



Eficiência reprodutiva de matrizes de corte suplementadas com cantaxantina

Reproductive efficiency of broiler breeder supplemented with canthaxanthin

Érica Crosara Ladir de Lucca¹ , Patrícia Alves Teixeira¹ , Matheus Vicente da Silva¹ , Marcelo Emílio Beletti*¹ 

¹ Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente: mebeletti@ufu.br

Resumo: A inclusão de substâncias com propriedades antioxidantes na dieta de matrizes auxilia o sistema de defesa enzimática no controle dos danos causados pelos radicais livres nas células, como exemplo, os espermatozoides dos galos. Propõe-se a hipótese de que a suplementação de matrizes de corte com cantaxantina possa ter um efeito positivo no sistema reprodutivo destes animais. O objetivo desta pesquisa foi estudar a ação da adição de cantaxantina na dieta de matrizes de corte sobre as taxas de fertilização e eclosão dos ovos e sobre a fertilidade de galos. Para o experimento, galinhas e galos receberam, a partir de 22 semanas de idade, ração com e sem suplementação de 6 ppm de cantaxantina. Galos entre 30 e 50 semanas de idade que receberam a cantaxantina na dieta apresentaram menos alterações na cromatina espermática ao longo das semanas de vida. Não houve diferença entre as mensurações dos túbulos seminíferos nos diferentes tratamentos. As matrizes suplementadas com cantaxantina apresentaram a maior taxa de perfuração espermática na membrana perivitelina, melhor taxa de eclosão e maior taxa de fertilidade. Concluiu-se que o uso de cantaxantina como agente antioxidante na dieta de matrizes de corte melhora a eficiência reprodutiva.

Palavras-chave: antioxidantes; galo; cromatina; fertilidade.

Abstract: The inclusion of substances with antioxidant properties in the diet of broiler breeders helps the enzymatic defense system in controlling the damage caused by free radicals in cells, for example, rooster spermatozoa. It is therefore hypothesized that supplementing broilers with canthaxanthin may have a positive effect on the reproductive system of broilers. The objective of this research was to study the action of the addition of canthaxanthin in the diet of broiler breeders on the fertilization and hatching rates of eggs and on the fertility of roosters. For the experiment, hens and roosters received, from 22 weeks of age, feed with and without supplementation of 6 ppm of canthaxanthin. Roosters between 30 and 50 weeks of age that received canthaxanthin in the diet showed less alterations in chromatin over the weeks of life. There were no differences between measurements of seminiferous tubules in different treatments. Canthaxanthin-supplemented broiler breeders had the highest rate

Recebido: 06 de outubro, 2023. Aceito: 02 de julho, 2024. Publicado: 30 de setembro, 2024.

of perforation of sperm in the perivitelline membrane, the best hatching rate and the highest fertility rate. It was concluded that the use of canthaxanthin as an antioxidant agent in the diet of broiler breeders improves reproductive efficiency.

Keywords: antioxidants; rooster; chromatin; fertility.

1. Introdução

Os radicais livres são elementos presentes em processos biológicos importantes na reprodução e produção avícola, podendo causar danos através do processo de oxidação em diversos sistemas biológicos. É importante ressaltar que dentre os danos causados pelos radicais livres, existem danos diretos e indiretos à cromatina, principalmente à cromatina espermática, que vão desde alterações na compactação da cromatina até a fragmentação do DNA espermático ⁽¹⁾. A adição de substâncias com propriedades antioxidantes na dieta de matrizes de corte auxilia o sistema de defesa enzimático a controlar os danos causados pelos radicais livres nas células, como os espermatozóides ⁽²⁾.

O plasma seminal é naturalmente enriquecido com antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que protegem os espermatozoides contra o estresse oxidativo, e uma deficiência desses antioxidantes está associada com problemas de fertilidade masculina ⁽³⁾. No caso da matriz reprodutora, após a cópula, os espermatozoides permanecem armazenados nos reservatórios espermáticos do oviduto e as galinhas assumem o papel de proteção contra os efeitos da oxidação sobre os espermatozoides ⁽⁴⁾. Já foi demonstrado que a adição de cantaxantina na dieta de machos reprodutores de corte na fase pós-pico pode ser uma ferramenta para melhorar o índice de fertilidade de reprodutores idosos, pois, melhora o percentual de espermatozoides normais, aumenta o peso e largura da barbela, aumenta o peso e o comprimento dos testículos ⁽⁵⁾.

Nessa perspectiva, o uso da cantaxantina adicionada à dieta de galos e galinhas de corte, pode exercer seu papel antioxidante de três maneiras: 1) no embrião – protegendo os tecidos embrionários durante a incubação, 2) no ovo – protegendo os nutrientes da gema durante a incubação. armazenamento para o embrião em desenvolvimento e, 3) no envelhecimento de matrizes de corte – ajudando nos mecanismos antioxidantes do sêmen e do oviduto e reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides ⁽⁶⁾. Com base nessas informações que demonstram o papel antioxidante da cantaxantina e por ser um possível aditivo de comercialização na avicultura industrial, o objetivo desta pesquisa foi estudar a ação da adição de cantaxantina na dieta de matrizes de corte sobre as taxas de fertilização e eclosão dos ovos e sobre a fertilidade de galos.

