

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Catiane Orso

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES
SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS**

**Santa Maria, RS, Brasil
2017**

Catiane Orso

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE
OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientador: Alexandre Pires Rosa

**Santa Maria, RS, Brasil
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Orso, Catiane
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES
SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS / Catiane
Orso.- 2017.
89 p.; 30 cm

Orientador: Alexandre Pires Rosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2017

1. Antioxidantes 2. Sêmen 3. Vitamina E 4. Selênio 5.
Cantaxantina I. Pires Rosa, Alexandre II. Título.

©2017

Todos os direitos autorais reservados a Catiane Orso. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: catiane.orso@gmail.com

Catiane Orso

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE
OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**

Aprovado em 20 de fevereiro de 2017:

Alexandre Pires Rosa, Dr.
(Presidente/Orientador)

Jovanir Inês Muller Fernandes, Dra. (UFPR)

Priscila Becker Ferreira, Dra. (UNIPAMPA)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus pela vida, por me proporcionar estes momentos e permitir a realização dos meus sonhos.

Aos meus pais Vilso e Ivanilde, que nos deram a vida e nos ensinaram a vivê-la com dignidade. Doaram-se inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes pudéssemos realizar os nossos. Eu e meu irmão Tálison nos orgulhamos muito de vocês.

Ao meu irmão Tálison, pela companhia de quase uma vida toda. Desde que você nasceu soube que teria mais que um irmão, um amigo.

Aos meus avós que em todas as despedidas enchiam seus olhos de lágrimas. Apesar de a distância ser difícil, nunca deixaram de apoiar e pedir a Deus para que alcançássemos nossos objetivos.

Ao meu namorado Luciano Antônio Ritt por todo amor, apoio, carinho e dedicação. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Pelos finais de semanas que passaste comigo, ajudando nas análises laboratoriais e sendo um enorme companheiro nestas horas, foste importantíssimo nesta conquista, sem você teria sido muito difícil.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alexandre Pires Rosa pelo exemplo de profissional, pela dedicação despendida ao meu aprendizado e pela enorme contribuição com minha formação profissional e pessoal.

A Bety por todo carinho recebido!

A meus colegas da pós-graduação, quantas alegrias vivi com vocês! Obrigada pela convivência quase que diária, as quais nos permitiram construir grandes amizades.

Aos estagiários, pelo convívio e apoio na condução dos experimentos, em especial aqueles que participaram diretamente deste trabalho, sem vocês não teria sido possível;

Ao LAVIC, por me receber durante todos esses anos tornando-se minha segunda casa, permitindo meu crescimento e a realização de sonhos;

Ao NIDAL, especialmente ao professor José Laerte Nörnberg, pela assistência e apoio na realização das análises laboratoriais.

Ao EMBRYOLAB, por ceder suas estruturas. A professora Mara Rubin e Janislene Trentin pela ajuda oferecida.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino durante toda a minha trajetória acadêmica em Zootecnia;

Eterna gratidão!

RESUMO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE ANTIOXIDANTES SOBRE OS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE GALOS

AUTORA: Catiane Orso

ORIENTADOR: Dr. Alexandre Pires Rosa

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos de diferentes antioxidantes sobre as características seminais de machos *White Plymouth Rock* da 53^a – 72^a semanas de idade. Foram realizados três experimentos: Experimento I (200 mg de vitamina E/kg/ração), Experimento II (0,4 mg de selênio/kg/ração) e Experimento III (6 mg de cantaxantina/kg/ração). Foram selecionados 32 machos, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições por tratamento. Dois tratamentos foram utilizados: dieta controle negativo e suplementado com o aditivo antioxidante. As dietas foram isonutritivas, sendo permitido acesso, *ad libitum*, água e ração. A fase experimental foi dividida em 5 períodos de 28 dias. Os parâmetros avaliados foram: peso corporal, consumo de ração, peroxidação lipídica (TBARS) e perfil de ácidos graxos (mensurados ao final dos períodos). Também foi determinado o volume de ejaculado, motilidade, vigor, alterações morfológicas, pH e concentração espermática (mensurados 2 vezes ao período). Os dados foram submetidos a análise de variância através do programa SAS (2011), considerando estatisticamente diferente ao nível de 5% de significância. A vitamina E aumentou o consumo alimentar ($P<0,05$), sem afetar o peso corporal ($P>0,05$). Os machos suplementados com vitamina E apresentaram menor volume seminal no período V ($P=0,0295$). A motilidade e o vigor espermático aumentaram significativamente com a inclusão da vitamina E a partir do período II ($P<0,05$). O pH do sêmen não foi influenciado pela adição de vitamina E ($P>0,05$). A adição de vitamina E melhorou a concentração de espermática nos dois últimos períodos analisados, ($P=0,0001$) e ($P=0,0038$), período IV e período V, respectivamente, compreendendo o intervalo entre a 65^a e a 72^a semana de idade. Os defeitos morfológicos totais ($P=0,0589$), não foram minimizados com a adição da vitamina E. A vitamina E diminuiu a oxidação lipídica (TBARS), modificando o perfil de ácidos graxos do sêmen ($P<0,05$). O consumo de ração, peso corporal, volume seminal, concentração espermática, defeitos morfológicos e o pH não foram influenciados pela adição de selênio na dieta ($P>0,05$). A motilidade e o vigor espermático foram aumentados com a inclusão de selênio, nos períodos II, III e IV, compreendendo o intervalo entre a 57^a e 68^a semana de idade ($P<0,05$). O TBARS do sêmen de machos suplementado com selênio, foi menor no período experimental total ($P=0,0331$). Houve alterações lipídicas, principalmente nos ácidos graxos insaturados de cadeia longa para a suplementação com selênio ($P<0,05$). Não houve alteração no consumo de ração, volume seminal e na concentração espermática pela inclusão de cantaxantina na dieta ($P>0,05$). Os machos apresentaram menor peso corporal no último período pela inclusão de cantaxantina ($P<0,05$). A motilidade espermática foi maior nos galos suplementados com cantaxantina nos períodos II, III e IV ($P<0,05$), compreendendo as semanas 57^a e 68^a. O vigor espermático foi significativamente aumentado com a inclusão da cantaxantina, após o segundo período de avaliação, o que corresponde ao intervalo da 57^a-72^a semana de idade ($P<0,05$). O pH seminal foi menor no período V ao adicionar cantaxantina na dieta ($P=0,0234$). O TBARS não diminuiu com a suplementação de cantaxantina ($P>0,05$). Houve alterações significativas no perfil de ácidos graxos com a adição da cantaxantina ($P<0,05$). Os antioxidantes testados melhoram a qualidade do sêmen dos machos avícolas, principalmente os parâmetros de motilidade e vigor espermático. Isso permite um maior potencial de fertilização pelo espermatozoide. A vitamina E e o selênio reduzem a peroxidação lipídica do sêmen. As alterações no perfil lipídico pela adição dos antioxidantes foram percebidas principalmente nos ácidos graxos insaturados de cadeia com 20 e 22 carbonos importantes para a fertilidade.

Palavras-chave: cantaxantina. desempenho reprodutivo. machos. selênio. vitamina E.

ABSTRACT

EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION OF ANTIOXIDANTS ON THE REPRODUCTIVE PARAMETERS OF ROOSTERS

AUTHOR: CATIANE ORSO

ADVISER: Dr. ALEXANDRE PIRES ROSA

The objective of this study was to determine the effects of different antioxidants on the seminal characteristics of White Plymouth Rock roosters from the 53rd to the 72nd week of age. Were conducted three experiments: experiment I (200 mg of vitamin E/kg/feed), experiment II (0.4 mg of selenium/kg/feed) and experiment III (6 mg of canthaxanthin/kg/feed). A total of 32 roosters were selected, distributed in a completely randomized design, with 16 replicates per treatment. Two treatments were used: negative control diet and supplemented with the antioxidant additive. The diets were isonutritivas, being allowed access, ad libitum, water and feed. The experimental phase was divided into 5 periods of 28 days. The parameters evaluated were: body weight, feed intake, lipid peroxidation (TBARS) and fatty acid profile (measured at the end of the periods). The volume seminal, motility, vigor, morphological changes, pH and sperm concentration (measured twice a year) were also determined. The data were submitted to analysis of variance through the program SAS (2011), considering statistically different at the level of 5% of significance. The vitamin E increased feed intake ($P<0.05$), without affecting body weight ($P>0.05$). The roosters supplemented with vitamin E presented lower seminal volume in the period V ($P=0.0295$). Motility and spermatid vigor increased significantly with inclusion of vitamin E from period II ($P<0.05$). The pH of the semen was not influenced by the addition of vitamin E ($P>0.05$). The addition of vitamin E improved the spermatid concentration in the last two analyzed periods, ($P=0.0001$) and ($P=0.0038$), period IV and period V, respectively, comprising the interval between 65th and 72nd week of age. The total morphological defects ($P= 0.0589$) were not minimized with the addition of vitamin E. Vitamin E decreased lipid peroxidation (TBARS), modifying the fatty acid profile of semen ($P<0.05$). The feed intake, body weight, seminal volume, spermatid concentration, morphological defects and pH were not influenced by the addition of selenium in the diet ($P>0.05$). The motility and spermatid vigor were increased with the inclusion of selenium in periods II, III and IV, comprising the interval between the 57th and 68th week of age ($P<0.05$). The TBARS of roosters semen supplemented with selenium was lower in the total experimental period ($P=0.0331$). There were lipid alterations, especially in long chain unsaturated fatty acids, for selenium supplementation ($P<0.05$). There was no change in feed intake, seminal volume and spermatid concentration by the inclusion of canthaxanthin in the diet ($P>0.05$). The roosters presented lower body weight in the last period by inclusion of canthaxanthin ($P<0.05$). The spermatid motility was higher in roosters supplemented with canthaxanthin in periods II, III and IV ($P<0.05$), comprising the weeks 57th-68th. The spermatid vigor was significantly increased with the inclusion of canthaxanthin after the second evaluation period, which corresponds to the interval of the 57th-72th week of age ($P<0.05$). The seminal pH was lower in period V, when adding canthaxanthin in the diet ($P=0.0234$). TBARS did not decrease with canthaxanthin supplementation ($P>0.05$). There were significant changes in the fatty acid profile with the addition of canthaxanthin ($P<0.05$). The antioxidants tested improve the quality of poultry semen, especially the parameters of motility and sperm vigor. This allows for a greater potential for spermatozoa fertilization. Vitamin E and selenium reduce lipid peroxidation of semen. The alterations in the lipid profile by the addition of antioxidants were observed mainly in unsaturated fatty acids of chain with 20 and 22 carbons, important for fertility.

Keywords: canthaxanthin. reproductive performance. males. selenium. vitamin E.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
SUMÁRIO	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 CAPÍTULO I	11
ESTUDO BIBLIOGRÁFICO	11
2.1 Sistema reprodutivo, espermatogênese e características seminais dos machos .11	
2.2 Constituição dos espermatozoides	14
2.3 Mecanismos e consequências da peroxidação lipídica	16
2.4 Antioxidantes	19
2.4.1 Vitamina E.....	20
2.4.2 Selênio	21
2.4.3 Cantaxantina.....	22
3 OBJETIVOS	24
4 CAPÍTULO II	25
EFEITO DA VITAMINA E SOBRE AS VARIÁVEIS REPRODUTIVAS, ESTADO OXIDATIVO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO SÊMEN DE GALOS WHITE PLYMOUTH ROCK	25
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
5 CAPÍTULO III	46
EFEITO DA ADIÇÃO DE SELÊNIO SOBRE AS VARIÁVEIS REPRODUTIVAS, ESTADO OXIDATIVO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO SÊMEN DE GALOS <i>WHITE PLYMOUTH ROCK</i>	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

6 CAPÍTULO IV.....	65
ADIÇÃO DE CANTAXANTINA EM DIETAS DE GALOS WHITE PLYMOUTH ROCK E SOBRE A QUALIDADE, PEROXIDAÇÃO E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO SÊMEN	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT	66
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	68
RESULTADOS E DISCUSÃO.....	72
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO.....	88

1 INTRODUÇÃO

Na indústria avícola, a fertilidade é um ponto crítico que reflete no retorno econômico máximo no sistema de produção, a partir do número e de qualidade de pintos produzidos. É sabido que a idade tem um efeito adverso sobre o sucesso reprodutivo das aves. O aumento da idade vem acompanhado por uma redução da qualidade do sêmen e, conseqüentemente, com a capacidade de fertilização do mesmo. Economicamente, a fertilidade dos galos em um lote reprodutor tem maior impacto do que a da fêmea, porque o macho é responsável pela fertilização dos ovos de oito a dez galinhas.

Dois aspectos inerentes aos machos deverão ser levados em conta a idade e a constituição biológica dos espermatozoides. A constituição lipídica da membrana dos espermatozoides é determinante nas propriedades químico-físicas e metabólicas, permitindo que células altamente especializadas possam realizar suas funções. As altas proporções de ácidos graxos poli-insaturados na fração fosfolípídica do sêmen são necessárias para manter a fluidez da membrana, sendo requerida para a motilidade e fusão com o oócito (SURAI et al., 2001)

Porém, dentre os aspectos evidenciados como responsáveis pela queda gradual da fertilidade, está à oxidação destes lipídios. Existe uma considerável evidência de que a composição de lipídios da membrana do espermatozoide é determinante sobre a motilidade e, principalmente, na viabilidade espermática (RODENAS, 2005).

A peroxidação dos ácidos graxos ocasiona danos à célula espermática, diminuindo sua motilidade e aumentando o número de espermatozoides com defeitos morfológicos, comprometendo a capacidade fertilizante. Esse fato é mais evidenciado em aves de maior idade, onde os tecidos reprodutivos mais velhos apresentam uma menor defesa antioxidante natural contra os danos causados pela oxidação.

Os espermatozoides possuem um sistema de proteção natural contra a oxidação, composto por enzimas e vitaminas. Segundo Surai (2002) os principais componentes deste sistema são: as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Além das enzimas, fazem parte as vitaminas C e E. Com o avanço da idade e, concomitantemente, o *déficit* do sistema de proteção natural contra a peroxidação lipídica, se faz necessária à suplementação exógena de substâncias de ação antioxidante para manter a boa proteção espermática.

Dentre os aditivos com funções antioxidantes podemos citar a vitamina E, capaz de reduzir os efeitos da peroxidação lipídica. Naturalmente encontrada no sêmen de galos a vitamina E melhora a qualidade do sêmen, a habilidade de fertilização e previne a peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (BISWAS et al., 2009) em consequência, há um aumento na concentração espermática, melhora da motilidade, redução de anormalidades, bem como o *status* antioxidante do sêmen (EID et al., 2006).

Assim como selênio, igualmente por sua função no controle da oxidação, de grande importância por constituir a enzima glutathione peroxidase. Na deficiência de selênio, há menor síntese da selenoproteína glutathione peroxidase hidropéroxido fosfolípídica (PH-GSH-Px), comprometendo a gametogênese. Como consequência, os espermatozoides apresentam diversos problemas morfológicos como cabeça e caudas isoladas, deformações na cabeça e peça intermediária, inclusive com ruptura estrutural, diminuição do número de espermatozoides por ejaculado e aumento na morte de espermatozoides (ALVIM e SOUZA, 2005).

Também entre os antioxidantes não enzimáticos, encontramos os carotenoides, que possuem importante papel antioxidante, reduz a ação dos radicais livres, absorvem e dissipam o excesso de energia destes e reciclam a vitamina E (BÖHM et al., 1997). Entre os carotenoides está a cantaxantina e, quando adicionada à dieta dos galos pode exercer seu papel antioxidante no sêmen reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides.

Fundamentados na importância do sistema antioxidante para manter as funções espermáticas, suas propriedades fisiológicas e garantir o processo de fertilização essa pesquisa foi conduzida, com o intuito de avaliar a adição de antioxidantes em dietas de reprodutores avícolas sobre o desempenho no segundo ciclo reprodutivo.

2 CAPÍTULO I

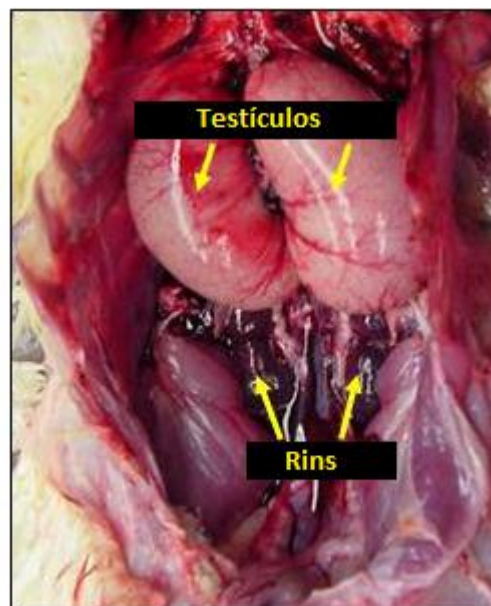
ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

2.1 Sistema reprodutivo, espermatogênese e características seminais dos machos

O sistema reprodutivo de galos possui uma anatomia que se diferencia dos mamíferos em diversos aspectos. Basicamente, são constituídos por testículos, epidídimos, vasos deferentes e falo. Não há presença de órgãos acessórios, diferentemente do que ocorre com mamíferos (SESTI, 2003).

Os testículos das aves localizam-se na cavidade abdominal e pesam cerca de 1% do peso vivo da ave na fase adulta (RUTZ et al., 2005; JOHNSON, 2006) (Figura 1). A temperatura corporal da ave permanece em torno dos 41°C, no entanto essas condições permitem que ocorra normalmente o processo da espermatogênese. Segundo Rutz et al., (2005) essa condição só é possível devido a um resfriamento dos testículos por meio dos sacos aéreos abdominais.

Figura 1. Localização dos testículos do macho na cavidade abdominal



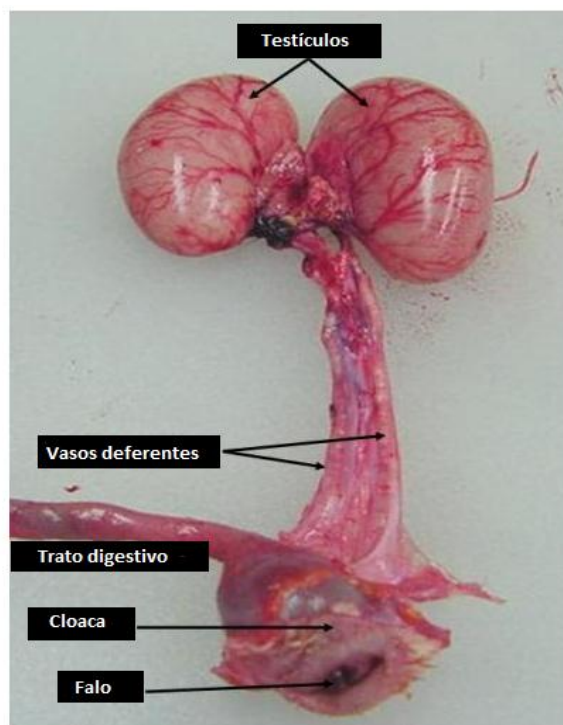
Fonte: (JACOB. J. 2015)

Na figura 2 está ilustrado o trato reprodutivo. Os galos não possuem vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e nem próstata. Nos testículos encontra-se uma pequena

estrutura tubular chamada epidídimo, um órgão pequeno que compreende uma rede de ductos. Rutz et al., (2007) denominaram essa rede de ductos como região epididimária, onde é nos epidídimos que a maturação espermática é finalizada.

O ducto do epidídimo abre-se dentro do ducto deferente, primeiro local de armazenamento de espermatozoides (RUTZ et al., 2007). Os ductos deferentes terminam no órgão copulador do macho, o falo (BACHA e BACHA, 2003; JOHNSON, 2006; RUTZ et al., 2007).

Figura 2. Trato reprodutivo do macho avícola.



Fonte: (JACOB, J. 2015)

Os testículos das aves possuem tanto função espermática como também produzem e secretam hormônios, principalmente os andrógenos, dentre os mais importantes está a testosterona (SESTI e ITO, 2000). Os testículos estão envolvidos por três camadas: a túnica serosa externa, túnica albugínea e a túnica vascular (SAMUELSON, 2007). Internamente, os testículos possuem uma rede de túbulos seminíferos revestidos pelas células de Sertoli e células germinativas, e pelo estroma intersticial que abriga os vasos sanguíneos e os linfáticos, e as células de Leydig (JOHNSON, 2006).

Boni e Ponsati (2005) classificaram o desenvolvimento testicular em três etapas: pré-puberal, puberal e adulta. Na primeira etapa, que se dá até a 14ª semana de

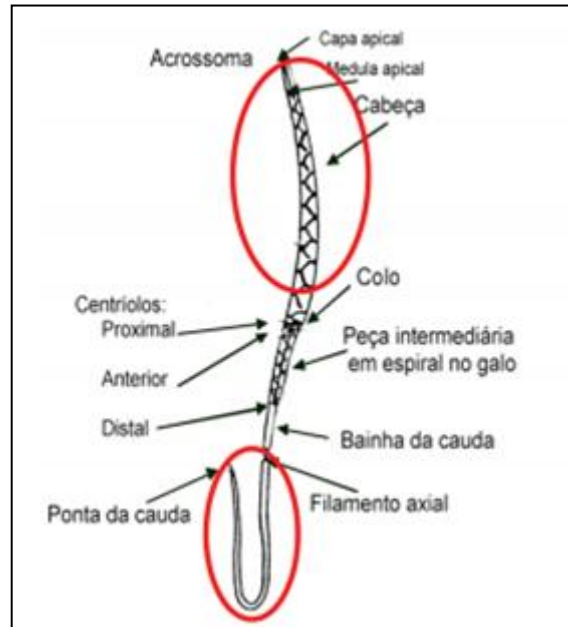
idade das aves, ocorre a intensa proliferação das células de Sertoli. Na fase puberal, acontece a formação dos primeiros espermatozoides e se mantem até a fase adulta. Após as 40^a semanas há um declínio da formação espermática e há uma redução do peso testicular. Na medida em que o animal amadurece, há um desenvolvimento histológico testicular, passando de apenas uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias para um epitélio seminífero (GONZÁLES et al., 2008).

Os espermatozoides têm origem no epitélio dos túbulos seminíferos, chamado de epitélio germinativo. A proliferação desse epitélio também é conhecida como espermatogênese. A espermatogênese é a diferenciação celular sofrida pelas espermátides para se tornarem espermatozoides (SESTI, 2003). As células de Sertoli permitem que essas diferenciações espermáticas ocorram, envolvendo as células germinativas durante o seu desenvolvimento (GARNER, 2004; HAFEZ, 2004, GUIBERT et al., 2011). A espermatogênese é relativamente curta, entre o início da meiose e a formação do espermatozoide é em torno 15 dias.

