhoria da fertilidade dos machos são necessárias. A utilização de dietas específicas para machos é altamente viável, não só pelos efeitos benéficos conhecidos do atendimento das exigências nutricionais sobre os parâmetros controle de peso corporal, maior eclosão e fertilidade tardias, como também por tornar viável economicamente a inclusão de aditivos como o licopeno, visto o pequeno volume de ração para os machos do plantel em comparação às fêmeas. Apesar dos machos reprodutores constituírem apenas 10% do plantel em relação às fêmeas, representam 50% da carga genética e da fertilidade.

Conclusão

Em relação a características sexuais, galos mais jovens, independente do consumo de licopeno, apresentam maiores valores para parâmetros de crista e de testículos. A inclusão do licopeno na dieta dos galos aumentou o peso dos machos de 50 semanas.

O consumo dietético de licopeno não alterou parâmetros espermáticos como motilidade, volume e concentração. Entretanto, foi observado que galos mais jovens apresentam maior quantidade de células/mL em relação aos galos mais velhos.

A inclusão do licopeno na dieta, independente da idade dos galos aumentou o número de células PCNA-positivas dos testículos.

Referências

ADJANOHOON, E. 1994. Fertilidade relacionada aos machos. Fisiologia da reprodução de aves. FACTA. Campinas.8:107-115.

AITKEN, R. J. 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* v 7. 4:659-668.

AVIC, A.; DURAK, I. 2007. Tomato and cancer. In: Durak I. *Nutraceuticals and natural products in cardiovascular diseases, cancer and hemorrhoids.* 41-46

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

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

CANOVAS, 2008. Efeito spiking e intraspiking na fertilidade. In: CARVALHO, C. R. F. *Fertilidade em Reprodutoras Pesadas.* Disponível em: <http://www.nftalliance.com.br/artigos/aves/fertilidade-em-reprodutoras-pesadas>. Publicado em 24/07/2012.

CEROLINI, S. 1997. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chicken. *Biology of Reproduction.* V 57. 5:976-980.

COBB-VANTRESS, 2008. Guia de Manejo de Matrizes.

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

EDENS, F. W. O.; SEFTON, A. E. Sel-plex® improves spermatozoa morphology in broiler breeder males. *Int J Poultry Sci,* 8 (9): 853-861, 2009.

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L.; PASSOS, M. 2000. Carotenoides cores atraentes e ação biológica. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento.* 13:40-45.

GOSSELIN, E. J.; CATE, C. C.; PETTENGIL, O. S.; SORENSON, G. D. 1986. Immunocytochemistry: its evaluation and criteria for its application in the study of epon-embedded cell and tissue. *American Journal of Anatomy*, Philadelphia, v 175. 2-3:135-160.

GOYAL, A.; CHOPRA, M.; LWALEED, B. A.; BIRCH, B.; COOPER, A. J. 2007. The effects of dietary lycopene supplementation on human seminal plasma. *BJU International*. 99:1456-1460.

HOCKING, P. M.; BERNARD, R. 1997. Effects of male body weight, strain and dietary protein content on fertility and musculo-skeletal disease in naturally mated broiler breeder males. *British Poultry Science*. v 38. 1:29-37.

JASKULSKI, D.; DERIEL, J. K.; MERCER, W. E.; CALABRETTA, B.; BASERGA, R. 1988. Inhibition of cellular proliferation by anisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science*. 240:1544-1546.

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

LEESON, S. 1999. Enzimas para aves. *Simpósio Internacional sobre Nutrição para Aves*. FACTA. Campinas. 173-185.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. *Indian J. Med. Res.* v 129. 597-603.

MANGIAGALLI, M. G.; MARELLI, S. P.; GUIDOBONO CAVALCHINI, L. 2007. Effect of lycopene on fowl sperm characteristics during in vitro storage. *Archive Geflügelkunde*. 71:25-29

MANGIAGALLI, M. G.; MARTINO, P. A.; MARELLI, S. P.; SMAJLOVIC, T.; GUIDOBONO CAVALCHINI, L. 2010. Effect of lycopene on sêmen quality, fertility and native immunity of broiler breeder. *British Poultry Science*. v 51. 152-157.

MANGIAGALLI, M.G.; CESARI, V.; CEROLINI, S.; LUZI, F.; TOSCHI, I. 2012. Effect of lycopene supplementation on semen quality and reproductive performance in rabbit. *World Rabbit Sci.* v 20: 141 – 148.