O ejaculado possui uma elevada concentração de espermatozoides, alto número de células espermáticas em um pequeno volume de plasma seminal. Essa alta concentração, de um a cinco bilhões de espermatozoides por ml de ejaculado é devido à ausência das glândulas acessórias (RITCHSON, 2013). O volume de sêmen produzido depende da raça e do tamanho da ave. Segundo Etches (1996) o volume do ejaculado depende do tamanho do testículo, e este por sua vez está correlacionado com o peso corporal. As características seminais também estão relacionadas com a idade. De acordo com Cerolini (1997), o volume seminal, concentração e motilidade espermáticas reduzem à medida que as aves envelhecem. A formação do plasma seminal e a concentração do sêmen de galos resultam da reabsorção de líquidos no epidídimo, onde os espermatozoides permanecem por cerca de 100 minutos (RITCHSON, 2013).

Os espermatozoides de galos são compostos por acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (BURKE, 1996), como podem ser observados na Figura 3. A cabeça é filamentososa e longa, e não possuem gota citoplasmática. A morfologia espermática parece ser uma das mais importantes características qualitativas do sêmen (KUSTER et al., 2004). 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. A morfologia espermática pode também servir como um indicador de desordens na espermatogênese.

Figura 3. Desenho de um espermatozoide avícola e seus diferentes componentes estruturais. Em destaque as duas porções com maior índice de defeitos com o avanço da idade.



Fonte: (STURKIE e PEL, 1976)

Moss et al. (1978) afirmam que todas as amostras de sêmen de diferentes espécies ou 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 está 70 e 80%.

Um dos fatores que mais interferem nas características seminais é a idade. Com o alcançar da idade, percebe-se uma redução no número de espermatozoides no ejaculado e no volume de sêmen, além de redução da motilidade, viabilidade e integridade do espermatozoide (IAFFALDANO et al., 2003). Segundo Cerolini (1997) o volume seminal, concentração e motilidade espermática são maiores no período de pico de produção do plantel, quando o trato reprodutor está sexualmente maduro e, reduzem com o envelhecimento das aves.

2.2 Constituição dos espermatozoides

Os lipídios constituintes da membrana dos espermatozoides influenciam a fertilidade (KELSO et al., 1997). Eles são os maiores constituintes dos componentes

estruturais das membranas, são precursores de diferentes componentes biológicos como os eicosanoides e são usados como fonte de energia (SURAI et al., 2001).

Os lipídios do sêmen das espécies aviárias incluem os ácidos graxos saturados (normalmente C18:0 e C16:0), monoinsaturados (C18:1n-9, C18:1n-7 e C20:1 n-9) e os poli-insaturados (C18:2 n-6, C20:4 n-6, 22:4 n-6 e 22:6 n-3) (SURAI et al., 1998).

Essas proporções de ácidos graxos variam entre as espécies. Os espermatozoides do pato contêm maiores proporções de ácidos graxos poli-insaturados, enquanto os espermatozoides de ganso e peru contêm menores proporções em comparação com a espécie anterior. Essas maiores proporções de ácidos graxos poli-insaturados, nos lipídios do espermatozoide de pato e galos, contribuem para um alto índice de peroxidação do sêmen quando comparada as outras espécies (SURAI et al., 2001).

Os fosfolipídios compreendem a maior classe lipídica dos espermatozoides, 66,4-70,7% dos lipídios totais dos mesmos (SURAI et al., 2001). As proporções de fosfolipídios aumentam com a idade, em até 72,1% da fração lipídica total até a 60ª semana de idade (KELSO et al., 1996), mas diminuem a partir da 72ª semana (KELSO et al., 1997).

Em todas as espécies os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por conter grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, o que sugere que a composição de lipídios e ácidos graxos dos espermatozoides, pode ser um fator determinante das taxas de fertilidade (MARTINRILLO et al., 1996). Uma vez que esse tipo de constituição favorece a peroxidação lipídica. A composição de lipídios da membrana do espermatozoide é o maior determinante sobre a motilidade e, principalmente, viabilidade espermática (RODENAS, 2005).

Os espermatozoides das espécies aviárias são caracterizados por conterem grandes proporções dos fosfolipídios de cadeia longa (C20-22). Os ácidos graxos de cadeia longa, mais encontrados nas membranas dos espermatozoides são da série n-6, dentre eles o araquidônico (C20:4n-6) e o decosatetraenóico (C22:4n-6). A importância de ácidos de cadeia com 22 carbonos em relação à fertilidade, tem sido estudada em humanos, demonstrando que altas quantidades de DHA em espermatozoides está diretamente relacionada com a motilidade espermática. (NISSENN e KREYSEL, 1983; ZALATA et al., 1998; CONQUER et al., 1999)

Os ácidos graxos poli-insaturados cumprem uma função importante no espermatozoide, mas ainda sem especificidade, quando estão em baixas quantidades no espermatozoide a fertilidade é comprometida (KELSO et al., 1996).

Em aves, a diminuição da espermatogênese e qualidade do sêmen é mais evidente com o avançar da idade, há uma diminuição nas proporções dos ácidos graxos, C20:4n-6 e C22:4n-6 na fração fosfolípídica dos espermatozoides (KELSO et al., 1996). Mais notavelmente, a diminuição da proporção de C22:4n-6 nos fosfolípidos totais, o qual, mostrou uma correlação negativa com a idade, mas esta positivamente correlacionada com a motilidade dos espermatozoides e capacidade de fertilização (CEROLINI et al., 1997).

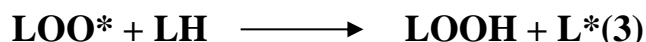
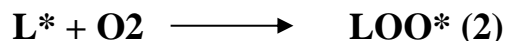
O C20:4n-6 apresentou um efeito positivo no volume de sêmen e consequentemente um maior número de espermatozoides. Dietas contendo γ -linolênico têm promovido um efeito negativo sobre a concentração de sêmen (CEROLINI et al., 2000). Um efeito positivo sobre a taxa de fertilidade com dietas contendo ácidos graxos poli-insaturados, depende da idade da ave e acontece em machos reprodutores novos, nos quais o potencial da atividade reprodutiva pode ser totalmente expressado. O incremento na fertilidade nem sempre está associado com a composição dos ácidos graxos dos espermatozoides provenientes da dieta (CEROLINI et al., 2000).

2.3 Mecanismos e consequências da peroxidação lipídica

Os radicais livres (radical hidróxi) – OH, podem iniciar a peroxidação lipídica pela reação de captação do hidrogênio (SURAI et al., 2001).



A propagação da peroxidação lipídica ocorre da seguinte forma:



Uma vez que a reação (3) é a limitante da velocidade, qualquer substância que possa reduzir a concentração de radicais peróxil (LOO*) limitará a peroxidação lipídica (HOGG, 1998). Essas substâncias que limitam a velocidade da reação (3) são os

antioxidantes. Os principais antioxidantes biológicos das células são: vitamina E, vitamina C e a enzima glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase.

HALLIWELL (2006) descreve a peroxidação em três etapas: na primeira, os ácidos graxos poli-insaturados sofrem ataques espécies reativas ao oxigênio (EROs) 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. Em meio aeróbio, o radical alquila formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de 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 e ABDALIA, 2001).

A terceira etapa da reação (terminação) dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicais (HALLIWELL, 2006). Os radicais peroxila e alcoxila também podem sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da peroxidação (SPITELLER, 1998).

Segundo Bilodeau et al., (2002) os espermatozoides são capazes de gerar espécies reativas, essa susceptibilidade aos danos oxidativos causados pelos EROs são decorrentes da alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presente nas estruturas dos espermatozoides. O oxigênio é a fonte de EROs produzidos nas reações metabólicas para as células obter energia pela oxidação de nutrientes. As células possuem um sistema antioxidante próprio que geram e neutralizam os EROs durante o metabolismo aeróbico. O estresse oxidativo pode ser causado quando esse sistema antioxidante está alterado em células com eventos oxidativos aumentados (ORTEGA, 2003). As células usam antioxidantes armazenados como a glutathione e a vitamina E para remover radicais livres quando em estresse oxidativo (KIM et al., 2010).

Lucchese et al., (2007) afirmam que o processo de peroxidação lipídica pode induzir dano ao DNA espermático, acelerando o processo de morte celular da célula germinativa, diminuindo a concentração de espermatozoides e deteriorando a qualidade seminal. Os antioxidantes são importantes para manter a mitocôndria intacta. Esta organela está localizada na peça intermediária do espermatozoide e é responsável pela

motilidade e também pela maior flexibilidade da membrana e fluidez. Para que realize estas propriedades, a mitocôndria necessita altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados. Entretanto, níveis altos destes ácidos tornam a célula mais vulnerável à oxidação e à produção de radicais livres (SURAI, 2002).

Os espermatozoides estão constantemente expostos aos ambientes oxidativos desde o momento em que são formados no testículo até a ejaculação e passagem pelo trato reprodutivo da fêmea (WEIR e 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; FERREIRA, 2010). De acordo com Rutz et al., (2007) a proteção antioxidante do sêmen confere manutenção da fluidez de membrana, além de flexibilidade e permeabilidade necessária para o processo de fertilização.

A oxidação desses ácidos graxos poli-insaturados, que possuem grande influência sobre a capacidade fertilizante dos espermatozoides deve ser minimizada. A presença de altas concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados dentro das frações lipídicas torna-se necessária um sistema antioxidante eficiente para proteger os espermatozoides contra os danos e de possíveis modificações morfológicas do espermatozoide.

Em geral, o sêmen de aves contém vitamina E, vitamina C, glutathione peroxidase 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 atua na neutralização de radicais livres, impedindo a peroxidação lipídica e mantendo a qualidade espermática (RUTZ et al., 2007).

Os ácidos graxos poli-insaturados se encontram principalmente na membrana plasmática dos espermatozoides (BONGALHARDO et al., 2002). Esse alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados nos espermatozoides encontrados principalmente na membrana plasmática da cabeça, favorece a peroxidação lipídica, pois as duplas ligações formam os radicais livres que ao se juntar com o oxigênio metabólico torna-os materiais altamente oxidáveis (MCDOWELL, 1989). Segundo Aitken (1995) a fluidez espermática e a capacidade fertilizante do galo diminuem no espermatozoide peroxidado. A ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares leva a uma série de eventos bioquímicos que culminam na morte celular (BENZIE, 1996).

Makker et al., (2009) e Bansal e Bilaspuri (2010) comprovaram que antioxidantes quando adicionados na dieta de machos reduzem o estresse oxidativo dos espermatozoides. Dentre os antioxidantes que cumprem esse papel, encontram-se as vitaminas C e E, betacarotenos, carotenoides e flavonoides.

2.4 Antioxidantes

A utilização de antioxidantes em dietas, como os carotenoides e as vitaminas C e E, é uma maneira de auxiliar o sistema enzimático de proteção contra o ataque de radicais livres (SOUTHON, 2000). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica, onde os radicais livres são produzidos naturalmente. Quando não estão em sinergismo, os mecanismos de defesa e a produção de radicais livres ocorrem o processo de estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006).

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação através da inibição da produção e dos efeitos radicais livres. Assim, os antioxidantes têm como função de retardar ou inibir a ação oxidante de radicais livres.

O sistema antioxidante protege o organismo da formação de radicais livres. Essa proteção ocorre por meio de antioxidantes presentes por todo o corpo. Antioxidante é qualquer substância que, regenera o substrato ou impede significativamente a oxidação de maneira eficaz (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

Os antioxidantes podem ser de origem endógena, quando produzidos no próprio organismo e dividem-se em enzimáticos e não enzimáticos, ou podem ser de origem exógena. Os de origem exógenas são adicionados a dieta como as vitaminas (por exemplo, vitamina A, C, E e B1) e pigmentos como os carotenoides (ROSA et al., 2012).

Esses componentes antioxidantes responsáveis por manter as funções espermáticas atuam em três fases de defesa. Segundo Surai (2002), a enzima superóxido dismutase juntamente com a glutatiónaperoxidase 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 glutatióna 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. Apesar de o plasma seminal ser substituído pelos fluidos secretados no oviduto das fêmeas, a vitamina E e C ainda atuam como antioxidantes (RUTZ et al., 2005).

2.4.1 Vitamina E

A vitamina E encontrada na forma de tocoferóis e tocotrienóis possui características benéficas quando adicionada a dieta. Naturalmente encontrada nos espermatozoides, a vitamina E está envolvida na manutenção da integridade e motilidade espermática e sua suplementação pode contribuir positivamente com o desempenho reprodutivo. O α -tocoferol é a forma mais importante de vitamina E, pois, possui maior atividade quando comparada as demais formas, pois possui maior absorção e deposição, menor excreção (MACPHERSON, 1994). Os tocoferóis convertem os radicais livres em espécies mais estáveis por meio da doação de um átomo de hidrogênio, gerando produtos eletricamente estáveis ou menos reativos (NWOSE et al., 2008). A quantidade de vitamina E no sêmen e nos tecidos depende da sua concentração na dieta (SOUZA e FERREIRA, 2007).

Os antioxidantes possuem um papel importante na reprodução das aves. A vitamina E é um antioxidante natural e melhora a qualidade do sêmen e a habilidade de fertilização em galos prevenindo a peroxidação lipídica nas membranas dos espermatozoides. 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 EROs e peroxidação lipídica. Horton et al., (2002) atribuem o fato de a vitamina E ser a primeira linha de defesa contra os ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular ao caráter lipofílico da vitamina.

Estudos realizados por Surai et al., (1996) utilizando reprodutores da raça *Rhode Island Red* com 6 meses de idade e alimentados com uma dieta basal de 12 mg/kg de acetato de α -tocoferol, juntamente com outros três grupos que receberam suplementação com 20, 200 e 1000 mg de acetato de α -tocoferol. A concentração de α - tocoferol, tanto no plasma seminal como no espermatozóide, foi duas vezes maior quando a suplementação foi de 200 mg/kg comparada com a suplementação de 20 mg/kg; mas, quando a suplementação foi de 1000 mg/kg não foi observado nenhum aumento adicional na concentração de α - tocoferol.

Os espermatozoides têm uma capacidade limitada de incorporar vitamina E no interior das suas membranas e esta capacidade pode depender de muitos fatores, entre eles, principalmente, a composição dos ácidos graxos (DONOGHE et al., 1997).

Independentemente da espécie a inclusão da vitamina E pode melhorar a características seminais. Yousef et al., (2003) testou a inclusão de vitamina E e C em

dietas de coelhos, e observaram melhorar nas características seminais destes animais. A inclusão destas duas vitaminas também reduziu o estresse oxidativo no plasma seminal. Bansal e Bilaspuri (2009) testaram a inclusão da vitamina E sobre a motilidade e viabilidade espermática em bovinos, além destes parâmetros a inclusão também apresentou melhoras significativas sobre a peroxidação lipídica dos espermatozoides.

2.4.2 Selênio

Descoberto como nutriente essencial em 1950, o selênio é um micro mineral necessário para o crescimento e desenvolvimento dos animais (LESSON e SUMMERS, 2001). Pode ser fornecido na forma inorgânica através do selenato de sódio (Na_2SeO_4) e selenito de sódio (Na_2SeO_3) e na forma orgânica através da selenometionina ou selenocisteína (PAN et al., 2010).

O selênio age no sistema antioxidante sendo componente das selenoproteínas e atua indiretamente ou diretamente evitando o estresse oxidativo. O selênio pode atuar ainda, economizando a vitamina E, devido a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas. Ebeid (2009) avaliou os efeitos da inclusão de níveis crescentes de selênio orgânico (0-controle, 0,1ppm, 0,2ppm e 0,3ppm de seleno levedura) no status antioxidante de galos sob condições de estresse térmico. Os animais que receberam dietas suplementadas com 0,3 ppm de selênio apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, mostrando que a suplementação com selênio levedura melhorou o *status* antioxidante dos animais.

O selênio demonstrou ser, entre todos os minerais indicados como essenciais um dos elementos mais importantes quando se trata de reprodução. Uma dieta deficiente em selênio pode acarretar na diminuição do número de espermatozoides, diminuição da motilidade e da capacidade fertilizante (SURAI et al., 1998; SURAI, 2000).

A enzima glutationa peroxidase também está presente no sistema reprodutor, primeiro pela ação antioxidante, pois durante a formação e maturação espermática é vital para proteção da membrana lipídica dos espermatozoides, para que não sofram peroxidação pelos radicais livres, que causa ruptura da membrana e morte do espermatozoide. Uma segunda função desta enzima no sistema reprodutor é a sua função estrutural por meio da PH-GSH-Px que, além de sua ação antioxidante, é estrutura fixa da peça intermediária dos espermatozoides, estando presente na membrana e nas

mitocôndrias, além de estar presente também na cabeça do espermatozoide (SURAI, 2001).

Quando há deficiência de selênio, há menor síntese de PH-GSH-Px e, como consequência, a gametogênese do macho fica comprometida e os espermatozoides apresentam diversos problemas morfológicos como cabeça e caudas livres, deformações na cabeça e peça intermediária inclusive com ruptura estrutural, diminuição do número de espermatozoides por ejaculado e aumento na morte de espermatozoides (ALVIM e SOUZA, 2005).

Uma dieta deficiente em selênio acarreta na diminuição do número de espermatozoides normais por ejaculado e diminui a motilidade e a capacidade de fertilização (BEHNE et al., 1982). Em aves a inclusão de selênio na dieta aumentou a atividade da glutathione peroxidase no fígado, nos espermatozoides e no plasma seminal (SURAI et al., 1998)

Os espermatozoides e os leucócitos seminais produzem grande quantidade de EROs que podem reduzir a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides (AIVAREZ e STORY, 1992). A ação dos EROs modifica o citoesqueleto e axonema do espermatozoide que leva à uma redução na motilidade espermática (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1992), inibe fusão do espermatozoide com o ovócito (AITKEN et al., 1989) e diminui da fertilidade (WISHART, 1984).

Ebeid (2009) comprovou que a suplementação de Selênio orgânico melhorou as características de qualidade do sêmen, como concentração de espermatozoides e motilidade e reduziu a porcentagem de espermatozoides mortos. Em muitas espécies animais, o selênio está em altas concentrações nas glândulas endócrinas. Deguchi (1996); Behne et al., (1982) mostraram que em condições de deficiência os testículos retêm selênio.

2.4.3 Cantaxantina

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 e SERAVALLI, 2004). Os carotenoides além de sua função pigmentante possuem atividade pró-vitaminas e antioxidante. Nutricionalmente, os carotenoides podem ser classificados como pró-vitâmico, 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, conhecidos como carotenos, e oxigenados, conhecido como xantofilas (GOODWIN, 1965). Estes dois grupos são subdivididos de acordo com sua estrutura, destacando-se os subgrupos hidrocarbonetos, como o licopeno e as cetonas onde se encontra a cantaxantina. A propriedade antioxidante dos carotenoides foi descrita por Shami e Moreira (2004), que relataram a proteção proporcionada por esses compostos às células contra danos oxidativos, provocados por radicais livres e por EROs que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, atacando lipídios, proteínas, carboidratos e DNA.

Em relação à utilização da cantaxantina na atividade avícola, como agente antioxidante, alguns estudos sugerem que esses compostos agem 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 e Speake (1998) observaram uma maior resistência à peroxidação lipídica nos tecidos dessas aves.

Scher et al., (2009) ao incluir cantaxantina na dieta de matrizes de corte entre as 45 e 65 semanas de idades, verificaram redução do índice de oxidação dos lipídios da gema. No que se refere ao 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 espermática e a redução nas alterações morfológicas espermáticas à proteção antioxidante da cantaxantina sobre os ácidos graxos dos espermatozoides.

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito antioxidante da vitamina E, selênio e cantaxantina sobre as características reprodutivas de machos reprodutores da raça *White Plymouth Rock*.

Específicos

- Estudar as características seminais de galos da raça *White Plymouth Rock* no final do ciclo reprodutivo, alimentados com dietas contendo diferentes antioxidantes.
- Estudar o efeito antioxidante da vitamina E, Selênio e Cantaxantina sobre o conteúdo seminal dos reprodutores.
- Analisar a capacidade dos antioxidantes em minimizar a oxidação lipídica dos ácidos graxos presentes no sêmen.
- Analisar os efeitos da oxidação sobre a composição do perfil de ácidos graxos.
- Analisar os parâmetros reprodutivos, tais como volume de sêmen, concentração espermática, motilidade, vigor, alterações morfológicas e pH.

4 CAPÍTULO II

EFEITO DA VITAMINA E SOBRE AS VARIÁVEIS REPRODUTIVAS, ESTADO OXIDATIVO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO SÊMEN DE GALOS *WHITE PLYMOUTH ROCK*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de Vitamina E, na qualidade do sêmen de galos da 53^a à 72^a semana de idade. Este estudo foi realizado no Laboratório de Avicultura (LAVIC) da Universidade Federal de Santa Maria. Foram selecionados 32 machos reprodutores da raça *White Plymouth Rock*, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições por tratamento. Os tratamentos foram: dieta basal (20mg/kg de ração de Vitamina E) e suplementada (200 mg/Kg de ração de Vitamina E) (Acetato 50%). As dietas foram isonutritivas, sendo permitido acesso, *ad libitum*, água e ração. O período experimental foi dividido em cinco períodos: período I - 53^a-56^a semana; Período II - 57^a-60^a semana; Período III - 61^a-64^a semana; Período IV - 65^a-68^a semana e período V - 69^a-72^a semana de idade. Os dados foram submetidos à análise de variância através do programa SAS (2011), considerando-se estatisticamente diferente ao nível de 5% de probabilidade. O peso corporal foi determinado no início do experimento, ao final de cada período, juntamente com o consumo de ração. A coleta de sêmen foi realizada duas vezes por período, pelo método de massagem dorso-abdominal, em tubos graduados e, o volume foi determinado. Em microscópio óptico, com aumento de 400X, a motilidade e o vigor espermático foram avaliados. Após a leitura do pH, 5 µL de sêmen foram armazenados em 5 mL de formol:citrato, para determinar a concentração espermática e os defeitos morfológicos. Foram também analisadas, as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o perfil de ácidos graxos no sêmen, mensurados ao final dos períodos. Os machos suplementados com vitamina E apresentaram um maior consumo de ração ($P < 0,05$), sem afetar o peso corporal ($P > 0,05$). Os machos suplementados apresentaram menor volume seminal no período V ($P = 0,0295$). A motilidade e o vigor espermático aumentaram significativamente com a inclusão da vitamina E a partir do período II ($P < 0,05$). O pH do sêmen não foi influenciado pela adição de vitamina E ($P > 0,05$). A adição de vitamina E melhorou a concentração espermática nos dois últimos períodos analisados, ($P = 0,0001$) e ($P = 0,0038$), período IV e período V, respectivamente, compreendendo o intervalo entre a 65^a e a 72^a semana de idade. Os defeitos morfológicos totais ($P = 0,0589$), não foram minimizados com a adição da vitamina E. A vitamina E diminuiu substancialmente a oxidação lipídica (TBARS), alterando o perfil de ácidos graxos do sêmen ($P < 0,05$). A vitamina E age como um antioxidante, evitando os efeitos da peroxidação lipídica na célula espermática. Desta forma, causa alterações nos ácidos graxos do sêmen. Os efeitos da vitamina E, levaram a um aumento da motilidade e vigor do espermatozóide da 57^a-72^a semana de idade e aumento da concentração de espermatozoides nos últimos dois períodos, entre as 65^a-72^a semana de idade. A vitamina E pode aumentar a qualidade do sêmen dos machos avícolas.

Palavras-chave: aditivo, espermatozoides, fertilidade, idade, machos, sêmen.

**EFFECT OF VITAMIN E ON THE REPRODUCTIVE VARIABLES,
OXIDATIVE STATUS AND PROFILE OF FATTY ACIDS OF SEMEN OF
WHITE PLYMOUTH ROCK ROOSTERS**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of vitamin E supplementation on the quality of the semen of roosters from the 53rd to the 72nd week of age. This study was carried out at the Poultry Science Laboratory (LAVIC), of the Federal University of Santa Maria. Were selected 32 breeding males White Plymouth Rock distributed in a completely randomized design, with 16 replicates per treatment. The treatments were: basal diet (20mg/kg of feed of vitamin E) and supplemented (200 mg/kg of feed of vitamin E) (50% acetate). The diets were isonutritivas, being allowed access, *ad libitum*, water and feed. The experimental period was divided into five periods: period I - 53rd-56th week; period II - 57th-60th week; period III - 61st-64th week; period IV - 65th-68th week and period V - 69th-72th week of age. The data were submitted to analysis of variance through the SAS program (2011), considering statistically different than 5% of probability. Semen collection was performed twice per period, by the dorso-abdominal massage method, in graduated tubes and, the volume was determined. In an optical microscope, at 400X magnification, the motility and vigor spermatic were evaluated. After reading the pH, 5 μ L of semen were stored in 5 mL of formal: citrate to determine spermatic concentration and morphological defects. Also analyzed were the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and the fatty acid profile in the semen, measured at the end of the periods. The males supplemented with vitamin E presented higher feed intake ($P < 0.05$), without affecting body weight ($P > 0.05$). The supplemented males presented lower seminal volume in the V period ($P = 0.0295$). The motility and spermatic vigor increased significantly with inclusion of vitamin E from period II ($P < 0.05$). The pH of the semen was not influenced by the addition of vitamin E ($P > 0.05$). The addition of vitamin E improved the spermatic concentration in the last two analyzed periods, ($P = 0.0001$) and ($P = 0.0038$), period IV and period V, respectively, comprising the interval between 65th and 72nd week of age. The total morphological defects ($P = 0.0589$) were not minimized with the addition of vitamin E. The Vitamin E substantially reduced lipid oxidation (TBARS), altering the fatty acid profile of semen ($P < 0.05$). The vitamin E acts as an antioxidant, avoiding the effects of lipid peroxidation on the sperm cell. In this way, it causes changes in the fatty acids of the semen. The effects of vitamin E led to increased sperm motility and vigor of the 57th-72nd week of age and increased sperm concentration in the last two periods, between 65th and 72nd weeks of age. The vitamin E can increase the semen quality of poultry males.

Keywords: antioxidants, lipids, males, spermatozoa.

INTRODUÇÃO

É amplamente conhecido que o sêmen perde sua qualidade com o avançar da idade dos reprodutores avícolas, comprometendo os índices de fertilidade dos lotes, principalmente no final do ciclo reprodutivo.

O sêmen aviário é único, quando se trata da composição lipídica das membranas dos espermatozoides. A membrana espermática é formada grande parte por lipídios, um fator importante para a capacidade de fertilização do espermatozoide (CEROLINI et al., 1997). A fração lipídica contém altas proporções de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa com 20 e 22 carbonos (CEROLINI et al., 2003). Este conteúdo relativamente alto é essencial para a função espermática normal. Serve como base para a membrana plasmática manter a fluidez do espermatozoide e a fusão com o oócito (FORCE et al., 2001; GULAYA et al., 2001).

Porém, o elevado grau de insaturações na cadeia lipídica torna estes gametas altamente suscetíveis a peroxidação lipídica e limita a proporção de ácidos graxos poli-insaturados, comprometendo a viabilidade espermática (KHATIBJOO et al., 2011).

Os tecidos reprodutivos mais velhos apresentam uma menor defesa antioxidante, com uma enorme correlação com a perda da fertilidade. A viabilidade e a capacidade de fertilizar do espermatozoide são altamente dependentes de uma eficaz capacidade antioxidante e da composição lipídica.

Com o avançar da idade, pode ser necessária uma suplementação exógena de aditivos que funcionam como antioxidantes, completando assim o sistema de defesa natural. A suplementação com antioxidante não é apenas importante em dietas que contém inclusão de óleos, mas também é um pré-requisito para qualquer dieta basal, a fim de manter a fertilidade (DEIVENDRAN e HO HONG, 2015).

Naturalmente encontrada no sêmen de galos, a vitamina E melhora a qualidade do sêmen, a habilidade de fertilização e previne a peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (BISWAS et al., 2009). Em consequência, há um aumento na concentração espermática, melhora da motilidade, redução de anormalidades, bem como o *status* antioxidante do sêmen (EID et al., 2006).

A suplementação com vitamina E pode alterar o metabolismo dos ácidos graxos e aumentar as proporções dos ácidos graxos poli-insaturados com cadeias carbônicas C₂₀ e C₂₂. Devido ao caráter lipofílico da vitamina E, os espermatozoides constituem um meio

ideal para a vitamina atuar e ser incorporada na membrana, onde atua fortemente como antioxidante (SURAI et al., 2001).

Este estudo buscou avaliar a inclusão da vitamina E na dieta de machos *White Plymouth Rock* no final do ciclo reprodutivo e seus efeitos sobre as características espermáticas, susceptibilidade a peroxidação e alterações no perfil de ácidos graxos do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Avicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil.

Animais e tratamentos

Foram selecionados 32 machos reprodutores da raça *White Plymouth Rock*, alojados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas individuais (0,33 x 0,60 x 0,60m). Foram submetidos há um programa de iluminação de 17 horas/luz/dia. As aves foram mantidas em um período pré - experimental das 50^a às 52^a semanas de idade, para adaptação a coleta e resposta ao estímulo a massagem dorso-abdominal para ejaculação. O período experimental compreendeu da 53^a semana até a 72^a semana de idade das aves.

Os tratamentos consistiram em machos suplementados com a dieta controle basal (20mg/kg/dieta de vitamina E) e machos que receberam dieta basal suplementada com vitamina E (200mg/kg/dieta de vitamina E). Os níveis nutricionais utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Os níveis nutricionais foram baseados nas recomendações de Rostagno et al., (2011). O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum*. Os machos foram pesados individualmente no início do experimento e a cada período de 28 dias, bem como a ração ofertada e as sobras para determinar o consumo.

Tabela 1- Composição centesimal e perfil nutricional

INGREDIENTES %	
Milho	59,56
Farelo de Soja	15,52
Farelo de Trigo	10,00
Fosfato Bicálcio	1,86
Calcário Calcítico	0,86
DL- metionina	0,07
Sal	0,40
Premix- Mineral ¹	0,05
Premix Vitaminico ²	0,10
Inerte	11,58
Composição Calculada	
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	2600
Proteína Bruta %	14,00
Cálcio %	0,90
Fósforo disponível %	0,45

¹ Níveis mínimos de garantia do premix mineral (Kg/produto): Cobre 20g, Ferro 100g, Manganês 160g, Cobalto 2000mg, iodo 2000mg e Zinco 100g. ² Níveis mínimos de garantia do premix vitamínico (Kg/produto): Vit A 9000000UI, Vit D3 2500000UI, Vit E 20000UI, Vit K3 2500mg, Vit B1 1500mg, Vit B2 600mg, Vit B6 3000mg, Vit B12 12000mg, Ácido Pantotênico 12g, Niacina 25g, Ácido Fólico 800mg, Biotina 60g e Selênio 250mg.

Coleta de sêmen

O sêmen foi coletado quinzenalmente pelo método de massagem dorso-abdominal proposto por Forgiarini (2015). Foram utilizados tubos *falcon* graduados mantidos em banho maria em temperatura de 40° C. Logo após a coleta foi verificado o volume do ejaculado e avaliados os parâmetros de motilidade, vigor e pH. Após 5µl de sêmen foi armazenado em 5 ml de uma solução formol:citrato para posteriormente ser realizado as análises de concentração e morfologia espermática.

Motilidade e vigor espermático

Para a mensuração da motilidade, foi avaliado o movimento progressivo retilíneo e uniforme dos espermatozoides. Colocou-se 5µl de sêmen em uma lamina pré-aquecida e recoberta por uma lamínula. As células espermáticas foram observadas em microscopia de luz, com aumento de 200x. O resultado final foi expresso em porcentagem de células que apresentavam movimento retilíneo e progressivo.

O vigor espermático, demonstra a qualidade do movimento dos espermatozoides móveis conforme a metodologia proposta por Silva et al., (2002). O resultado apresentado

em escores onde: 0 - Células espermáticas imóveis; 1- células espermáticas com movimentação lenta, latero-lateral, sem progressão; 2 - células espermáticas com rápida movimentação latero-lateral, sem progressão retilínea; 3 - células espermáticas com rápidos movimentos latero-laterais, com alguma progressão retilínea; 4 - células espermáticas com movimentação lenta e com contínua progressão retilínea e 5- células espermáticas com movimentação rápida e contínua progressão retilínea.

Concentração espermática

Para a análise de concentração foi adicionado 5µl de sêmen em 5ml de solução de formol:citrato. Para a determinação da concentração espermática o sêmen foi diluído em uma proporção de 1:1000 para posteriormente ser realizado a contagem de células espermáticas em hemocitometro (*Câmara de Neubauer*), com resultado expresso em número de células por mm³ de sêmen. O resultado foi transformado para número de células por ml de sêmen.

Morfologia espermática

Para avaliação das anormalidades espermáticas, foram adicionados 5µl de sêmen em solução de formol:citrato. Uma gota desta mistura foi colocada sobre uma lâmina e sobreposta com lamínula deslizante, em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase (ampliação de 1000X, imersão em óleo). As células foram categorizadas em normais e as alterações descritas individualmente e agrupadas em anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, apresentado em percentagem.

Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados através de *pools* de sêmen formados pelos mesmos quatro machos, determinados às 56, 60, 64, 68 e 72 semanas de idade, ou seja, uma vez ao final cada período.

Os lipídeos totais foram extraídos do sêmen através da solução de hexano: isopropanol (HARA e RADIN, 1978). A fração lipídica foi transesterificada e metilada baseado na metodologia descrita por Christie (1982).

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa em cromatógrafo gasoso capilar (AGILENT 6890 SERIES GC SYSTEM); coluna capilar: (SUPELCO, 60m x 0,25mm, filme 0,25 μ m; Sigma Aldrich). As condições cromatográficas foram: fluxo coluna de 1,00mL/min; as temperaturas do detector e do injetor foram 280°C e 250°C, respectivamente. A rampa de temperatura do forno iniciou com 100°C, permanecendo por 1 minuto, então aumentada até 240°C a uma taxa de 4°C/min, permanecendo por 20min. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e, o volume injetado foi de 1,0 μ L. As identificações dos picos foram verificadas por comparação com os tempos de retenção a um padrão mix37 de ácidos graxos ésteres metílicos (Sigma Chemical Co., Poole).

A integração dos picos e a manipulação dos dados subsequentes foram realizadas utilizando um sistema de dados AGILENT. Os ácidos graxos são apresentados como percentual de ácidos graxos identificados.

Avaliação do estresse oxidativo – Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica do sêmen foi determinado através de *pools* de sêmen formados pelos mesmos quatro machos, determinados às 56, 60, 64, 68 e 72 semanas de idade, ou seja, uma vez ao final cada período.

O potencial antioxidante do sêmen foi baseado nas Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), conforme a metodologia descrita por Okawa et al., (1979). Essa metodologia tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA) produzindo um complexo de coloração rósea, quantificado por espectrofotometria através de um comprimento de onda de 532 nanômetros comparados a amostra padrão de MDA. A concentração de TBARS é determinada utilizando o valor de $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} ml^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do MDA, sendo a resistência do sêmen a oxidação lipídica expressa em nanogramas de TBARS/ml de sêmen.

Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada logo após a coleta e estimado com papel indicador universal em escala 1-14.

Delineamento experimental e análise estatística

Os dados experimentais foram agrupados em períodos, totalizando cinco períodos de 28 dias cada: período I – 53^a a 56^a semanas de idade, período II – 57^a a 60^a semanas de idade, período III – 61^a a 64^a semanas de idade, período IV – 65^a a 68^a semanas de idade e período V – 69^a a 72^a semanas de idade.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com dois tratamentos e 16 repetições cada, onde cada macho foi considerado uma repetição. Para as mensurações de TBARS e perfil de ácidos graxos foram formados *pools* de sêmen. O sêmen de quatro machos foi reunido para obter material suficiente para as análises, totalizando quatro repetições de quatro machos cada por tratamento. Os resultados foram avaliados utilizando ANOVA, usando o pacote estatístico SAS software (2011; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Todos os valores foram expressos como sendo médias \pm erro padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas a 5% de significância. O modelo utilizado no presente estudo foi o seguinte: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$. Sendo: Y_{ij} - representando as variáveis dependentes observadas; μ - média da população; T_i - efeito do tratamento e e_{ij} - erro residual aleatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de consumo alimentar estão apresentados na Tabela 2. Pode-se inferir que a suplementação de 200 mg de vitamina E, influenciou o consumo alimentar das aves ($P < 0,05$). As aves do grupo suplementado apresentaram consumo de alimento superior aos das aves que receberam o tratamento controle.

A suplementação da vitamina E pode influenciar na produção de hormônios tireoidianos, os quais aumentam a taxa metabólica e desta forma, aumentando o consumo alimentar. Sahin et al., (2002) atribuíram o aumento do consumo promovido pela vitamina E ao aumento das concentrações de hormônios produzidos pela tireoide, T3 e T4, que são diretamente relacionados com o aumento do metabolismo animal e conseqüentemente, o consumo alimentar.

No entanto, neste experimento a adição de vitamina E, apresentou um aumento no consumo de ração, porém, insuficiente para aumentar o peso corporal (2892g controle vs. 2857g suplementado) ($P > 0,05$).

Tabela 2. Consumo alimentar (g/ave/dia) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

	Controle Negativo	Vitamina E	P	CV%
Período I	115,37 ± 2,17	123,37 ± 2,17	0,0142	7,27
Período II	116,56 ± 2,26	124,50 ± 2,26	0,0190	7,51
Período III	112,46 ± 1,95	120,50 ± 1,89	0,0062	6,49
Período IV	108,60 ± 2,45	115,50 ± 2,37	0,0525	8,46
Período V	107,73 ± 1,47	112,50 ± 1,43	0,0278	5,19
Média total	111,52 ± 2,04	119,27 ± 2,04	0,0392	3,95

(P<0,05) – diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Conforme observado na Tabela 3, não houve observações significativas para o volume de sêmen nos primeiros quatro períodos analisados ($P>0,05$). No período V a suplementação com vitamina E exerceu uma influência negativa sobre tal parâmetro. Os machos produziram um menor volume seminal, quando comparados ao controle negativo ($P=0,0295$). Danikowski et al., (2002) também observaram redução na densidade do ejaculado de galos suplementados com 20000UI de vitamina E por kg de ração. O volume ejaculado pode ser afetado pela técnica de coleta utilizada, pela experiência do coletor e por variações no manejo da ave (como, por exemplo, estresse, fornecimento de água e temperatura ambiente).

No último período analisado os machos suplementados com vitamina E apresentaram menor volume seminal, no entanto, houve diferenças estatísticas para a concentração espermática no período IV ($P<0,0001$) e período V ($P<0,0038$) (Figura 1). Os machos que receberam suplementação com vitamina E apresentaram maior concentração espermática por mL de sêmen.

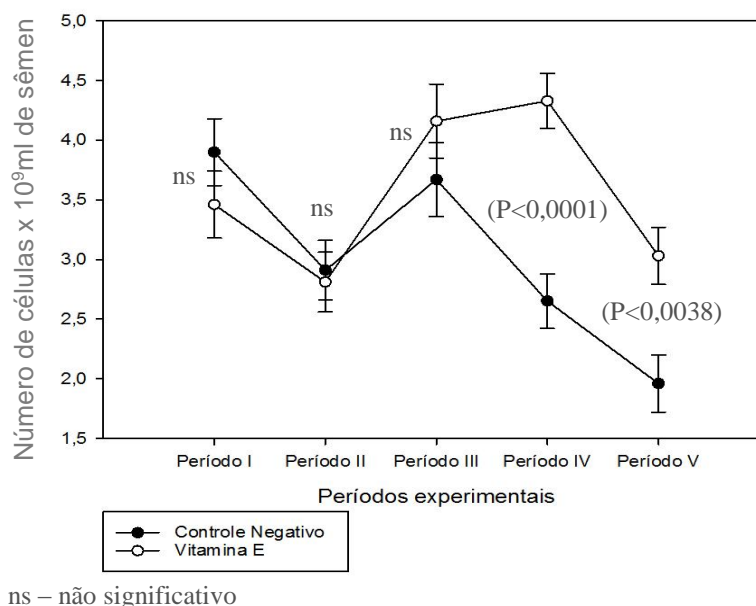
A vitamina E é considerada uma vitamina anti-esterilidade, quando deficiente na dieta pode causar disfunções na espermatogênese (BJORNEBOE et al., 1990). O efeito da vitamina E sobre a concentração espermática foi verificado nos últimos dois períodos, compreendendo entre a 65^a e 72^a semana de idade dos machos. Com o avançar da idade a uma diminuição na espermatogênese e, conseqüentemente, com o número de espermatozoides. A vitamina E pode ter influenciado na manutenção da espermatogênese e desta forma, houve maior produção de células espermáticas na espermatogênese.

Tabela 3. Volume seminal (ml) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

	Controle Negativo	Vitamina E	P	CV%
Período I	0,74 ± 0,05	0,65 ± 0,05	0,2670	32,59
Período II	0,50 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,6570	49,13
Período III	0,68 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,7249	37,02
Período IV	0,73 ± 0,06	0,58 ± 0,06	0,1032	37,39
Período V	0,75 ± 0,06	0,53 ± 0,06	0,0295	42,24
Média total	0,68 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,1108	14,91

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Figura 1. Concentração espermática (número de células x 10⁹/ml de sêmen) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

Os parâmetros de motilidade e vigor espermático do sêmen dos machos foram influenciados positivamente pela inclusão da vitamina E a partir do período II (P<0,05) (Tabela 4, 5). A membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados, podendo facilmente sofrer peroxidação lipídica na presença de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Com isso, ocorre alterações na fluidez da membrana espermática. Os produtos finais gerados pela peroxidação lipídica exercem efeitos tóxicos e podem levar a diminuição da motilidade e do vigor espermático.

O aumento da motilidade e vigor espermático estão relacionados a proteção antioxidante da vitamina E, a qual atua sobre os lipídeos que compõem as membranas das células espermáticas. A peroxidação dos lipídeos compromete a motilidade e o vigor dos espermatozoides. Segundo Yousef (2003) a vitamina E é componente primário do sistema

de proteção antioxidante do espermatozoide e, um dos maiores protetores de membrana contra peroxidação lipídica o ataque de radicais livres. Therond et al., (1996) relatou que a percentagem de motilidade dos espermatozoides foi significativamente relacionada ao conteúdo de α -tocoferol na dieta ($r=0,84$, $P<0,05$). Machos que apresentam alta motilidade espermática possuem espermatozoides com maior capacidade de fertilização do óvulo (MACIEL, 2006).

A avaliação da motilidade e do vigor espermático permite avaliar a qualidade do sêmen, quanto melhor for as taxas de motilidade e vigor espermático, maior a probabilidade de fertilização do óvulo.

Tabela 4. Motilidade espermática (%) do sêmen de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

	Controle Negativo	Vitamina E	P	CV%
Período I	89,53 \pm 0,68	90,93 \pm 0,68	0,1578	3,04
Período II	89,06 \pm 0,38	91,96 \pm 0,38	0,0001	1,69
Período III	86,87 \pm 1,08	92,18 \pm 1,08	0,0017	4,85
Período IV	88,16 \pm 0,56	91,71 \pm 0,54	0,0001	2,43
Período V	82,33 \pm 2,05	89,53 \pm 1,98	0,0175	9,24
Média	87,19 \pm 0,97	91,26 \pm 0,97	0,0186	2,45

($P<0,05$) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Tabela 5. Vigor espermático do sêmen (1-5 scores) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

	Controle Negativo	Vitamina E	P	CV%
Período I	3,87 \pm 0,11	4,03 \pm 0,11	0,3494	3,64
Período II	3,75 \pm 0,09	4,56 \pm 0,09	0,0001	3,20
Período III	3,59 \pm 0,10	4,56 \pm 0,10	0,0001	3,47
Período IV	3,16 \pm 0,08	4,28 \pm 0,08	0,0001	3,24
Período V	3,10 \pm 0,17	3,90 \pm 0,16	0,0020	4,51
Média	3,49 \pm 0,14	4,26 \pm 0,14	0,0056	3,14

($P<0,05$) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Não houve efeito da suplementação com vitamina E sobre o pH seminal (6,20 vs. 6,18) ($P>0,05$). A vitamina E não tem poder de acidificar ou tornar o meio básico. Danikowski et al., (2002) também não observaram diferenças no pH seminal entre animais suplementados ou não com vitamina E. O espermatozoide de galo diminui sua capacidade total de fertilização em meios que variavam amplamente o pH e a osmolaridade (BOGDONOFF e SHAFFNER, 1954; HOBBS e HARRIS, 1963).

Em relação à avaliação da morfologia espermática, observou-se, conforme a Tabela 6, que os galos suplementados com vitamina E apresentaram menores defeitos morfológicos de cabeça no período II ($P=0,0002$) e no período III ($P=0,0062$). Conseqüentemente, os defeitos totais também foram menores nos períodos II ($P=0,0017$) e III ($P=0,0036$) no grupo suplementado com vitamina E (Tabela 7).

A inclusão da vitamina E não resultou em diferenças sobre os tratamentos avaliados, para os defeitos morfológicos da peça intermediária (0,84% vs. 0,74%) e defeitos de cauda (1,34% vs. 0,92%) ($P>0,05$).

O aumento significativo espermatozoides morfológicamente anormais no grupo controle, demonstrou uma influência dietética da vitamina E em reduzir as anormalidades. Segundo Schramm e Pingel (1991) um aumento do pH pode causar alterações morfológicas. Como diferenças significativas de pH não ocorreram, o valor do pH pode ser excluído como causa das alterações, assim ser, atribuído ao efeito da adição da vitamina E.