MARTINO, P. A.; MANGIAGALLI, M. G.; MARELLI, S. P.; SMAJLOVIC, T.; GUIDOBONO CAVALCHINI, L. 2006. Effect of lycopene on sêmen bacteriological

status and native immunity in roosters. World's Poultry Science Journal XII European Poultry Conference. 62:415.

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

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

RAO, A. V.; RAY, M. R.; RAO, L. G. 2006. Lycopene. Advances in Food and Nutrition Research. 55(3): 207-216.

RODRIGUES-AMAYA, D. B. 1999. A guide to carotenoid analysis in food. ILSI Press. Washington. 37-51.

ROSENTRAUCH, A.; DEGEN, A. A.; FRIEDLANDER, M. Spermatozoa retention by sertoli cells during the decline in fertility aging roosters. Biol Reprod, 50: 129-136, 1994.

RUTZ, F.; ANCIUTTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. 2007. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. Revista Brasileira de Reprodução Animal. v 31. 3:307-317.

SAEMI, F.; ZAMIRI, M. J.; AKHLAGHI, A.; NIAKOUSARI, M.; DADPASAND, M.; OMMATI, M. M. Dietary inclusion of dried tomato pomace improves the seminal characteristics in Iranian native roosters. Poultry Science, v. 91:2310–2315, 2012

SAHIN, K.; ONDERCI, M. C.; SAHIN, N. et al. 2006. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. Journal of Thermal Biology. v 31. 307-312.

SCHLATT, S.; WEINBAUER, G. F. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. International Journal of Andrology.;17(4):214-22, 1994.

SESTI, L. A. C. 2005. Biosseguridade em granjas de reprodutores. Manejo de Matrizes de Corte. FACTA. Campinas. 12:343-317.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction*. (eds. E. Knobil and J. D. Neill), Raven Press, Ltd, New York, NY, 1994.

SHI, L.; ZHAO, H.; REN, Y.; YAO, X.; SONG, R.; YUE, W. Effects of different levels of dietary selenium on the proliferation of spermatogonial stem cells and antioxidant status in testis of roosters. *Anim Reprod Sci*. V.14, p. 378-432, 2014.

SURAI, P. F. 2002. *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press.

SURAI, P. F. 2003. Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *British Poultry Science*. v 44. 612-619.

THURSTON, R. J.; KORN, N. Spermatogenesis in commercial poultry species: Anatomy and control. *Poult Sci*, 79: 1650-1668, 2000.

VELMURUGAN, B.; SANTHIYA, S. T.; NAGINI, S. 2004. Protective effect of S-allylcysteine and lycopene in combination against N-methyl-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity. *Polish Journal of Pharmacology*. v 56. 241-245.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Nos processos de criação de matrizes a campo, há muitos fatores que interferem na manutenção da boa fertilidade do lote, acarretando em perdas financeiras para a agroindústria por causa da menor produção de pintos. Além disso, é esperado, mesmo em situações normais, que o desempenho reprodutivo do macho piore gradativamente com o envelhecimento do galo, muito disto atribuído a peroxidação lipídica na membrana dos espermatozoides. Neste cenário, a suplementação dietética de antioxidantes pode ser uma alternativa para minimizar o efeito da idade e dos efeitos oxidativos sobre a qualidade espermática.

Na fase pós-pico, os machos suplementados apresentaram um menor percentual de espermatozoides anormais, aumentando, para o grupo tratamento, a possibilidade de fertilização.

Outra evidência da melhora na fertilidade do lote após a inclusão de antioxidantes na dieta ocorreu em teste a campo, onde ovos provenientes dos galpões em que os galos receberam o tratamento tiveram um maior número de perfuração espermática em sua membrana vitelínica. Além deste indicador de melhoria de fertilidade, a progênie oriunda de galos suplementados com antioxidantes apresentaram maior ganho de peso e menor conversão alimentar na fase de 14 – 35 dias.

A tendência para a cadeia avícola é que se automatize boa parte dos processos, reduzindo a necessidade de mão-de-obra. A genética, por sua vez, manterá o foco em desempenho do frango de corte e no rendimento do produto final. Desta forma, a necessidade de se ter boas condições de ambiência, sanidade e nutrição podem tornar o uso de carotenoides e vitaminas com a finalidade antioxidante bastante viável, mediante prévia análise custo-benefício, para a obtenção dos bons índices reprodutivos nos lotes de reprodutoras.