A vitamina E atuou reduzindo a peroxidação lipídica, a qual, pode causar danos na estrutura celular e aumentando o número de células com defeitos. Essa vitamina também atua protegendo contra disfunções de espermatogênese, que possam levar a alterações nos espermatozoides. A vitamina E está naturalmente presente no sêmen dos galos, onde ajuda a manter a integridade da membrana (DONOGHUE e DONOGHUE, 1997).

Trabalhos sobre morfologia espermática em galos são escassos, principalmente aqueles que os correlacionam com problemas reprodutivos. As anormalidades são incompatíveis com uma boa fertilidade, portanto, qualquer alteração nas características pode comprometer a capacidade fertilizante do espermatozoide (MACIEL, 2006).

A adição de níveis moderados (150 mg/kg/dieta) de vitamina E na ração melhorou a fertilidade e reduziu as anormalidades dos espermatozoides em codornas (BISWAS et al., 2007) e em machos de galos caipiras (BISWAS et al., 2009).

Tabela 6. Defeitos morfológicos de cabeça (%) dos espermatozoides de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

	Controle Negativo	Vitamina E	P	CV%
Período I	2,36 ± 0,49	1,56 ± 0,49	0,2701	10,16
Período II	4,81 ± 0,47	2,01 ± 0,47	0,0002	7,54
Período III	5,16 ± 0,57	2,76 ± 0,57	0,0062	7,72
Período IV	6,59 ± 1,44	6,14 ± 1,40	0,8258	9,46
Período V	5,34 ± 0,62	4,65 ± 0,60	0,4393	7,10
Média total	4,86 ± 0,77	3,44 ± 0,77	0,2303	6,57

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Tabela 7. Defeitos morfológicos totais (%) dos espermatozoides de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E

	Controle Negativo	Vitamina E	P	CV%
Período I	4,05 ± 0,61	2,98 ± 0,61	0,2317	8,47
Período II	7,39 ± 0,80	3,44 ± 0,47	0,0017	7,82
Período III	7,30 ± 0,67	4,26 ± 0,67	0,0036	6,96
Período IV	8,71 ± 1,44	8,36 ± 1,40	0,8909	9,28
Período V	6,70 ± 0,74	6,30 ± 0,74	0,7040	6,88
Média total	7,56 ± 0,79	5,08 ± 0,79	0,0589	5,45

(P<0,05) - diferem estatisticamente

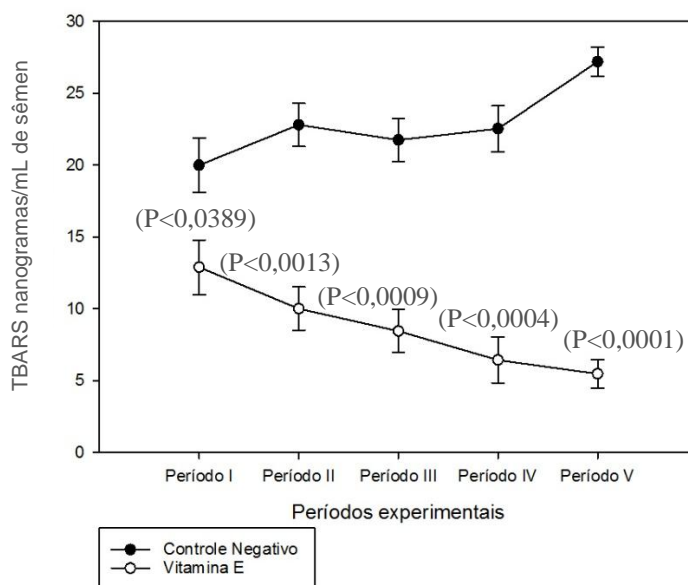
CV% - coeficiente de variação

A suplementação dietética da vitamina E produziu uma melhora significativa na resistência das amostras à peroxidação lipídica. Os galos alimentados com dieta suplementada com vitamina E produziram sêmen com menores teores de TBARS do que (P<0,05) (Figura 2). A peroxidação lipídica é conhecida como um processo prejudicial para os espermatozoides, levando à diminuição da motilidade e reduzida capacidade de fertilização.

A oxidação lipídica ocorre espontaneamente em espermatozoides. Quando o sistema antioxidante natural está em desequilíbrio, pode ocorrer um estresse oxidativo. A suplementação com vitamina E atuou minimizando os efeitos da oxidação e auxiliou esse sistema antioxidante natural. Ela atua diretamente na membrana celular espermática, neutralizando radicais livres e diminuindo os efeitos da oxidação lipídica dos ácidos graxos.

Murakami et al., (2013) demonstram que os machos que receberam incremento nos níveis de vitamina E na ração, apresentaram potencial maior de fertilizar os ovos de suas fêmeas. Os autores atribuíram esse efeito à ação antioxidante que a vitamina E teve sobre os ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular dos espermatozoides, permitindo que um maior número destes atravessasse o oviduto para fertilizar o óvulo.

Figura 2. Oxidação lipídica (TBARS nanogramas/ml) de sêmen de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com vitamina E



As concentrações de TBARS nas amostras de sêmen diminuíram com suplementação de vitamina E, que confirmam os resultados encontrados por Surai et al., (1997). Galos de seis meses de idade foram alimentados com 1000 UI de α -tocoferol/kg de dieta durante um período de 6-8 semanas, o que acarretou na diminuição da concentração de TBARS do sêmen em até 50%.

Danikowski et al., (2002) suplementando machos com α -tocoferol com (0, 100 UI, 1000 UI, 10000UI e 20000 UI/kg da dieta) observaram que níveis crescentes de suplementação apresentam uma relação inversa com a concentração de TBARS no plasma seminal de galos.

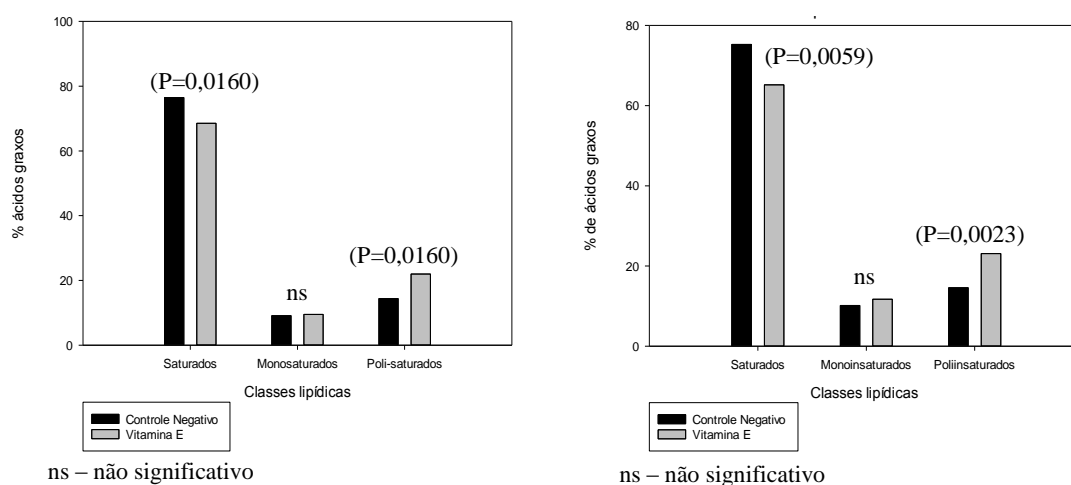
O sêmen das espécies aviárias é caracterizado por conter altas proporções de ácidos graxos insaturados. Essa característica é essencial para a célula manter sua motilidade e fluidez, porém, esta constituição é favorável à peroxidação lipídica. Acredita-se que os mecanismos pelos quais as espécies reativas ao oxigênio (EROs) perturbam a função espermática envolvem a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática do esperma, este processo desempenha um papel importante nos índices de infertilidade dos machos.

As consequências benéficas significativas desta resistência reforçada pela vitamina E à peroxidação lipídica, sobre o perfil de ácidos graxos são exemplificadas nas figuras dispostas a seguir. Os dados são apresentados como percentagem de ácidos graxos identificados (g/100g de lipídeos).

Os ácidos graxos saturados presentes em maiores proporções no sêmen dos galos, são o ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0). Resultados estes esperados, visto que, são os ácidos graxos predominantes em tecidos, fluidos e produtos de origem animal.

Nos últimos dois períodos experimentais, que compreenderam da 65^a-72^a semana de idade dos machos, houve diferenças estatísticas nas proporções totais de ácidos graxos saturados e poli-insaturados do sêmen, como pode ser observado nas figuras 3 e 4.

Figura 3 e 4. Perfil lipídico do sêmen dos machos suplementados ou não com vitamina E no período IV e V.



No grupo controle negativo as proporções de ácidos graxos saturados foram maiores que no grupo suplementado e, a percentagem de ácidos graxos poli-insaturados concomitantemente reduziu. No entanto, a proporção de ácidos graxos saturados no grupo suplementado com a vitamina E foi menor. Desta forma, as quantidades proporcionais de ácidos graxos poli-insaturados do total dos ácidos graxos foram maiores.

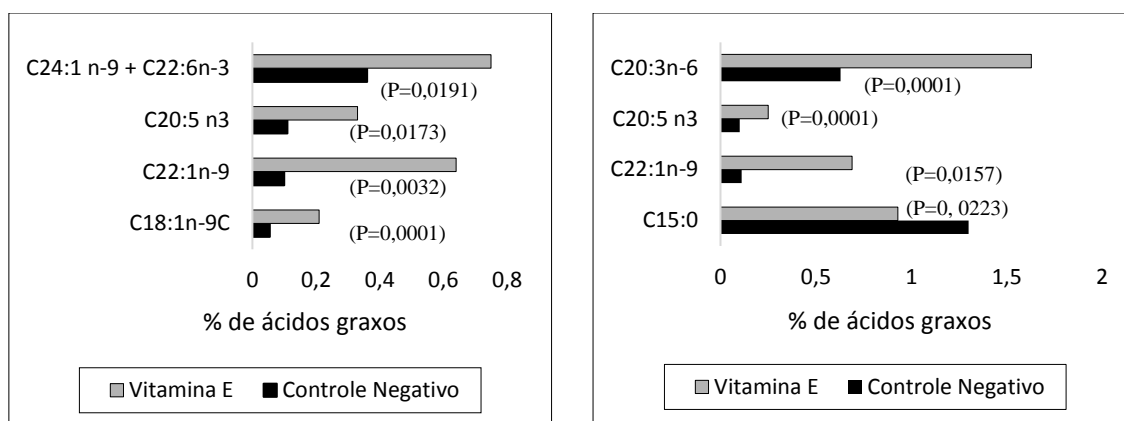
A peroxidação lipídica é um processo em que as EROs desestruturam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, desintegrando-as. Os compostos tóxicos gerados pela peroxidação, ativam a fosfolipase, que desintegra os fosfolipídeos, liberando os ácidos graxos não saturados, resultando na oxidação dos ácidos graxos insaturados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A redução da peroxidação lipídica associada a vitamina E, pode ser responsável por esse maior percentual de ácidos graxos poli-insaturados, que constituem os lipídios do sêmen dos machos suplementados.

Segundo Kelso et al., (1996) quando há baixas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados nos fosfolipídeos do sêmen, há uma redução na capacidade de

fertilização do espermatozoide. Uma elevada percentagem de ácidos graxos poli-insaturados, é exigida pela membrana dos espermatozoides, para construir um microambiente que permite fluidez para conduzir o processo de fertilização. Por conterem altas proporções de ácidos graxos poli-insaturados, os espermatozoides aviários constituem um meio ideal para a vitamina E atuar e ser incorporada na membrana, onde atua fortemente como antioxidante (SURAI et al., 2001).

Uma diferença substancial significativa foi encontrada no conteúdo dos principais ácidos graxos peroxidáveis, ou seja, aqueles que possuem insaturações em todos os períodos analisados, os quais são demonstrados nas figuras a seguir.

Figura 5. Ácidos graxos do sêmen dos machos suplementados ou não com vitamina E no período I.



Esse aumento dos ácidos insaturados com a suplementação da vitamina E, pode ser considerado um reflexo da diminuição da peroxidação lipídica do sêmen pela vitamina E. Nota-se que os efeitos significativos foram observados nos ácidos de cadeia longa, que possuem insaturações em suas cadeias.

Os principais ácidos graxos que foram preservados da peroxidação pela vitamina E, são os ácidos graxos de 20 e 22 carbonos em sua cadeia estrutural.

Figura 7. Ácidos graxos do sêmen dos machos suplementados ou não com vitamina E no período III.

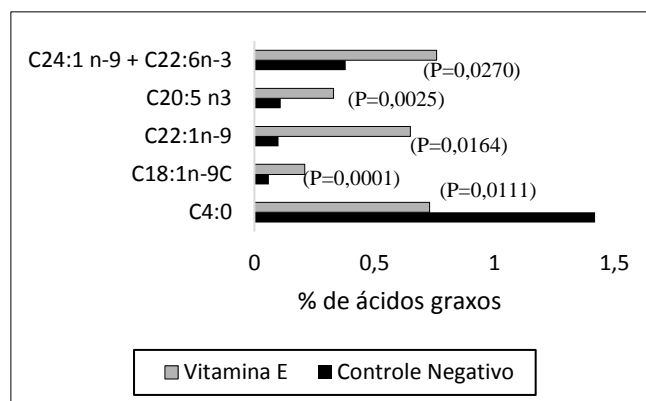
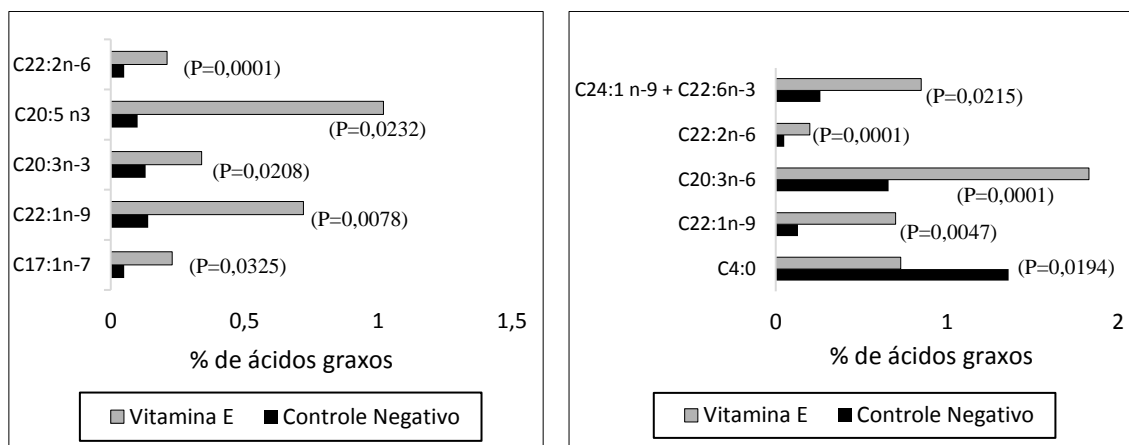


Figura 8 e 9. Perfil lipídico do sêmen dos machos suplementados ou não com vitamina E no período IV e V.



Nos espermatozoides de mamíferos já foram comprovados que mais de 50% da fração fosfolípídica é composta por ácidos graxos poli-insaturados de cadeias carbônicas C_{20-22} , e que o nível está correlacionado com a maturação espermática (OLLERO et al., 2000).

Neste estudo os ácidos de cadeias C_{20-22} estiveram em maiores quantidades no tratamento com vitamina E. Surai et al., (2001) relacionaram o aumento nas proporções de ácidos graxos poli-insaturados C_{20-22} , a suplementação com vitamina E das aves, e que essa adição alterou o metabolismo dos ácidos graxos.

No entanto as interações entre a vitamina E e os ácidos graxos não são bem relacionadas e precisam de maiores investigações.

CONCLUSÃO

Machos alimentados com dietas suplementadas com vitamina E consumiram mais alimento, sem alterar o peso corporal.

A suplementação de vitamina E melhorou a motilidade e vigor espermático do sêmen. A concentração espermática do sêmen de galos suplementados com vitamina E foi superior da 65^a a 72^a semana. Os parâmetros de pH do sêmen e defeitos morfológicos dos espermatozoides não foram influenciados pela adição da vitamina E

A vitamina E reduziu a peroxidação lipídica e alterou a composição de ácidos graxos do sêmen, com o aumento dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa, considerados importantes para diversas funções espermáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHLAGHI, A. et al., 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**. v.93 p.1236-1243, 2014.

Bjorneboe, A.; Bjorneboe, G.E.; Drevon, C.A. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J. Nutr.* **1990**, *120*, 233–242.

BISWAS, A. MOHAN. J. SASTRY, K. V. H. Effect of higher dietary vitamin E concentrations on physical and biochemical characteristics of semen in Kadaknath cockerels. **Poultry Science**. v.50, p.733-738, 2009.

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. et al., Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological Trace Element Research*, Clifton, v.47, n.1-3, p. 69-74, 1995.

BLESBOIS, E., LESSIRE, M. GRASSEAU, I. HALLOUIS, J. M.; HERMIER. Effect of dietary fat on fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biology of reproduction**. n.56. p.1216-1220,1997.

BOGDONOFF, P. D.; SHAFFNER, C. S. The effect of pH on the in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. **Poultry Science**, v.33, p.665-669, 1954.

BONGALHARDO, D. C. Produção e preservação do sêmen de galos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.37, n.2 p.131-135, abr/jun. 2013.

BOTSOGLOU, N. A.; FLOROU, P. P.; BOTSOGLOU, E.; DATOS, V.; GIANNENAS, I.; KOIDIS, A.; MITRAKOS, P. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and

alpha-tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. **South African Journal Animal Science**. v.35 p.143-151, 2005.

BURKE, W. H. **Reprodução das aves**. In. DUKES, H. H. Dukes: fisiologia dos animais domésticos. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. v.38, p.660-680, 1996.

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

CEROLINI, S.; KELSO, K. A.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K.; PIZZI, F.; CAVALCHINI, L. G.; Relationship between spermatozoa lipid composition and fertility during aging of chickens. **Biology of Reproduction**. v. 57, p.976-980, 1997.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A. SURAI, P. F.; NOBLE, R. C. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**. v.58, p-99-111, 2000.

CHRISTIE, W.W. Isolation of lipids from tissues. In *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. **Pergamon Press, Oxford**, p.17–25. n.2 1982.

COMBS, G. F. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. New York: Academic Press, 1992. 526 p.

DANIKOWSKIL, S.; SALLMANN, H. P.; HALLE, I.; FLACHOWSKY, G. Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.86, p. 376–382, 2002.

DONOGHUE, A. M.; DONOGHUE, D. J. Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during lipid storage. **Poultry Science**. v.76, p.1440-1445, 1997.

EID, Y. EBEID, T. YOUNIS, H. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken in semen. **Poultry Science**, v.47, p.350-356, 2006.

ETCHES, R. J. Reproduction Avian: Characterization of chicken Sertoli cells in vitro. **Poultry Science**. v. 61, p.531-539, 1982.

FORCE, A.; GRIZARD, G.; GIRAUD, M.; MOTTA, C.; SION, B.; BOUCHER, D.;2001. Membrane fluidity and lipid content of human spermatozoa selected by swim-up method. **International Journal Andrology**. v.24, p. 327-334, 2001.

GULAYA, N.; MARGITICH, V.; GOVSEEVA, N.; KLIMASHEVSKY, V.; GORPYNCHENKO, I.; BOYKO, M.; Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of Andrology**. v. 46, p.169–175, 2001.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, v.90, p.420-426, 1978.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 5ª edição, 1989.

HOBBS, T.D.; HARRIS, G.C.; Effect of freezing point depression and pH on motility and fertility of chicken spermatozoa stored in sodium citrate extenders. **Poultry Science**, v. 42, p.254-259, 1963.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**. v.2, p. 246–256, 1996.

KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H. C.; SPEAKE, B. K. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. **Journal Reproduction fertility**. V.106, p.201-206. 1996.

KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H. C.; SPEAKE, B. K. The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acid composition of avian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*. V.118b, p.65-69. 1997.

MACIEL, M.P. Características reprodutivas de galos leves e semi-pesados submetidos a diferentes fotoperíodos. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MENDEZ, M. F. B. Qualidade do sêmen suíno resfriado adicionado de vitamina E e IGF-1. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) – Universidade Federal de Lavras – Lavras, 2011.

MURAKAMI, A. E.; SANTOS, T. C.; FERNANDES, J.I.M.; MARTINEZ, A.C.; BORTOLUZZI, C. 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 Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.37, n.3, p.285-294, jul./set. 2013. Disponível em: www.cbra.org.br

SAHIN, K.; KÜÇÜK, O.; SAHIN, N. SARI, M. Effects of vitamin C and vitamin E on lipid peroxidation, status, serum hormones, metabolite and mineral concentrations of japanese quails reared under heat stress (34°C). **International Journal of Vitamin Nutrition Research, Bern**. v. 72, p. 91-100, 2002.

OHKAWA, H.; OHISHI.; YAGI, Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. V.95 p.351-358, 1979.

OLLERO, A.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J.G Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction development**. V.55, p.326-334, 2000.

RENGARAJ, D.; HO HONG, Y. Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16, p.9910-9921, 2015.

RODRIGUES, A.C.N.; ROCHA, J.V.; BELETTI, M. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.6, p.1302-1307, 2009.

ROSTAGNO, H.S. et al., **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 252p, 2011.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M.; A XAVIER, E.G.; ROLL, V. F.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.31, n.3, p.307-317, jul/set. 2007.

SCHRAMM, G. P.; PINGEL, H., 1991: Kunstliche Besamung beim Geflügel. In: BUSCH, W.; LOHLE, K.; PETER, W. Kunstliche Besamung bei Nutztieren, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, p. 601–632.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. inseminação artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D. FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p.69-95, 2002.

SURAI, P.; FUJIHARA, N.; SPEAKE, B.; BRILLARD, J., WISHART, G.; SPARKS, N.; Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. **Journal Animal Science**. V.14, p. 1024–1050, 2001.

SURAI, P.; CEROLINI, F.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N. H. C.; CLOUGHLEY, J. Spermatozoa lipids: Protection from peroxidation by α -tocopherol. Prostagland. Leukotrien. Essential Fatty Acid. v.57, p.2-263. 1997.

SURAI, P. F.; FUGIHARA, N. SPEAKE, B. K.; BRILLARD, J. P.; WISHART, G.J.; SPARKS, N.H.C. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**. v.14, n.7 p.1024-1050. 2001.

THEROND, P.; AUGER, J.; LEGRAND, A.; JOUANNET, P.; Alpha tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationship with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 10, p,739-744, 1996.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G.A. KAMEL, K. L. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v.76, n.1-2, p. 99-111, 2003.

5 CAPÍTULO III

EFEITO DA ADIÇÃO DE SELÊNIO SOBRE AS VARIÁVEIS REPRODUTIVAS, ESTADO OXIDATIVO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO SÊMEN DE GALOS *WHITE PLYMOUTH ROCK*

RESUMO

Esta pesquisa foi realizada para investigar os efeitos da suplementação dietética de selênio sobre as características reprodutivas de galos *White Plymouth Rock*, da 53^a – 72^a semana de idade. Um total de 32 machos foram selecionados e distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições. Os tratamentos foram: dieta basal (0,15 mg/kg de ração de selênio) e suplementado (0,40 mg/kg de ração de selênio). As dietas foram isonutritivas, sendo permitido acesso, *ad libitum*, água e ração. O período experimental foi dividido em cinco períodos: período I - 53^a-56^a semana; Período II - 57^a-60^a semana; Período III - 61^a-64^a semana; Período IV - 65^a-68^a semana e período V - 69^a-72^a semana de idade. Os dados foram submetidos à análise de variância através do programa SAS (2011), considerando-se estatisticamente diferente ao nível de 5% de probabilidade. O peso corporal foi determinado no início do experimento, ao final de cada período, juntamente com o consumo de ração. A coleta de sêmen foi realizada duas vezes por período, pelo método de massagem dorso-abdominal, em tubos graduados e, o volume foi determinado. Em microscópio óptico, com aumento de 400X, a motilidade e o vigor espermático foram avaliados. Após a leitura do pH, 5 µL de sêmen foram armazenados em 5 mL de formol:citrato, para determinar a concentração espermática e os defeitos morfológicos. Foram também analisadas, as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o perfil de ácidos graxos no sêmen, mensurados ao final dos períodos. O consumo de ração aumentou com a adição de selênio ($P=0,0207$), porém, não influenciou o peso corporal ($P=0,8890$). O volume seminal, a concentração espermática, defeitos morfológicos e o pH não foram influenciados pela adição de selênio na dieta ($P>0,05$). A motilidade e o vigor espermático foram significativamente aumentados com a inclusão de selênio, nos períodos II, III e IV, respectivamente, compreendendo o intervalo entre a 57^a e 68^a semana de idade ($P < 0,05$). O TBARS do sêmen de machos suplementado com selênio foi significativamente menor, no período experimental total ($P = 0,0331$). O perfil lipídico do sêmen foi influenciado pela adição do selênio ($P < 0,05$). Observou-se o efeito antioxidante do selênio, atenuando os efeitos da peroxidação lipídica sobre a célula espermática, levando a uma considerável alteração nos ácidos graxos de cadeia longa que possuem insaturações, os quais estão diretamente relacionados com as funções espermáticas. Houve um aumento na motilidade e vigor dos espermatozoides, o que poderia resultar em maior probabilidade de fertilização, melhorando os índices de fertilidade dos lotes.

Palavras-chaves: ácido tiobarbitúrico, espermatozoides, lipídios, viabilidade

SELENIUM IN DIETS OF ROOSTERS WHITE PLYMOUTH ROCK AND THEIR EFFECTS ON QUALITY, LIPID PEROXIDATION AND FATTY ACIDS OF SEMEN

ABSTRACT

This research was carried out to investigate the effects of dietary selenium supplementation on the reproductive characteristics of roosters White Plymouth Rock, from 53rd to 72nd week of age. A total of 32 males were selected and distributed in a completely randomized design, with 16 replicates. The treatments were: basal diet (0.15 mg/kg of feed of selenium) and supplemented (0.40 mg/kg of feed of selenium). The diets were isonutritivas, being allowed access, *ad libitum*, water and feed. The experimental period was divided into five periods: period I - 53rd-56th week; period II - 57th-60th week; period III - 61st-64th week; period IV - 65th-68th week and period V - 69th-72th week of age. The data were submitted to analysis of variance through the SAS program (2011), considering statistically different than 5% of probability. Semen collection was performed twice per period, by the dorso-abdominal massage method, in graduated tubes and, the volume was determined. In an optical microscope, at 400X magnification, the motility and vigor spermatic were evaluated. After reading the pH, 5 μ L of semen were stored in 5 mL of formal:citrate to determine spermatic concentration and morphological defects. Also analyzed were the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and the fatty acid profile in the semen, measured at the end of the periods. The feed intake increased with the addition of selenium ($P=0.0207$), but did not influence body weight ($P=0.8890$). The seminal volume, spermatic concentration, morphological defects and pH were not influenced by the addition of selenium in the diet ($P>0.05$). The motility and spermatic vigor were significantly increased with the inclusion of selenium in periods II, III and IV, respectively, comprising the interval between the 57th and 68th week of age ($P<0.05$). The TBARS of roosters semen supplemented with selenium was significantly lower in the total experimental period ($P=0.0331$). The lipid profile of the semen was influenced by the addition of selenium ($P<0.05$). It was observed the antioxidant effect of selenium, attenuating the effects of lipid peroxidation on the sperm cell, leading to a considerable change in the long chain fatty acids that have unsaturations, which are directly related with spermatic functions. There was an increase in sperm motility and vigor, which could result in a higher probability of fertilization, improving lots fertility rates.

Key words: spermatozoa. thiobarbituric acid. breeding. viability. mineral.

INTRODUÇÃO

O selênio é um elemento essencial na nutrição de aves e quando deficiente na dieta, causa decréscimo no desempenho produtivo e reprodutivo. Este mineral possui várias funções como proteção antioxidante, regulação da expressão gênica, metabolismo da tireoide e manutenção da integridade da estrutura dos espermatozoides (AHANGARI et al., 2013)

O selênio demonstrou-se entre todos os minerais indicados como essenciais, ser um dos mais importantes na reprodução. É necessário para manter a integridade da membrana espermática e suas propriedades fisiológicas, fundamentais para o sucesso da fertilização e motilidade dos espermatozoides, pois é componente da enzima glutathione peroxidase (SURAI, 2002).

Além da presença da glutathione peroxidase com função antioxidante no sistema reprodutivo, também está presente a glutathione peroxidase hidropéroxido fosfolípida (PH-GSH-Px). Além da ação antioxidante possui função estrutural, fazendo parte na membrana celular e das mitocôndrias na peça intermediária dos espermatozoides (SURAI, 2006). Atua principalmente protegendo a mitocôndria, organela que está localizada na peça intermediária e é responsável pela motilidade, pela flexibilidade e fluidez da membrana. Para que realize estas propriedades, a mitocôndria necessita altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, que tornam a célula mais vulnerável à oxidação e à produção de radicais livres (SURAI, 2002).

A peroxidação lipídica está associada a uma diminuição significativa da concentração de ácidos graxos poli-insaturados nos espermatozoides (SURAI e FISININ, 2013). Os ácidos graxos poli-insaturados cumprem uma função importante no espermatozoide, quando estão em baixas quantidades no espermatozoide comprometem a fertilidade (KELSO et al., 1996).

O estresse oxidativo relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio também tem sido associado à proliferação, diferenciação e apoptose celular (DRAGIN et al., 2006). A inclusão de selênio nas dietas dos galos melhora a concentração de espermatozoides, o aumento da motilidade e reduz a porcentagem de espermatozoides mortos (EBEID, 2009), desta forma aumenta a capacidade de fertilização.

Na deficiência de selênio, há menor síntese de PH-GSH-Px, comprometendo a gametogênese. Como consequência, os espermatozoides apresentam diversos problemas morfológicos como cabeça e caudas isoladas, deformações na cabeça e peça

intermediária, inclusive com ruptura estrutural, diminuição do número de espermatozoides por ejaculado e aumento na morte de espermatozoides (ALVIM e SOUZA, 2005).

Evidências indicam que o selênio é necessário para a manutenção do equilíbrio crítico entre a morte de células germinativas e a proliferação durante a apoptose na espermatogênese (SUNDARAM et al., 2000). O objetivo do presente estudo foi avaliar a inclusão de selênio em dietas de machos *White Plymouth Rock* e seus efeitos sobre as características, susceptibilidade a peroxidação e alterações no perfil de ácidos graxos do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Avicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil.

Animais

Foram selecionados 32 machos reprodutores da raça *White Plymouth Rock*, alojados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas individuais (0,33 x 0,60 x 0,60m). Foram submetidos há um programa de iluminação de 17 horas/luz/dia. As aves foram mantidas em um período pré-experimental das 50^a às 52^a semanas de idade, para adaptação a coleta e resposta ao estímulo a massagem dorso-abdominal para ejaculação. O período experimental compreendeu da 53^a semana até a 72^a semana de idade das aves.

Os tratamentos consistiram em machos suplementados com a dieta controle basal (0,15mg/kg/dieta de selenito de sódio) e machos que receberam dieta basal suplementada com selênio (0,15mg/kg/dieta de selenito de sódio + 0,25 mg/kg/dieta de carboquelato de selênio). Os níveis nutricionais utilizados na dieta basal estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Composição centesimal da dieta e perfil nutricional

INGREDIENTES %	
Milho	59,56
Farelo de Soja	15,52
Farelo de Trigo	10,00
Fosfato Bicálcio	1,86
Calcário Calcítico	0,86
DL- metionina	0,07
Sal	0,40
Premix- Mineral ¹	0,05
Premix Vitaminico ²	0,10
Inerte	11,58
Composição Calculada	
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	2600
Proteína Bruta %	14,00
Cálcio %	0,90
Fósforo disponível %	0,45

¹ Níveis mínimos de garantia do premix mineral (kg/produto): Cobre 20g, Ferro 100g, Mangânes 160g, Cobalto 2000mg, Iodo 2000mg e Zinco 100g. ² Níveis mínimos de garantia do premix vitamínico (kg/produto): Vit A 9000000UI, Vit D3 2500000UI, Vit E 20000UI, Vit K3 2500mg, Vit B1 1500mg, Vit B2 600mg, Vit B6 3000mg, Vit B12 12000mg, Ácido Pantotênico 12g, Niacina 25g, Ácido Fólico 800mg, Biotina 60g e Selênio (Selenito de sódio 250mg).

Os níveis nutricionais foram baseados nas recomendações de Rostagno et al., (2011). O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum*. Os machos foram pesados individualmente no início do experimento e a cada período de 28 dias, bem como a ração ofertada e as sobras para determinar o consumo de ração.

Coleta de sêmen

O sêmen foi coletado quinzenalmente pelo método de massagem dorso-abdominal proposto por Forgiarini (2015). Foram utilizados tubos *falcon* graduados mantidos em banho maria em temperatura de 40° C. Logo após a coleta foi verificado o volume do ejaculado e avaliado os parâmetros de motilidade, vigor e pH. Após 5µl de sêmen foi armazenado em 5 ml de uma solução formol:citrato para posteriormente ser realizado as análises de concentração e morfologia espermática.

Motilidade e vigor espermático

Para a mensuração da motilidade, foi avaliado o movimento progressivo retilíneo e uniforme dos espermatozoides. Colocou-se 5µl de sêmen em uma lamina pré-aquecida e recoberta por uma lamínula. As células espermáticas foram observadas em microscopia de luz, com aumento de 200x. O resultado final foi expresso em porcentagem de células que apresentavam movimento retilíneo e progressivo.

O vigor espermático, demonstra a qualidade do movimento dos espermatozoides móveis conforme a metodologia proposta por Silva et al., (2002). O resultado apresentado em escores onde: 0 - Células espermáticas imóveis; 1- células espermáticas com movimentação lenta, latero-lateral, sem progressão; 2 - células espermáticas com rápida movimentação latero-lateral, sem progressão retilínea; 3 - células espermáticas com rápidos movimentos latero-laterais, com alguma progressão retilínea; 4 - células espermáticas com movimentação lenta e com continua progressão retilínea e 5- células espermáticas com movimentação rápida e continua progressão retilínea.

Concentração espermática

Para a análise de concentração foi adicionado 5µl de sêmen em 5ml de solução de formol:citrato. Para a determinação da concentração espermática o sêmen foi diluído em uma proporção de 1:1000 para posteriormente ser realizado a contagem de células espermáticas em hemocitometro (*Câmara de Neubauer*), com resultado expresso em número de células por mm³ de sêmen. O resultado foi transformado para número de células por ml de sêmen.

Morfologia espermática

Para avaliação das anormalidades espermáticas, foram adicionados 5µl de sêmen em solução de formol:citrato. Uma gota desta mistura foi colocada sobre uma lâmina e sobreposta com lamínula deslizante, em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase (ampliação de 1000X, imersão em óleo). As células foram categorizadas em normais e as alterações descritas individualmente e agrupadas em anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, apresentado em percentagem.

Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados através de *pools* de sêmen formados pelos mesmos quatro machos, determinados às 56, 60, 64, 68 e 72 semanas de idade, uma vez a cada período.

Os lipídeos totais foram extraídos do sêmen através da solução de hexano: isopropanol (HARA e RADIN, 1978). A fração lipídica foi transesterificada e metilada baseado na metodologia descrita por Christie (1982).

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa em cromatógrafo gasoso capilar (AGILENT 6890 SERIES GC SYSTEM); coluna capilar: (SUPELCO, 60m x 0,25mm, filme 0,25 μm ; Sigma Aldrich). As condições cromatográficas foram: fluxo coluna de 1,00mL/min; as temperaturas do detector e do injetor foram 280°C e 250°C, respectivamente. A rampa de temperatura do forno iniciou com 100°C, permanecendo por 1 minuto, então aumentada até 240°C a uma taxa de 4°C/min, permanecendo por 20min. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e, o volume injetado foi de 1,0 μL . As identificações dos picos foram verificadas por comparação com os tempos de retenção a um padrão mix37 de ácidos graxos ésteres metílicos (Sigma Chemical Co., Poole).

A integração dos picos e a manipulação dos dados subsequentes foram realizadas utilizando um sistema de dados AGILENT. Os ácidos graxos são apresentados como percentual de ácidos graxos identificados.

Avaliação do estresse oxidativo – Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico

Nas semanas 56, 60, 64, 68 e 72 de idade das aves, ou seja, ao final de cada período, um *pool* formado sempre pelo sêmen dos mesmos 4 machos foi coletado para obtenção de material suficiente para a análise da oxidação lipídica. O potencial antioxidante do sêmen foi baseado nas Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), conforme a metodologia descrita por Okawa et al., (1979). Essa metodologia tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA) produzindo um complexo de coloração rósea, quantificado por espectrofotometria através de um comprimento de onda de 532 nanômetros comparados a amostra padrão de MDA. A concentração de TBARS é determinada utilizando o valor de $1,56 \times 10^5 \times \text{M}^{-1} \text{ml}^{-1}$ como coeficiente de extinção

molar do MDA, sendo a resistência do sêmen a oxidação lipídica expressa em nanogramas de TBARS/ml de sêmen.

Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada logo após a coleta e estimado com papel indicador universal em escala 1-14.

Delineamento experimental e análise estatística

Os dados experimentais foram agrupados em períodos, totalizando cinco períodos de 28 dias cada: período I – 53^a a 56^a semanas de idade, período II – 57^a a 60^a semanas de idade, período III – 61^a a 64^a semanas de idade, período IV – 65^a a 68^a semanas de idade e período V – 69^a a 72^a semanas de idade.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com dois tratamentos e 16 repetições cada, onde cada macho foi considerado uma repetição. Para as mensurações de TBARS e perfil de ácidos graxos foram formados *pools* de sêmen. O sêmen de quatro machos foi reunido para obter material suficiente para as análises, totalizando quatro repetições de quatro machos cada por tratamento. Os resultados foram avaliados utilizando ANOVA, usando o pacote estatístico SAS software (2011; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Todos os valores foram expressos como sendo médias \pm erro padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas a 5% de significância. O modelo utilizado no presente estudo foi o seguinte: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$. Sendo: Y_{ij} - representando as variáveis dependentes observadas; μ - média da população; T_i - efeito do tratamento e e_{ij} - erro residual aleatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 demonstra o consumo alimentar (g/ave). A suplementação com selênio aumentou o consumo ($P < 0,05$) em todos os períodos analisados. Apesar do maior consumo, influenciado pela adição de selênio, o peso corporal foi similar entre os tratamentos (2953g controle negativo vs. 2948g suplementado com selênio) ($P > 0,05$).

Junior (2008) observou que o nível de 0,45 mg/kg/ração de selênio na dieta de frangos de corte também houve um aumento de consumo aos 28 e 35 dias, porém os efeitos não persistiram aos 42 dias. Oliveira (2012) ao incluir 0,45 ppm/kg/de ração de selênio em dietas de frangos de corte observaram aumento no consumo de ração independente da fonte ser orgânica ou inorgânica

Tabela 2. Consumo alimentar (g/ave) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com selênio

	Controle Negativo	Selênio	P	CV%
Período I	115,37 ± 2,17	124,12 ± 1,88	0,0026	6,28
Período II	116,56 ± 2,26	123,75 ± 1,96	0,0148	6,54
Período III	112,46 ± 1,95	122,12 ± 1,96	0,0019	6,68
Período IV	108,60 ± 2,45	119,25 ± 2,15	0,0018	7,57
Período V	107,73 ± 1,47	112,12 ± 1,41	0,0392	5,14
Média total	111,52 ± 1,99	120,27 ± 1,99	0,0207	3,84

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

O volume médio seminal não foi influenciado pela adição de selênio (0,68ml vs. 0,75ml) (P>0,05). Ahanngari et al., (2013) ao avaliar diferentes níveis (0,1, 0,2 e 0,3 mg/kg) de selênio na dieta de galos, também não observaram efeitos sobre o volume seminal. No entanto, Jerysz e Lukaszewicz (2013) suplementando gansos comerciais com selênio (0,3 mg/kg/ração) e vitamina E (100 mg/kg/ração), observaram maiores volumes de ejaculado e maiores respostas ejaculatórias.

A motilidade e vigor espermático foi influenciado significativamente pelo selênio das dietas. Observa-se que galos suplementados com selênio resultaram em maior motilidade e vigor a partir do período II (P<0,05) (Tabela 3, 4). Não há relatos de que o selênio influencia no vigor dos espermatozoides. Porém este parâmetro, está intimamente relacionado com a motilidade espermática. A motilidade pode ser reduzida tanto em baixas quantidades de selênio quanto em altas concentrações, consideradas tóxicas.

Ahangari et al., (2013) usando selênio na forma orgânica ao nível de 0,3 mg/kg, também obtiveram maior motilidade espermática. O selênio faz parte da enzima glutathiona peroxidase que atua como antioxidante no sistema reprodutivo, também está presente na PH-GSH-Px, que além da ação antioxidante, possui função estrutural fazendo parte da membrana celular e das mitocôndrias da peça intermediária dos espermatozoides (SURAI, 2006).

Desta forma, a inclusão do selênio na dieta atuou protegendo a mitocôndria, a qual é responsável pela motilidade, flexibilidade e fluidez da membrana espermática. Para realizar essas funções, a mitocôndria também necessita de energia fornecida pelos lipídeos constituintes das membranas, onde o selênio atua diminuindo peroxidação lipídica.

Tabela 3. Motilidade espermática (%) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com selênio

	Controle Negativo	Selênio	P	CV%
Período I	89,53 ± 0,60	90,50 ± 0,62	0,2716	2,67
Período II	89,06 ± 0,37	91,83 ± 0,39	0,0001	1,67
Período III	86,87 ± 1,10	91,66 ± 1,13	0,0052	4,94
Período IV	88,16 ± 0,52	91,66 ± 0,52	0,0001	2,24
Período V	82,33 ± 2,44	86,00 ± 2,44	0,0697	10,03
Média total	87,19 ± 1,02	90,82 ± 1,02	0,0362	3,10

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Tabela 4. Vigor espermático do sêmen (1-5 scores) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com selênio

	Controle Negativo	Selênio	P	CV%
Período I	3,87 ± 0,11	4,13 ± 0,12	0,1393	3,65
Período II	3,75 ± 0,10	4,40 ± 0,11	0,0003	3,51
Período III	3,59 ± 0,11	4,56 ± 0,11	0,0001	3,57
Período IV	3,16 ± 0,09	4,46 ± 0,09	0,0001	3,29
Período V	3,10 ± 0,18	3,60 ± 0,18	0,0647	4,77
Média total	3,49 ± 0,16	4,23 ± 0,16	0,0136	3,33

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

O pH do sêmen não sofreu interferências pelos tratamentos, em todos os períodos a inclusão de selênio na dieta não alterou esse parâmetro (6,10 vs. 6,18) (P>0,05). Não há evidências que o selênio altere pH seminal. Ahangari et al., (2013) ao incluir níveis (0,1, 0,2 e 0,3 mg/kg) de selênio na dieta de galos também não observaram efeitos sobre o pH do sêmen. Um aumento de pH pode causar alterações morfológicas e morte de espermatozoides (SCHAMM e PINGEL, 1991). Não encontrando diferença estatística para o pH, as alterações morfológicas no período II (Tabela 5) pode ser atribuída a dieta.

A inclusão de selênio diminuiu a porcentagem de defeitos totais no período II (P=0,0159). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para os defeitos morfológicos dos espermatozoides de cabeça (4,86% vs. 4,36%), defeitos de

peça intermediária (0,84% vs. 0,82%) e defeitos de cauda (1,34% vs. 1,14%). Neste estudo as alterações individuais não foram influenciadas pela suplementação com selênio, porém, os defeitos morfológicos totais foram menores.

O selênio faz parte das selenoproteínas, as quais participam da manutenção da integridade da estrutura do espermatozóide. A selenoproteína da cápsula mitocondrial da célula espermática é uma forma de glutathione peroxidase, a qual é conhecida por desempenhar um papel importante na estrutura da célula, como uma proteína estrutural (DIMITROV et al., 2007). As selenoproteínas são estrutura fixa da peça intermediária, presente na membrana, mitocôndrias e também é encontrada na cabeça.

Quando há deficiência de selênio, ocorre uma redução nas sínteses destas enzimas comprometendo a gametogênese do macho. Consequentemente, os espermatozoides apresentam maiores defeitos morfológicos. O selênio faz parte das principais enzimas que compõem o sistema antioxidante que protege os espermatozoides de danos e disfunções celulares. Desta forma, a diminuição de defeitos morfológicos pode ser atribuída a maior atividade destas enzimas.

Ebeid (2009) usou selênio orgânico e verificou uma diminuição no número de espermatozoides com defeitos de cabeça. Sob condições de estresse térmico, uma combinação de vitamina E (200mg/kg) e selênio (0,3 mg/kg) na dieta de galos reduziu a porcentagem de espermatozoides mortos (EBEID, 2012). Edens (2002), adicionou 0,2 mg de selênio orgânico por kg de ração na dieta de galos e percebeu que as porcentagens de espermatozoides normais foram aumentadas.

Tabela 5. Defeitos morfológicos totais (%) de espermatozoides de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com selênio

	Controle Negativo	Selênio	P	CV%
Período I	4,05 ± 0,74	3,84 ± 0,74	0,8416	8,77
Período II	7,39 ± 0,89	4,15 ± 0,89	0,0159	7,98
Período III	7,30 ± 0,99	5,82 ± 0,99	0,3032	7,89
Período IV	8,71 ± 1,59	9,74 ± 1,59	0,6506	8,39
Período V	6,70 ± 0,80	6,01 ± 0,80	0,5483	7,21
Média total	7,56 ± 0,81	5,90 ± 0,81	0,1902	5,36

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

A inclusão de selênio na dieta de machos não aumentou a concentração espermática no sêmen (2,91 x 10⁹ml vs. 2,83 x 10⁹ml) (P>0,05).

Este estudo corrobora com os resultados encontrados por Ahangari et al., (2013). Esses autores observaram que a suplementação com 0,3 mg/kg de ração de selênio não influenciou a concentração de espermatozoides, em seu estudo com galos. Por outro lado, Slowinska et al., (2011) avaliando a suplementação de selênio ao nível de 0,3mg/kg de dieta em gansos, observou um aumento na concentração espermática do sêmen. Lukaszewicz (2013) suplementando gansos comerciais com selênio (0,3mg/kg/ração) e vitamina E (100mg/kg/ração), também observaram maiores concentrações espermáticas.

A oxidação lipídica do sêmen reduziu na dieta com selênio no período experimental total ($P < 0,0331$) (Tabela 6). Essa diminuição pode ser associada a maior atividade das enzimas (glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase), onde são dependentes de selênio e atuam reduzindo a peroxidação lipídica.

Surai et al., (1998) ao avaliar a inclusão de selênio na dieta de machos, verificam que houve um aumento significativo da atividade da enzima GSH-Px, nos testículos, nos espermatozoides e no plasma seminal. Como consequência deste resultado, observou-se uma diminuição à susceptibilidade dos espermatozoides e dos tecidos à peroxidação lipídica, apresentando menores teores de TBARS.

Ebeid (2009) avaliou os efeitos da inclusão de níveis crescentes de selênio orgânico (0-controle, 0,1ppm, 0,2ppm e 0,3ppm de selênio levedura) no *status* antioxidante de galos sob condições de estresse térmico. Os animais que receberam dietas suplementadas com 0,3 ppm de selênio apresentaram diminuição nos níveis plasmáticos de TBARS mostrando que a suplementação com Selênio Levedura melhorou o *status* antioxidante dos animais.

Tabela 6. Oxidação lipídica (TBARS nanogramas/ml de sêmen) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com Selênio

	Controle Negativo	Selênio	P	CV%
Período I	19,99 ± 1,9	12,72 ± 1,9	0,0504	5,22
Período II	22,80 ± 1,6	18,40 ± 1,6	0,1144	4,23
Período III	21,75 ± 2,1	15,00 ± 2,1	0,0726	5,04
Período IV	22,53 ± 1,4	18,06 ± 1,4	0,0743	3,99
Período V	27,19 ± 1,2	23,77 ± 1,2	0,0933	3,32
Média	22,85 ± 0,79	17,59 ± 0,79	0,0331	7,70

($P < 0,05$) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

A inclusão do selênio na dieta de macho está diretamente relacionada com a função antioxidante, reduzindo a peroxidação dos lipídeos presentes no sêmen. A

peroxidação lipídica está associada a uma diminuição significativa da concentração de ácidos graxos poli-insaturados nos espermatozoides (SURAI e FISININ, 2013). Os ácidos graxos poli-insaturados cumprem uma função importante, quando estão em baixas quantidades no espermatozoide, comprometem a fertilidade.

A adição do selênio modificou o perfil lipídico do sêmen, demonstrados nas figuras a seguir. São apresentados os ácidos graxos, como porcentagem de ácidos graxos identificados, com efeitos significativos pelos tratamentos.

Os ácidos graxos do perfil lipídico do sêmen que apresentaram diferenças estatísticas foram principalmente, os ácidos graxos insaturados de cadeias de 20 e 22 carbonos. As cadeias acilas diferem muito na sua propensão química ao dano oxidativo. Os ácidos graxos poli-insaturados da série n-3 são mais propensos a oxidar que os da série n-6. Porém, em ambos os casos, tanto ácidos graxos n-6 e n-3 aumentaram com a inclusão do selênio. Mesmo dentro da classe dos ácidos graxos poli-insaturados, há um aumento de quatro vezes na peroxidabilidade entre lipídeos de cadeia curta e longa, o ácido C22:6 n3 é 320 vezes mais susceptível a peroxidação do que C18:1n9 (SURAI et al., 1997). Esse fato pode ser explicado pelo número de ligações duplas na cadeia. Quanto maior o número de insaturações, maiores foram os efeitos do selênio.

Figura 1 e 2. Alterações estatisticamente significativas nos ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com selênio no período I e II

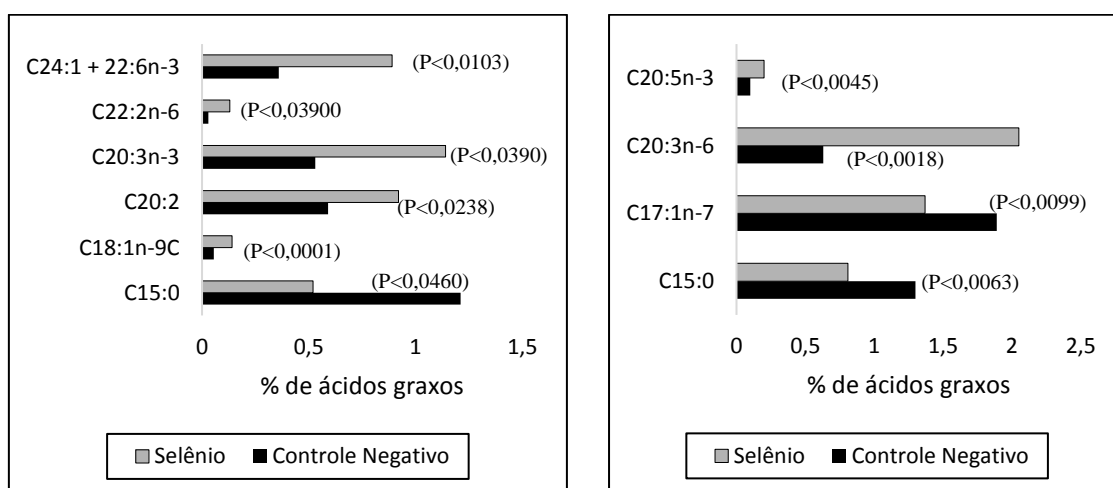
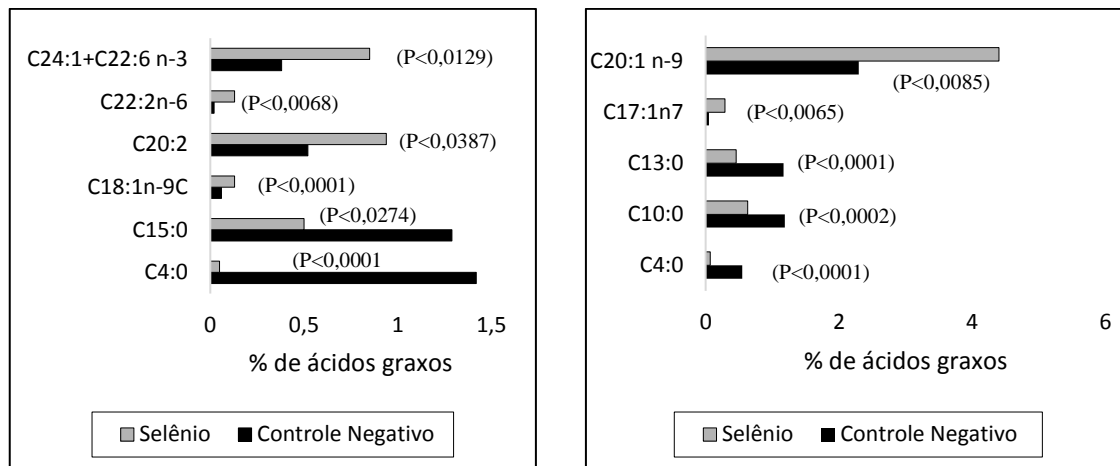
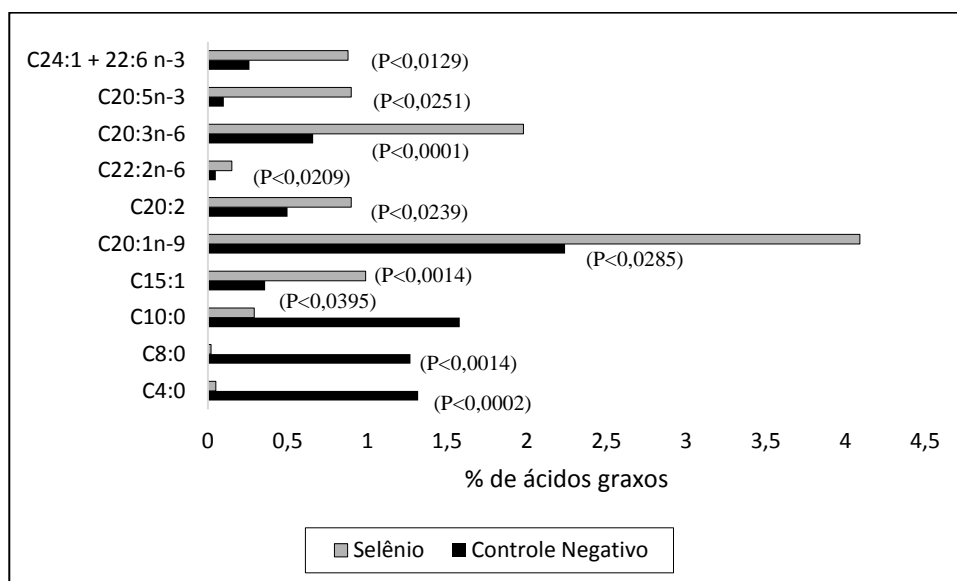


Figura 3 e 4. Alterações estatisticamente significativas nos ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com selênio no período III e IV



O último período experimental apresentou as maiores alterações de ácidos graxos, para a suplementação de selênio. Observa-se que os ácidos saturados apresentam maiores proporções no controle negativo, concomitantemente há uma menor proporção de ácidos insaturados. A adição do selênio aumentou significativamente os ácidos insaturados com mais de 20 carbonos. Quanto maior o número de ligações duplas na cadeia lipídica, maiores foram os efeitos da suplementação com selênio.

Figura 5. Alterações estatisticamente significativas nos ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com selênio no período V



O aumento significativo nos ácidos graxos derivado da adição de selênio, foram percebidos nos ácidos graxos poli-insaturados. Estes, devido às duplas ligações estão propensos a oxidar. O selênio diminuiu a peroxidação lipídica no período experimental ($P < 0,05$), essa diminuição pode ter levado a essas alterações nas proporções de ácidos graxos.

Marmunti et al., (2012) demonstraram que o alto conteúdo de ácidos graxos insaturados de sêmen, está correlacionado com a vulnerabilidade à peroxidação lipídica. Estes autores observaram correlação positiva entre o nível de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa e a alta peroxidabilidade do sêmen.

A confirmação da sugestão de que a diminuição de ácidos graxos poli-insaturados se deve à peroxidação provém dos dados que mostram um aumento simultâneo de TBARS no sêmen (SURAI et al., 1998).

Figura 6 e 7. Classes lipídicas do sêmen de galos suplementado ou não com selênio no período III e IV.

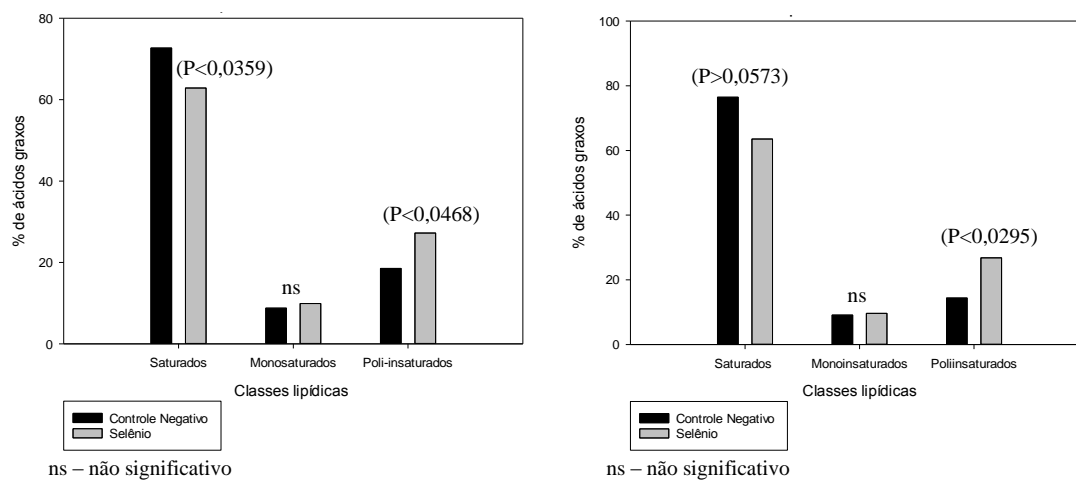
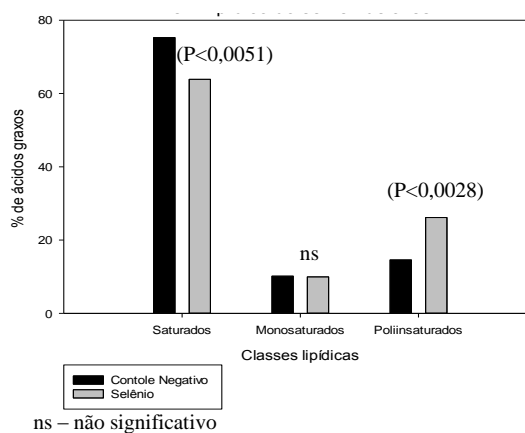


Figura 8. Classes lipídicas do sêmen de galos suplementado ou não com selênio no período V.

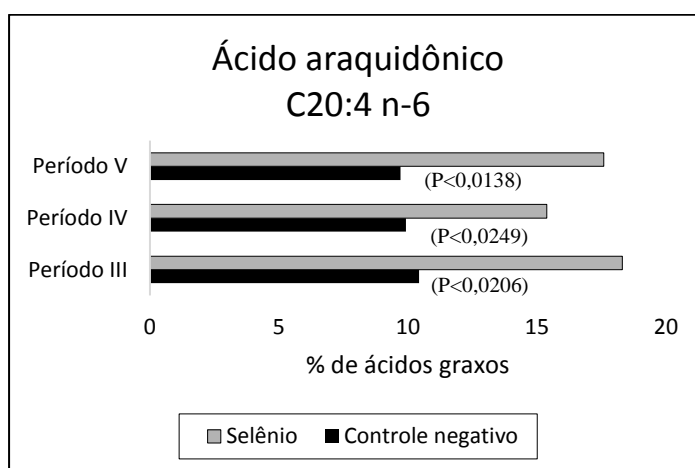


Os ácidos graxos poli-insaturados estão diretamente relacionados com a fertilidade, pois dão energia para a célula espermática realizar suas funções. Desta forma, a peroxidação pode levar a uma diminuição dos ácidos graxos importantes para a célula espermática, comprometendo a fertilidade dos machos avícolas.

O ácido graxo araquidônico apresentou-se estatisticamente maior com a suplementação de selênio nos três últimos períodos (Figura 9). Ainda precisam ser elucidadas as interações entre a peroxidação e as alterações nos ácidos graxos e, os efeitos específicos de cada ácido graxos na manutenção das funções das células espermáticas. Segundo Kelso et al., (1996) os ácidos graxos poli-insaturados cumprem uma função importante no espermatozoide, mas ainda sem especificidade, apresentando baixa fertilidade quando a concentração destes é reduzida.

Conforme Cerolini et al., (2003) o ácido C20:4n-6 apresenta um efeito positivo no volume de sêmen e conseqüentemente, um maior número total de espermatozoides. Neste estudo o ácido graxo araquidônico apresentou-se em maiores proporções nos últimos três períodos, porém, o volume de sêmen não apresentou diferença estatísticas entre os tratamentos. Devido seu alto número de ligações duplas, quatro ligações na cadeia lipídica, esse ácido graxo facilmente pode sofrer peroxidação lipídica.

Figura 9. Alterações estatisticamente significativas no ácido graxo araquidônico do sêmen de galos suplementados ou não com selênio



CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a suplementação dietética de selênio é essencial para a manutenção da qualidade do sêmen. A suplementação não influenciou o volume seminal, porém, melhorou os parâmetros de motilidade e vigor espermático.

Não houve alterações no pH seminal e nem decréscimos de alterações de cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides. A concentração espermática também não foi influenciada pelos tratamentos.

A suplementação com selênio, reduziu a peroxidação lipídica no período experimental total. Houve considerável alteração nos ácidos graxos de cadeia longa que possuem insaturações, os quais estão diretamente correlacionados com as funções espermáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHANGARI, J.; PARIZADIA; ZAMANI. The Impact of Organic Selenium Supplementation on Rooster Semen Quality in Liquid Condition. **Poultry Science Journal**. 1 (1): 23-31, 2013.

BOTSOGLOU, N. A.; FLOROU, P. P.; BOTSOGLOU, E.; DATOS, V.; GIANNENAS, I.; KOIDIS, A.; MITRAKOS, P. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and alphatocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. **South African Journal Animal Science**. v.35 p.143-151, 2005.

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

CHRISTIE, W.W. Isolation of lipids from tissues. In *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. **Pergamon Press, Oxford**, p.17–25. n.2 1982.

CARLSON, B.A.; YOO, M.H.; SANO, Y.; SENGUPTA, A.; KIM, J.Y.; IRONS, R.; GLANDYSHEV, V.N.; HATFIELD, D.L.; PARK, J.M.; Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. **BMC Immunology**. v.10, p.57. 2009.

DIMITROV, S. G., ATANASOV, SURAI, P. F; DENEV, S. A. Effect of organic selenium on turkey semen quality during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.311- 317, 2007.

DRAGIN, N.; SMANANI, M.; ARNAUD-DABERNAT, S.; DUBOST, C.; MORANVILLIER, I.; COSTET, P.; DANIEL, J.Y.; PEUCHANT, E.; Acute oxidative stress is associated with cell proliferation in the mouse liver. **FEBS Letters**. v.580, p. 3845-3852, 2006.

EBEID, T.A. Organic selenium enhances the antioxidative status and quality of cockerel semen under high ambient temperature. **British Poultry Science**. v. 50, p.641–647, 2009.

EDENS, F.W. Practical applications for selenomethionine: broiler breeder reproduction. In: Lyons, TP & Jacques, TA. (Eds). **Nutritional biotechnology in the feed and food industries**. Proceedings of 18th alltech's Annual Symposium. Nottingham University Press. Nottingham, UK. p.29-42. 2002.

FROMAN D.P., KIRBY, J. D.; PROUDMAN, J.A. 2004. **Reprodução em aves**: Macho e fêmea, p.237-257. In: HAFEZ, B. & HAFEZ E.S.E. (Eds), **Reprodução Animal**. 7ª ed. Manole, Barueri.

FORGIARINI, J. **Cantaxantina em dietas com milho ou sorgo sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, v.90, p.420-426, 1978.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1982. 720 p.

HATAMOTO, L. K. Efeitos do estresse e da suplementação oral com vitamina E sobre os parâmetros seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e a atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães. São Paulo, 2004.

JERYSZ, A., LUKASZEWICZ, E. Effect of dietary selenium and vitamin E on ganders' response to semen collection and ejaculate characteristics. **Biological Trace Element Research**, p.196–204, 2013.

JUNIOR, P. F. Efeitos de diferentes níveis de selênio sobre o desempenho e imunidade humoral em frangos de corte. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

LI, S.; SHI, R.; WANG, Q.; CAI, J.; ZHANG, S.; Nanostructure and 1-integrin distribution analysis of pig's spermatogonial stem cell by atomic force microscopy. **Gene** v.495 (2), p.189–193, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI.; YAGI, Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. V.95 p.351-358, 1979.

OLIVEIRA, T. F. B. Efeito de diferentes níveis e fontes de selênio no desempenho e características de carcaça de frangos de corte. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, MG, 2012.

ROSTAGNO, H.S. et al., **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 252p, 2011.

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G.; HOEKSTRA, W.G.; Selenium: biochemical role of selenium as component of glutathione peroxidase. **Science**. v.179, p. 588–590. 1973.

SAS. Statistical Analysis System 9.3. Cary, NC: SAS Institute, 2011.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. **Inseminação artificial em cães**. In: GONÇALVES, P. B. D. FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p.69-95, 2002.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm functions. **Frontiers Bioscience**. 1:e78-e86, 1996.

SLOWINKA, M., JANKOWSKI, J.; DIETRICH, G.J.; KAROL, H., LISZEWSKA, E.; GLOGOWSKI, J.; KOZLOWSKI, K.; SARTOWSKA, K.; CIERESZKO, A. Effect of organic and inorganic forms of selenium in diets on turkey semen quality. **Journal of Poultry Science** v.90, p.181–190. 2011.

SURAI, P. F.; KUTZ, E.; WHISHART, G. H.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B. K. The relationship between the dietary provision of alfa-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Journal Reproduction Fertility**. v.110, p. 47-51, 1997.

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

SURAI, P.F. Effects of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. **British Poultry Science**. v.41 (2), p.235–243, 2000.

SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. **Journal of Poultry Science**. v.38, p.117–145. 2001.

SCHAMM, G. P.; PINGEL, H., KUSTLICHE, B. In: BUSCH, W.; LOHLE, K.; PETER, W. Kunstliche Besamung bei Nutztieren, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, p. 601–632. 1991.

SUNDARAM, N.; PAHWA, A.K.; ARD, M. D.; LIN, N.; PERKINS, E.; BOWLES, JR.; A.P. Selenium causes growth inhibition and apoptosis in human brain tumor cell lines. **Journal Neuro oncology**. v.46, p.125–133. 2000.

WAYNE, C.H.; ZEYNE, A.; Regulation of redox signaling by seleno-proteins. **Biological Trace Element Research**. v.134 (3), p.235–251. 2010.

6 CAPÍTULO IV

ADIÇÃO DE CANTAXANTINA EM DIETAS DE GALOS *WHITE PLYMOUTH ROCK* E SOBRE A QUALIDADE, PEROXIDAÇÃO E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO SÊMEN

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de cantaxantina na qualidade do sêmen de galos *White Plymouth Rock* da 53^a à 72^a semana de idade. Foram selecionados 32 machos, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com 16 repetições. Os tratamentos foram dietas suplementadas com (6 mg/kg de ração de cantaxantina) (Carophil Red 10%) ou sem cantaxantina (controle negativo). As dietas foram isonutritivas, variando somente a adição de CTX, com acesso *ad libitum* a água e ao alimento. O experimento foi dividido em fase pré – experimental, entre as 50^a – 52^a semanas de idade e fase experimental das 53^a - 72^a semanas de idade, a qual foi dividida em 5 períodos de 28 dias cada, para avaliar o desempenho dos machos. Os dados foram submetidos à análise de variância através do programa SAS (2011), considerando estatisticamente diferente a 5% de probabilidade. A coleta de sêmen foi realizada duas vezes por período, pelo método de massagem dorso-abdominal, em tubos graduados e, o volume foi determinado. Em microscópio óptico, com aumento de 400X, a motilidade e o vigor espermático foram avaliados. Após a leitura do pH, 5 µL de sêmen foram armazenados em 5 mL de formol:citrato, para determinar a concentração espermática e os defeitos morfológicos. Foram também analisadas, as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e o perfil de ácidos graxos no sêmen, mensurados ao final dos períodos. O consumo médio de ração não foi influenciado pela adição de cantaxantina na dieta ($P>0,05$). Ao analisarmos o período experimental total, os machos suplementados com cantaxantina apresentaram menor peso corporal ($P<0,0476$). O volume seminal, concentração espermática, defeitos morfológicos totais e TBARS não foram influenciados com a adição da cantaxantina comparado ao controle negativo ($P>0,05$). A motilidade espermática foi maior nos galos suplementados com cantaxantina nos períodos II, III e IV ($P<0,05$), entre a semana 57^a - 68^a. O vigor espermático foi significativamente aumentado com a inclusão da cantaxantina após o segundo período de avaliação, o que corresponde ao intervalo da 57^a-72^a semana de idade ($P<0,05$). O pH seminal foi menor no período V ao adicionar cantaxantina na dieta ($P=0,0234$). Houve alterações significativas no perfil de ácidos graxos entre os tratamentos ($P<0,05$). A cantaxantina melhora os parâmetros de motilidade e vigor espermático, isso pode ser atribuído as alterações sobre os lipídios dos espermatozoides promovidos pela cantaxantina. O aumento da motilidade e do vigor dos espermatozoides permite uma maior probabilidade de fertilização do óvulo.

Palavras chaves: carotenoides, espermatozoides, galos, lipídios, reprodução avícola

ADDITION OF CANTHAXANTHIN IN DIETS OF ROOSTERS WHITE PLYMOUTH ROCK ON THE QUALITY, PEROXIDATION AND LIPID COMPOSITION OF SEMEN

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of canthaxanthin supplementation on the quality of White Plymouth Rock roosters semen from 53rd to 72nd week of age. A total of 32 males were selected, distributed in a completely randomized design with 16 replicates. The treatments were diets supplemented with (6mg/kg of feed of canthaxanthin) (*Carophyll Red* 10%) or without canthaxanthin (negative control). The diets were isonutritivas, varying only the addition of canthaxanthin, with ad libitum access to water and feed. The experiment was divided in the pre - experimental phase, between the 50th - 52th week of age and experimental phase of the 53rd - 72nd week of age, which was divided into 5 periods of 28 days each, to evaluate the performance of males. The data were submitted to analysis of variance through the program SAS (2011), considering statistically different than 5% of probability. Semen collection was performed twice per period, by the dorso-abdominal massage method, in graduated tubes and, the volume was determined. In an optical microscope, at 400X magnification, the motility and vigor spermatic were evaluated. After reading the pH, 5 μ L of semen were stored in 5 mL of formal:citrate to determine spermatic concentration and morphological defects. Also analyzed were the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and the fatty acid profile in the semen, measured at the end of the periods. When analyzing the total experimental period, males supplemented with canthaxanthin presented lower body weight ($P=0.0476$). Seminal volume, spermatic concentration, total morphological defects and TBARS were not influenced by the addition of canthaxanthin compared to the negative control ($P>0.05$). The spermatic motility was higher in roosters supplemented with canthaxanthin in periods II, III and IV ($P<0.05$), between week 57th – 68th. The sperm vigor was significantly increased with the inclusion of canthaxanthin after the second evaluation period, which corresponds to the interval of 57th - 72th weeks of age ($P<0.05$). The seminal pH was lower in period V when adding canthaxanthin in the diet ($P=0.0234$). There were significant changes in the fatty acid profile between treatments ($P<0.05$). Canthaxanthin improves the parameters of motility and spermatic vigor, this can be attributed to changes in lipids of spermatozoa promoted by canthaxanthin. The increased motility and vigor of the spermatozoa allows a greater probability of fertilization of the ovum.

Key words: carotenoid, spermatozoa, roosters, lipids, poultry breeding.

INTRODUÇÃO

O espermatozoide é uma célula altamente especializada com a função de fertilizar o óvulo. Os lipídios são os maiores constituintes do sêmen aviário, com altas proporções de ácidos graxos poli-insaturados, característica está capaz de dar fluidez e flexibilidade à membrana espermática para permitir a motilidade e capacidade de fusão com o oócito.

Por conter altas proporções de ácidos graxos poli-insaturados os espermatozoides são susceptíveis a peroxidação lipídica. As células espermáticas possuem um sistema de proteção antioxidante natural, capaz de proteger contra os radicais livres e produtos tóxicos gerados pelo metabolismo oxidativo. Esse sistema de defesa antioxidante é composto por vitaminas (vitamina E e C), peptídeos (glutathione) e por enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase), esse sistema de defesa é determinante para a qualidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides.

Quando esse sistema de defesa natural está desequilibrado, seja por fatores externos ou pelo próprio organismo a suplementação com antioxidantes pode minimizar os efeitos da oxidação sobre a qualidade espermática. Os carotenoides possuem função antioxidante e quando adicionado na dieta de machos reprodutores, podem minimizar os danos causados pela oxidação. São eficientes na interação com oxigênio e são igualmente eficazes para neutralizar os radicais livres. Dentre os carotenoides está a cantaxantina, no grupo das cetonas elas minimizam esses efeitos causados pela oxidação. Os carotenoides não são sintetizados pelas aves e devem ser fornecidos através da dieta. A sua concentração nos tecidos é diretamente proporcional aos níveis fornecidos na dieta, associando-se principalmente aos lipídios dos tecidos e células (BENDICH e OLSON, 1989).

Quando adicionada a dieta de machos e fêmeas avícolas reprodutores, a cantaxantina exerce seu papel antioxidante de três formas: no embrião, protegendo os tecidos embrionários dos peróxidos durante a incubação, nas fêmeas protegendo os nutrientes da gema para a utilização pelo embrião e no macho, auxiliando nos mecanismos antioxidantes do sêmen e dos espermatozoides armazenados no oviduto (ROCHA, 2011).

Sobre o macho e suas características espermáticas, Ferreira (2010) verificou melhora na qualidade do sêmen após a adição de cantaxantina na ração. A autora atribuiu o aumento de motilidade e concentração espermática e a redução nas alterações morfológicas espermáticas à proteção antioxidante da cantaxantina dos ácidos graxos dos espermatozoides.

O efeito antioxidante sobre as características reprodutivas, peroxidação e composição lipídica do sêmen de machos *White Plymouth Rock* como resultado da suplementação de cantaxantina foram avaliados neste experimento.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Avicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil.

Animais e tratamentos

Foram selecionados 32 machos reprodutores da raça *White Plymouth Rock*, alojados e distribuídos aleatoriamente em gaiolas individuais (0,33 x 0,60 x 0,60m). Foram submetidos há um programa de iluminação de 17 horas/luz/dia. As aves foram mantidas em um período pré - experimental das 50^a às 52^a semanas de idade, para adaptação a coleta e resposta ao estímulo a massagem dorso-abdominal para ejaculação. O período experimental compreendeu da 53^a semana até a 72^a semana de idade das aves. Os tratamentos consistiram em machos suplementados com a dieta controle basal e machos que receberam dieta basal suplementada com cantaxantina com 6 mg de cantaxantina (*Carophyll Red 10% DSM Nutrition*) por kg de dieta. Os níveis nutricionais utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Os níveis nutricionais seguiram as recomendações de Rostagno et al., (2011). O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum*. Os machos foram pesados individualmente no início do experimento e a cada período de 28 dias, bem como a ração ofertada e as sobras para determinar o consumo.

Tabela 1- Composição centesimal e perfil nutricional das dietas

INGREDIENTES %	
Milho	59,56
Farelo de Soja	15,52
Farelo de Trigo	10,00
Fosfato Bicálcio	1,86
Calcário Calcítico	0,86
DL- metionina	0,07
Sal	0,40
Premix- Mineral ¹	0,05
Premix Vitaminico ²	0,10
Inerte	11,58
Composição Calculada	
Energia Metabolizável (Kcal/kg)	2600
Proteína Bruta %	14,00
Cálcio %	0,90
Fósforo disponível %	0,45

¹ Níveis mínimos de garantia do premix mineral (Kg/produto): Cobre 20g, Ferro 100g, Mangânes 160g, Cobalto 2000mg, iodo 2000mg e Zinco 100g. ² Níveis mínimos de garantia do premix vitamínico (Kg/produto): Vit A 9000000UI, Vit D3 2500000UI, Vit E 20000 UI, Vit K3 2500mg, Vit B1 1500mg, Vit B2 600mg, Vit B6 3000mg, Vit B12 12000mg, Ácido Pantotênico 12g, Niacina 25g, Ácido Fólico 800mg, Biotina 60g e Selênio 250mg.

Coleta de sêmen

O sêmen foi coletado quinzenalmente pelo método de massagem dorso-abdominal proposto por Forgiarini (2015). Foram utilizados tubos *falcon* graduados mantidos em banho maria em temperatura de 40° C. Logo após a coleta foi verificado o volume do ejaculado e avaliado os parâmetros de motilidade, vigor e pH. Após 5µl de sêmen foi armazenado em 5 ml de uma solução formol:citrato para posteriormente ser realizado as análises de concentração e morfologia espermática.

Motilidade e vigor espermático

Para a mensuração da motilidade, foi avaliado o movimento progressivo retilíneo e uniforme dos espermatozoides. Colocou-se 5µl de sêmen em uma lamina pré-aquecida e recoberta por uma lamínula. As células espermáticas foram observadas em microscopia de luz, com aumento de 200x. O resultado final foi expresso em porcentagem de células que apresentavam movimento retilíneo e progressivo.

O vigor espermático, demonstra a qualidade do movimento dos espermatozoides móveis conforme a metodologia proposta por Silva et al., (2002). O resultado apresentado em escores

onde: 0 - Células espermáticas imóveis; 1- células espermáticas com movimentação lenta, latero-lateral, sem progressão; 2 - células espermáticas com rápida movimentação latero-lateral, sem progressão retilínea; 3 - células espermáticas com rápidos movimentos latero-laterais, com alguma progressão retilínea; 4 - células espermáticas com movimentação lenta e com continua progressão retilínea e 5- células espermáticas com movimentação rápida e continua progressão retilínea.

Concentração espermática

Para a análise de concentração foi adicionado 5µl de sêmen em 5ml de solução de formol:citrato. Para a determinação da concentração espermática o sêmen foi diluído em uma proporção de 1:1000 para posteriormente ser realizado a contagem de células espermáticas em hemocitometro (*Câmara de Neubauer*), com resultado expresso em número de células por mm³ de sêmen. O resultado foi transformado para número de células por ml de sêmen.

Morfologia espermática

Para avaliação das anormalidades espermáticas, foram adicionados 5µl de sêmen em solução de formol:citrato. Uma gota desta mistura foi colocada sobre uma lâmina e sobreposta com lamínula deslizante, em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase (ampliação de 1000X, imersão em óleo). As células foram categorizadas em normais e as alterações descritas individualmente e agrupadas em anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, apresentado em percentagem.

Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados através de *pools* de sêmen formados pelos mesmos quatro machos, determinados às 56, 60, 64, 68 e 72 semanas de idade.

Os lipídeos totais foram extraídos do sêmen através da solução de hexano: isopropanol (HARA e RADIN, 1978). A fração lipídica foi transesterificada e metilada baseado na metodologia descrita por Christie (1982).

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa em cromatógrafo gasoso capilar (AGILENT 6890 SERIES GC SYSTEM); coluna capilar: (SUPELCO, 60m x 0,25mm, filme 0,25 µm; Sigma Aldrich). As condições cromatográficas foram: fluxo coluna de

1,00mL/min; as temperaturas do detector e do injetor foram 280°C e 250°C, respectivamente. A rampa de temperatura do forno iniciou com 100°C, permanecendo por 1 minuto, então aumentada até 240°C a uma taxa de 4°C/min, permanecendo por 20min. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e, o volume injetado foi de 1,0µL. As identificações dos picos foram verificadas por comparação com os tempos de retenção a um padrão mix37 de ácidos graxos ésteres metílicos (Sigma Chemical Co., Poole).

A integração dos picos e a manipulação dos dados subsequentes foram realizadas utilizando um sistema de dados AGILENT. Os ácidos graxos são apresentados como percentual de ácidos graxos identificados.

Avaliação do estresse oxidativo – Substância reativas ao ácido tiobarbitúrico

Nas semanas 56, 60, 64, 68 e 72 de idade das aves, um *pool* formado sempre pelo sêmen dos mesmos 4 machos foi coletado para obtenção de material suficiente para a análise da oxidação lipídica. O potencial antioxidante do sêmen foi baseado nas Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), conforme a metodologia descrita por Okawa et al., (1979). Essa metodologia tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA) produzindo um complexo de coloração rósea, quantificado por espectrofotometria através de um comprimento de onda de 532 nanômetros comparados a amostra padrão de MDA. A concentração de TBARS é determinada utilizando o valor de $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} ml^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do MDA, sendo a resistência do sêmen a oxidação lipídica expressa em nanogramas de TBARS/ml de sêmen.

Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada logo após a coleta e estimado com papel indicador universal em escala 1-14.

Delineamento experimental e análise estatística

Os dados experimentais foram agrupados em períodos, totalizando cinco períodos de 28 dias cada: período I – 53ª a 56ª semanas de idade, período II – 57ª a 60ª semanas de idade, período III – 61ª a 64ª semanas de idade, período IV – 65ª a 68ª semanas de idade e período V – 69ª a 72ª semanas de idade.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com dois tratamentos e 16 repetições cada, onde cada macho foi considerado uma repetição. Para as mensurações de TBARS e perfil de ácidos graxos foram formados *pools* de sêmen. O sêmen de quatro machos foi reunido para obter material suficiente para as análises, totalizando quatro repetições de quatro machos cada por tratamento. Os resultados foram avaliados utilizando ANOVA, usando o pacote estatístico SAS software (2011; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Todos os valores foram expressos como sendo médias \pm erro padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas a 5% de significância. O modelo utilizado no presente estudo foi o seguinte: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$. Sendo: Y_{ij} - representando as variáveis dependentes observadas; μ - média da população; T_i - efeito do tratamento e e_{ij} - erro residual aleatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo alimentar (g/ave/dia) dos machos não foi influenciado pela adição de cantaxantina na dieta (111,52g controle negativo vs. 113,44g cantaxantina) ($P > 0,05$). Garcia et al., (2002) avaliaram diferentes níveis de cantaxantina na dieta sobre a qualidade de ovos e desempenho de poedeiras comerciais, e observaram que o consumo não sofreu alteração. Forgiarini (2015) ao suplementar machos *White Plymouth Rock* com cantaxantina em dietas com milho ou sorgo não observou influência sobre o consumo médio diário das aves.

O peso corporal (g) (Tabela 2) não apresentou diferença estatística entre o controle negativo e a suplementação com cantaxantina nos períodos ($P > 0,05$). Ao analisar o período experimental total, os machos suplementados com cantaxantina apresentaram menor peso corporal ($P = 0,0476$). Santos (2011) não observou diferença significativa no peso corporal de machos e fêmeas de matrizes de corte alimentados com cantaxantina e 25-OH-D₃. Ferreira (2010) adicionou cantaxantina e 25-OH-D₃ na dieta de machos e observou aumento do ganho de peso dos reprodutores que consumiram cantaxantina + 25-OH-D₃, quando comparado aos que consumiram apenas 25-OH-D₃. Forgiarini (2015) adicionou 6ppm de cantaxantina em dietas a base de milho ou sorgo para machos, não encontrou efeito sobre o peso corporal. Rosa et al., 2016 suplementaram machos e fêmeas de matrizes de corte com 6ppm de cantaxantina e não observaram efeito sobre o peso corporal das aves.

Tabela 2. Peso corporal (g) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com cantaxantina

	Controle Negativo	Cantaxantina	P	CV%
Peso Inicial	2843 ± 49,24	2775 ± 49,46	0,3336	7,04
Período I	2892 ± 45,16	2812 ± 45,16	0,2204	6,33
Período II	2941 ± 47,85	2850 ± 46,23	0,1745	6,38
Período III	3015 ± 50,89	2912 ± 46,73	0,1294	6,30
Período IV	3026 ± 53,43	2931 ± 51,15	0,2063	6,87
Período V	3002 ± 53,36	2906 ± 47,87	0,1746	6,48
Média total	2953 ± 27,88	2865 ± 27,88	0,0476	2,34

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

O volume seminal não foi influenciado com a adição da cantaxantina comparado ao controle negativo (0,68ml vs. 0,75ml) (P>0,05). Forgiarini (2015), também não observou aumento no volume do ejaculado de machos que receberam cantaxantina. Os dados de volume de ejaculado foram maiores que os encontrados por Rodenas et al., (2005) e Rutz et al., (2007), onde as médias foram de 0,12ml e 0,30ml. O volume de sêmen depende da raça e o peso corporal dos machos.

A cantaxantina aumentou a motilidade espermática do sêmen dos machos nos períodos II, III e IV (P<0,05). Ferreira (2010) e Forgiarini (2015) ao testar inclusão de cantaxantina na dieta de machos, encontraram uma motilidade média de 84,49% e 92%, resultados semelhantes ao deste estudo, onde a média experimental foi de 90,60% nas aves suplementadas.

Tabela 3. Motilidade espermática (%) do sêmen de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com cantaxantina

	Controle Negativo	Cantaxantina	P	CV%
Período I	89,53 ± 0,58	91,15 ± 0,64	0,0743	2,59
Período II	89,06 ± 0,35	91,16 ± 0,36	0,0003	1,58
Período III	86,87 ± 1,21	91,25 ± 1,21	0,0161	5,44
Período IV	88,16 ± 0,64	90,93 ± 0,62	0,0043	2,77
Período V	82,33 ± 2,27	87,81 ± 2,19	0,0935	3,43
Média total	87,19 ± 1,23	90,60 ± 1,23	0,0552	2,59

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

A adição de cantaxantina melhorou o parâmetro de vigor espermático do sêmen no período experimental total (P=0,0019) (Tabela 4). Exceto no período I, onde não foi observado diferença estatística (P>0,05), nos demais períodos a inclusão foi significativamente positiva (P<0,05). Celeghini et al., (2001) observou correlação entre a motilidade e o vigor espermático (r=0,87), ou seja, as duas avaliações estão interligadas. Ferreira (2010) também encontrou

aumento na motilidade espermática com a inclusão da cantaxantina em dietas de machos *White Plymouth Rock*.

Tabela 4. Vigor espermático (1-5 escores) de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com cantaxantina

	Controle Negativo	Cantaxantina	P	CV%
Período I	3,87 ± 0,11	4,06 ± 0,11	0,2521	11,44
Período II	3,75 ± 0,09	4,12 ± 0,09	0,0123	10,10
Período III	3,59 ± 0,11	4,46 ± 0,11	0,0001	11,40
Período IV	3,16 ± 0,13	4,25 ± 0,13	0,0001	14,38
Período V	3,10 ± 0,19	3,81 ± 0,18	0,0137	21,77
Média total	3,49 ± 0,09	4,14 ± 0,13	0,0019	8,19

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

A concentração espermática não foi influenciada pela adição de cantaxantina (P>0,05) (2,9x10⁹ ml vs. 3,06x10⁹ ml). Forgiarini (2015) adicionou 6ppm de cantaxantina em dietas com milho ou sorgo e também não observou aumento na concentração espermática. Nos dados encontrados por Ferreira (2010), a adição de cantaxantina e 25-OH-D₃ promoveu uma melhora na concentração espermática dos machos.

Nas alterações morfológicas dos espermatozoides, não houve efeitos da cantaxantina na diminuição dos defeitos morfológicos de cabeça (4,86% vs. 4,72%), de peça intermediária (0,84% vs. 1,14%) e de cauda (1,34% vs. 1,14%) (P>0,05) em todo o período experimental. A porcentagem de defeitos totais também não foi significativamente reduzida para a inclusão de cantaxantina (7,56% vs. 6,57%) (P>0,05).

Ferreira (2010) observou que galos *White Plymouth Rock* submetidos à dieta contendo cantaxantina + 25-OH-D₃ teve redução significativa nas alterações morfológicas totais. Espermatozoides anormais podem ter sua motilidade e até sua sobrevivência comprometidas, portanto, o quanto maior for o percentual de espermatozoides normais melhor será o índice de fertilidade do lote (MACIEL, 2006). Araujo et al., (2013) avaliaram os benefícios da cantaxantina (6 g/T da dieta) em associação com uma fonte alternativa de vitamina D (25-hidroxicalciferol), na dosagem de 69 mg/T da dieta) em galos reprodutores Cobb 500, com avaliações as 30, 45 e 60 semanas de idade das aves. As 45 e 60 semanas de idade houve resposta positiva para a suplementação.

No período V, a suplementação com cantaxantina diminuiu o pH do ejaculado (P=0,0234) (Tabela 5). Um aumento de pH no ejaculado, pode levar a alterações na célula espermática e até levar a morte de espermatozoides (SCHRAMM e PINGEL 1991). Há uma

diminuição na capacidade fertilizante quando há uma maior amplitude de variação de pH e osmolaridade (BOGDONOFF e SHAFFNER, 1954; HOBBS e HARRIS, 1963).

Tabela 5. pH do sêmen de machos *White Plymouth Rock* suplementados ou não com cantaxantina

	Controle Negativo	Cantaxantina	P	CV%
Período I	6,18 ± 0,05	6,09 ± 0,05	0,2521	3,69
Período II	6,06 ± 0,05	6,12 ± 0,05	0,4619	3,89
Período III	6,06 ± 0,06	6,12 ± 0,06	0,5058	3,95
Período IV	6,26 ± 0,08	6,25 ± 0,07	0,8851	5,08
Período V	6,43 ± 0,07	6,18 ± 0,07	0,0234	4,53
Média total	6,20 ± 0,05	6,15 ± 0,05	0,5523	1,89

(P<0,05) - diferem estatisticamente

CV% - coeficiente de variação

Nestas condições, a cantaxantina não contribuiu para a minimização da peroxidação lipídica (TBARS nanogramas/ml/sêmen) do sêmen (22,85 vs. 22,39) (P>0,05). Rosa et al., (2016) suplementaram matrizes de corte com 6 mg/kg/alimento de cantaxantina e verificaram que houve um decréscimo no TBARS da gema do ovo. Desta forma, a cantaxantina atuou como antioxidante nesse sistema. De acordo com Breque et al., (2003) o armazenamento a longo prazo de espermatozoides, é suportado por um complexo sistema de defesa antioxidante, presente no oviduto que protege os espermatozoides da peroxidação lipídica. Esses autores afirmam que a cantaxantina pode desempenhar um papel importante nesse sistema. No entanto, o efeito positivo da cantaxantina como antioxidante do sêmen não foi demonstrado nessas condições.

A cantaxantina influenciou a composição dos ácidos graxos. Foram apresentados os ácidos graxos, como porcentagem de ácidos graxos identificados, com efeitos significativos pelos tratamentos demonstrados nas figuras a seguir.

Figura 1 e 2 – Perfil de ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com cantaxantina no período I e II

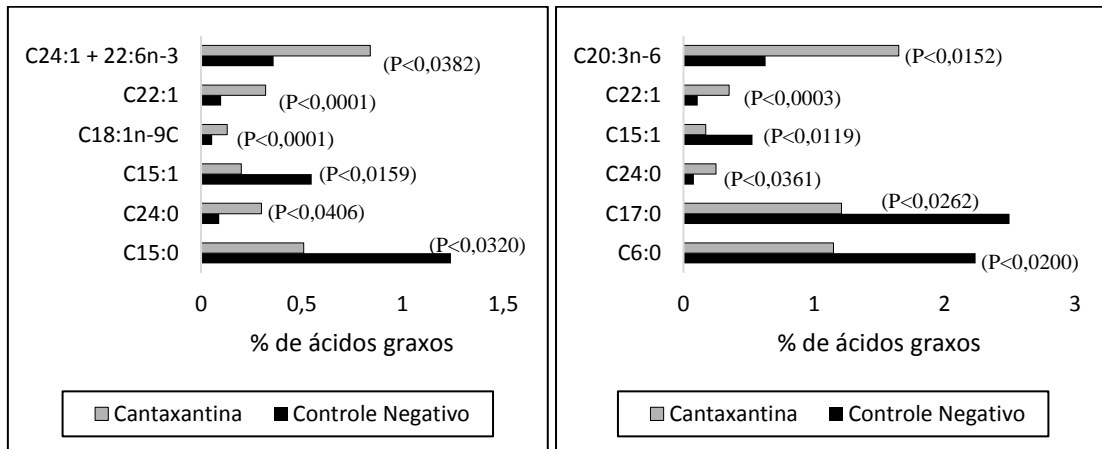


Figura 3 e 4 – Perfil de ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com cantaxantina no período III e IV

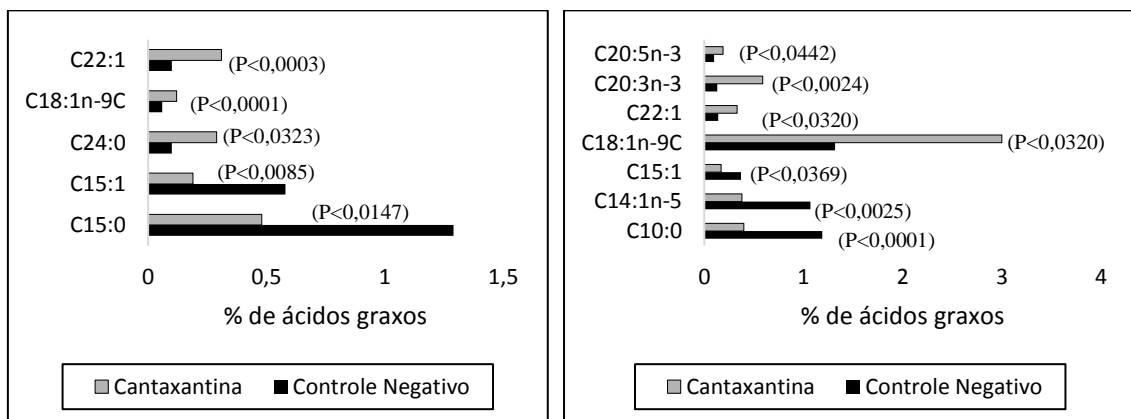
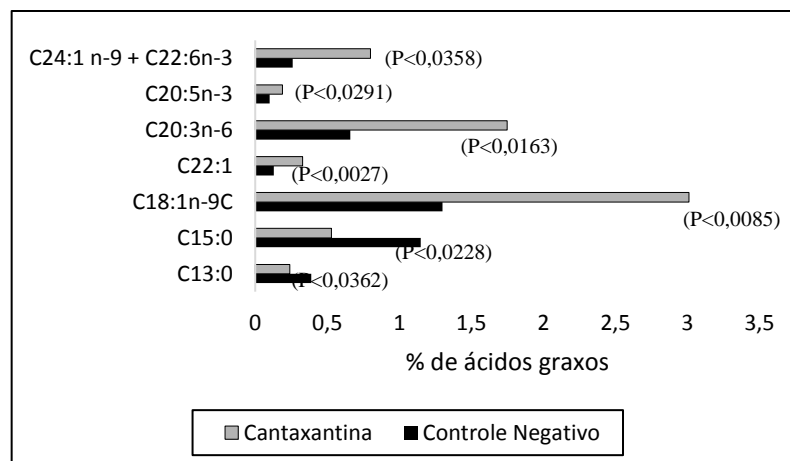


Figura 5 – Perfil de ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com cantaxantina no período V

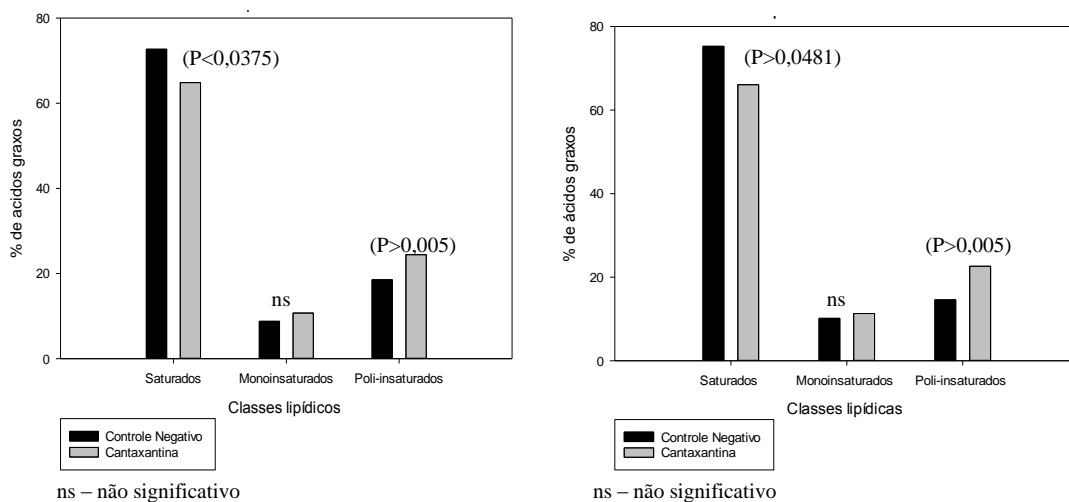


Os efeitos da cantaxantina sobre o perfil de ácidos graxos foram vistos nos ácidos com mais que 18 carbonos, principalmente nos que possuem insaturações. Apesar do TBARS não ter sido significativo, acredita-se que houve um efeito antioxidante, onde a cantaxantina atuou no sequestro dos radicais livres. Desta forma, impedindo que peroxidação decrescesse as proporções dos ácidos com maiores cadeias e que possuem insaturações.

Neste estudo os ácidos de cadeias C₂₀₋₂₂ estiveram em maiores proporções com a suplementação de cantaxantina. No período I e V o ácido 22:6n3 demonstrou-se em maiores proporções no tratamento com cantaxantina, devido suas seis ligações, esse ácido graxo possui maior propensão a oxidar. Em espermatozoides de mamíferos, os ácidos 22:6n-3 e 20:4n-6 foram os predominantemente oxidados (JONES e MAN, 1976; GRIVEAU et al., 1995). A peroxidação causa o decréscimo de aproximadamente 50% do conteúdo de C_{20:4n-6} e C_{22:6n-3} nos ácidos graxo (SURAI et al., 2001). Jones et al., (1978) em estudos com humanos, observou que durante a peroxidação dos espermatozoides os fosfolipídios perderam mais que 65% do conteúdo de C_{22:6n-3}.

Nos últimos dois períodos analisados (Figura 6 e 7) houve diferença estatísticas para as proporções de ácidos graxos saturados. O controle negativo apresentou maior proporção de saturados em relação ao tratamento com adição de cantaxantina. Como os dados são apresentados em proporções, a menor proporção de saturados no tratamento com cantaxantina concomitantemente, aumentou a proporção de ácidos insaturados. Surai et al., (2001) associou a peroxidação lipídica durante a estocagem de espermatozoides com a diminuição da concentração de ácidos graxos poli-insaturados.

Figura 6 e 7 – Perfil de ácidos graxos do sêmen de galos suplementados ou não com cantaxantina no período IV e V



CONCLUSÃO

A adição de cantaxantina na dieta de machos *White Plymouth Rock* não alterou consumo alimentar, porém, houve uma diminuição no peso corporal.

Não houve efeito benéfico da inclusão da cantaxantina para os parâmetros de volume de ejaculado, concentração espermática e redução de defeitos morfológicos. No quarto período a cantaxantina diminuiu o pH do sêmen.

A cantaxantina melhorou os parâmetros de vigor e motilidade espermática. Galos suplementados com cantaxantina em suas dietas tiveram alteração de perfil dos ácidos graxos, principalmente os ácidos de cadeias com mais de 18 carbonos. Tiveram menores proporções de saturados e conseqüentemente maiores os ácidos graxos poli-insaturados importantes para as funções espermáticas, porém, não apresentaram redução de oxidação do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, L. ARAUJO, C. Efeitos da Nutrição das Reprodutoras Sobre a Progenie. 2013. Disponível em: <http://www.cbna.com.br/anais/bd6140b0-a83f-4724-aacc75dbfe0eedd8/palestras/Palestra%205%20Lucio%20Araujo.pdf>

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

BREQUE, C., P. SURAI, J. P. BRILLARD. Roles of antioxidants in prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Molecular Reproduction and Development**. 66:314-323, 2003.

BOGDONOFF, P. D.; SHAFFNER, C. S. The effect of pH on the in vitro survival, metabolic activity, and fertilizing capacity of chicken semen. **Poultry Science**, v.33, p.665-669, 1954.

BOTSOGLOU, N. A.; FLOROU, P. P.; BOTSOGLOU, E.; DATOS, V.; GIANNENAS, I.; KOIDIS, A.; MITRAKOS, P. The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and alpha-tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. **South African Journal Animal Science**. v.35 p.143-151, 2005.

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

CELEGHINI, E. C. et al. Avaliação das características seminais de galos selecionados para a reprodução pelo desenvolvimento da crista – **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.38, n.4, p. 177-183,2001.

CHRISTIE, W.W. Isolation of lipids from tissues. In *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. Pergamon Press, Oxford, p.17–25. n.2 1982.

DELAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa –a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*, Oxford, v. 10, p. 15-21, 1995.

FERREIRA, P. B. **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, 2010.

FORGIARINI, J. **Cantaxantina em dietas com milho ou sorgo sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2015.

GARCIA, E. A. et al. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* [on line] 2002, vol.4, n.1 ISSN 1516-635X.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RERNARD, P. CALLEGARI, J.P.; LELLANOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and fertility*. 103:17-26, 1995.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, v.90, p.420-426, 1978.

JONES, R. e MANN, T. Lipid peroxides in spermatozoa; formation, role of plasmalogen and physiological significance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological*. 84:103-107, 1976.

OHKAWA, H.; OHISHI.; YAGI, Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. V.95 p.351-358, 1979.

ROCHA, J. S. R. **Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário**. 2011. 80 p. Tese (doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

RODENAS, C.E.O. et. al. Características seminais de galos alimentados com ração suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. *Ciências Agrotécnicas*. v.29, p.160-167, 2005.

ROSA, A. P. et al. Effect on lipid peroxidation, fatty acid profile of fertile eggs and offspring performance of broiler breeders fed with a corn or sorghum diet and canthaxanthin. *Journal of Poultry Science*. p.1-12, 2016.

ROSTAGNO, H.S. et al., **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 252p, 2011.

RUTZ, F. et al. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, 3:307-317, 2007.

SANTOS, C. B. **Uso de cantaxantina e/ou 25-dihidroxicoliciferol em dietas para matrizes de corte**. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

SAS. Statistical Analysis System 9.3. Cary, NC: SAS Institute, 2011.

SCHRAMM, G. P.; PINGEL, H., 1991: Kunstliche Besamung beim Geflugel. In: BUSCH, W.; LOHLE, K.; PETER, W. Kunstliche Besamung bei Nutztieren, 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, p. 601–632.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros analisados mais influenciados pela adição dos antioxidantes na dieta de galos *White Plymouth Rock*, foram a motilidade e o vigor espermático. Esses parâmetros apresentaram melhoras significativas com a adição da vitamina E, selênio e cantaxantina.

A vitamina E foi o único antioxidante que promoveu a melhora da concentração espermática, porém, a adição da vitamina na dieta diminuiu o volume seminal no último período analisado. A cantaxantina e o selênio não influenciaram o volume de sêmen e nem a concentração espermática.

Os defeitos morfológicos totais não foram diminuídos com a suplementação de antioxidantes na dieta. O pH do último período analisado foi menor para a suplementação com cantaxantina, não sendo observado o mesmo efeito para os demais.

A vitamina E e o selênio atuaram reduzindo a peroxidação lipídica do sêmen, efeito não observado com a adição da cantaxantina. A adição de antioxidantes na dieta tem a capacidade de alterar o perfil de ácidos graxos do sêmen, aumentando principalmente os ácidos graxos de cadeia longa e que possuem insaturações.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v. 6, n. 1, p. 19-24, 1994.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility. Dev.** 7. 4:659-668,1995.
- ALVAREZ, J. C.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa; its effect on sperm motility. **Biology Reproduction**, Madison, v. 27, n. 5, p. 1102-1108, 1982.
- ALVIM, F.; SOUZA, G.M. De. Influência dos principais micro-minerais na reprodução de bovinos (Parte final). 2005. Disponível em: <http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1006>.
- BACHA, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo, p.320, 2003.
- BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. v.2011, p.1-8, 2010.
- BARREIROS, A. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut.* v. 47, p. 233-261,1996.
- BEHNE, D. T.; HOFER, R.; BERSWORDT-WALLRABE, J.; ELGER, W. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. **Journal Nutrition**. v.112, p.1682-1687, 1982.
- BILODEAU, J. F. et al. 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, p.1105-1122, 2002.
- BÖHM, F.; EDGE, R.; LAND, E. J.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOT, T. G. Carotenoids enhance vitamin E antioxidant efficiency. **Journal of American Chemical Society**. V.119. p.621-622, 1997.
- BONGALHARDO, D. C.; SOMNAPAN-KAKUDA, N.; BUHR, M. M. Isolations and unique composition of purified head plasma membrane from rooster sperm. **Poultry Science**. v.81, p.1877-1883, 2002.
- BONI, I. J.; PONSATI, R. M. Manejo reprodutivo de machos matrizes. In: Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas. Anais. Santos. p.75-84, 2005.
- BURKE, W. H. **Reprodução das Aves**. In: Dukes, H. H. Dukes: fisiologia dos animais domésticos. 11.ed. Guanabara. Rio de Janeiro. v. 38, p.660-680,1996.

CEROLINI, S. Relationship between spermatozoon lipid composition and fertility during aging of chicken. **Biology of Reproduction**. v. 57, p.976-980, 1997.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A. SURAI, P. F.; NOBLE, R. C. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**. v.58, p-99-111, 2000.

CONQUER, J. A.; MARTIN, J. B.; TUMMON, I.; WATSON, L.; TEKPETEY, F. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma and spermatozoa of normozoospermic versus asthenozoospermic males. *Lipids*. 34:793-799, 1999.

DEGUCHI, Y.; HANSEN, J. C. Selenium and fertility in animals and man-a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.37(1), p.19-30, 1996.

DONOGUE, A. M.; DONOGHE, D. J. Effects of water and lipid soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during lipid storage. **Journal of Poultry Science**. v.76, n.10, p.1440-1445, 1997.

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

ETCHES, R. J. Reproduction Avian: Characterization of chicken Sertoli cells in vitro. **Poultry Science**. v. 61, p.531-539, 1982.

FERREIRA, P. B. **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, 2010.

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

GUIBERT, E.; BRIÈRE, S.; PELLETIER, R.; BRILLARD, J. P.; FROMENT, P. Characterization of chicken Sertoli cells in vitro. **Journal of Poultry Science**. v.90, p.1276-1286, 2011.

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

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

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. Ed 7. Barueri. p.237-257, 2004.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. **Oxford University**, 1985.

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

HOGG, N. Free radicals in disease. **Seminars in Reproductive Endocrinology**. v.16, p.241-248, 1998.

HORTON, H. R. et al. **Principles of Biochemistry**. 3rd ed., p.221-222, 2002.

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

JACOB, J. Avian Reproductive System – Male. 2015. Disponível em: <http://articles.extension.org/pages/65373/avian-reproductive-systemmale>

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

KELSO, K. A. et al. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.106, p.201–206, 1996.

KELSO, K. A. et al. 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. **Journal Reproduction Fertility**. v.110, p.53-59, 1997.

KIM, K. S. et al. The effect of training type on oxidative damage and antioxidant capacity during three-dimensional space exercise. **Medical Principles Practice**. v.19, p.133-141, 2010.

KUSTER, C. E.; SINGER, R. S.; ALTHOUSE, G. C. Determining sample size for the morphological assessment of sperm. **Theriogenology**. v.6, p.691-703, 2004.

LEESON, S. & SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. 4 ed. Guelph, Ontario: University Books, 591p, 2001

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

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

LUCCHESI, L. et al. A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina. **Reprodução e Climatério**. v.22, p. 7-14, 2007.

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

MACPHERSON A. Selenium, vitamin E and biological oxidation. In: Cole DJ, Garnsworthy PJ. **Recent Advances in Animal Nutrition**. Oxford: Butterworth and Heinemann; p. 3-30. 1994.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. 2009. Oxidative stress and male infertility. **Indian Journal of Medical Research**. v.129, p.597-603.

MACPHERSON A. Selenium, vitamin E and biological oxidation. In: Cole DJ, Garnsworthy PJ. **Recent Advances in Animal Nutrition**. Oxford: Butterworth and Heinemann; p. 3-30. 1994.

MARTIN-RILLO, S. et al. Bora semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**. v.31. p.4:519-526,1996.

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

MOREIRA, J. et al. Efeito de fonte e níveis de selênio na atividade enzimática da glutatona peroxidase e no desempenho de frangos de corte. **Ciência Agrotecnic**. v.25, p.664-666, 2001.

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

NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrologia**. v.15, p.264–269, 1983.

NWOSE, E.U.; JELINEK, H.F.; RICHARDS, R.S.; KERR, P.G. The vitamin E regeneration system (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes – A hypothesis. **Medical Hypotheses**. 70(5):1002-8, 2008.

PAN, E.A.; RUTZ, F.; DIONELLO, N.J.L.; ANCIUTI, M.A.; KRABBE, E.L. Desempenho de poedeiras semipesadas arraçadas com a suplementação de selênio orgânico. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.16, n.1-4, p.83-89, 2010.

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

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

RODENAS, C.E.O. et. al. Características seminais de galos alimentados com ração suplementadas com diferentes óleos e níveis de vitamina E. **Ciências Agrotécnicas**. v.29, p.160-167, 2005.

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

RUTZ, F. et al. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, 3:307-317, 2007.

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

SCHER, A. et al. Efeitos de HyD® e Carophyll Red® á dieta de matrizes de cortesobre a incubação artificial. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS: Prêmio Lamas, 2009, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: FACTA,2009. 1 CD-ROM

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

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

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

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

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

STURKIE, P.D.; OPEL, H.; **Reproduction in the male, fertilization and early embryonic development**. In: Sturkie PD (Ed.). Avian physiology. 3rd.ed. New York: Springer-Verlag, 1976. Chapter 17.

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

SPITELLER, P.; SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe²⁺/O₂ or Fe³⁺/O₂ is used as oxidant. **Biochemical biophysical acta**. v. 1392, p.23-40. 1998.

SOUTHON, S. Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. **Food Research International**. v 33, p.211-227, 2000.

SOUZA, J. D. S.; FERREIRA, W. M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal: meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime** [on line], v.4, n.3, p.456-461, 2007.

SURAI, P.F.; SPEAKE, B.K.; SPARKS, N.H.C. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. **Journal of Poultry Science**. v.38, p.117–145. 2001.

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

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

WALES, R. G.; WHITE, I.G.; LAMMOND, D.R. The spermicidal activity of hydrogen Peroxide in vitro and in vivo. **Journal endocrinology**. 18:236-244, 1959.

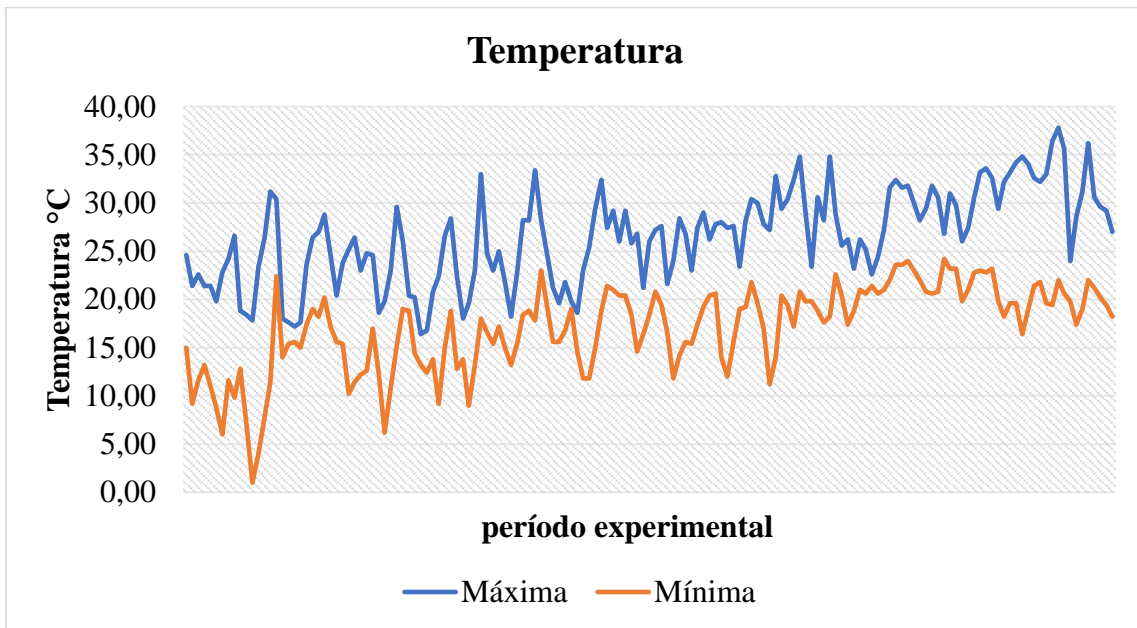
WEIR, C. P.; ROBAIRE, B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. **Journal of Andrology**. v 28. p.2:229 -240, 2007.

WISHART, G. J. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing, ability. **Journal of Reproduction and Fertility**, cambridge, v. 71, n. 1, p. 113-118, 1984.

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

ZALATA, A.A. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular Human Reproduction**. p.4111–118,1998.

ANEXO



Anexo A – Temperatura máxima e mínima diária no período experimental