2. Material e métodos

A metodologia utilizada foi aprovada pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, e o número do certificado do protocolo CEUA é 012/15. A pesquisa foi realizada em um galpão de produção de matrizes convencionais

localizado no município de Uberlândia, Minas Gerais. As coletas ocorreram entre os meses de janeiro a julho de 2015. Neste experimento foram alojados 24.000 pintinhos de um dia de vida da linhagem Ross® AP95, sendo 20.500 fêmeas e 3.500 machos, que permaneceram no período de criação em dois galpões *blackout*, com pressão negativa, em boxes específicas separadas para fêmeas e machos.

As rações experimentais foram oferecidas a partir da 22ª semana de vida. Os tratamentos foram definidos de acordo com os antioxidantes adicionados às dietas experimentais, sendo: Tratamento 1 - 10.500 fêmeas e 1.500 machos, alojados em galpão com suplementação de cantaxantina (6ppm), a partir da 22ª semana de vida; Tratamento 2 - 10.500 fêmeas e 1.500 machos, alojados em galpão sem cantaxantina na ração. As coletas iniciaram-se na 30ª semana de vida do rebanho e foram repetidas nas semanas 40 e 50 de vida dos animais.

Uma das avaliações para quantificar a fertilidade do galo foi o teste de contagem de perfurações da membrana perivitelina. Para a realização do teste de contagem de perfuração da membrana perivitelina foram coletados aproximadamente 60 ovos em cada uma das idades de coleta (30, 40 e 50 semanas de vida da matriz). O número amostral para esta análise foi de 10 ovos, por tratamento (T1 - com cantaxantina e T2 - sem cantaxantina) e por idade. Os ovos foram retirados aleatoriamente da segunda coleta de ovos do dia. Após a coleta, foram encaminhados ao laboratório onde foi iniciado o processamento.

A técnica de contagem das perfurações utilizada no experimento foi descrita inicialmente por Bramwell e Howarth ⁽⁷⁾ e modificada em alguns aspectos por Donoghue ⁽⁸⁾. Cada ovo teve sua gema cuidadosamente separada da clara. Uma porção de aproximadamente 1 cm² da membrana perivitelina na região do disco germinativo foi removida e imersa em PBS para remover o albúmen e a gema remanescentes. O pedaço da membrana foi colocado e posicionado esticado sobre uma lâmina com auxílio de uma pinça e fixado com formol a 20%. Posteriormente, algumas gotas do reagente de Schiff foram usadas como corante. A lamínula foi colocada sobre a membrana corada e fixada e seguida de análise em microscópio de luz com aumento de 100x. A partir de cada lâmina foi localizada a região onde ocorreram as perfurações espermáticas e contado o número de perfurações.

Para análise do desenvolvimento testicular foram coletados aleatoriamente 10 galos de cada tratamento, na idade intermediária do teste (40 semanas). Fragmentos de 0,5 cm³ foram obtidos dos testículos de cada galo e fixados em solução de formalina a 10% por pelo menos 24 horas. Após esse período, foram submetidos às técnicas histológicas de rotina (desidratação, diafanização e inclusão em parafina), seguindo metodologia proposta por Tolosa et al. ⁽⁹⁾. Cortes de cinco micrômetros de espessura foram preparadas em micrótomo antes de serem coradas com hematoxilina-eosina. Posteriormente, as lâminas preparadas foram observadas em microscópio de luz e microfotografadas para análise e medidas do diâmetro total e altura do epitélio dos túbulos seminíferos, utilizando o software HL Image®. Doze túbulos seminíferos por animal foram fotografados e medidos.

Nas idades de 30, 40 e 50 semanas, aproximadamente 20 galos de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente. Esses galos foram separados das fêmeas por 3 dias antes da coleta de sêmen. O sêmen foi coletado conforme descrito por Burrows e Quinn ⁽¹⁰⁾, com o método de massagem abdominal.

As amostras de 0,5mL de sêmen de galo foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão; cada amostra foi colocada em tubos com glutaraldeído 5%. Após a fixação o sêmen foi centrifugado 100 x g por 5 minutos depois lavado em tampão fosfato três vezes e descartou-se o sobrenadante, pós-fixado por quatro horas em glutaraldeído 3% e uma hora em tetróxido de ósmio 1% mais ferrocianeto de potássio 1,25%. Foram desidratados em série ascendente de acetona. Finalmente, o sedimento foi incluído em resina Epon (EMbed 812®, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, US) e posteriormente cortado em ultramicrótomo para obtenção de cortes ultrafinos. Os cortes foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Todas as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 Transmission Electron Microscope - SpiritBiotwin FEI - 120 kV (FEI company, Hillsboro, OR, US), quando foram avaliadas 80 cabeças de espermatozoides de cada amostra.

Cabeças que apresentavam núcleos homoganeamente escuros (eletrodensos) foram consideradas como tendo cromatina com compactação normal. Cabeças que apresentavam núcleo claro (eletrolúcidos) ou de coloração heterogênea foram consideradas com cromatina alterada e foram classificadas de acordo com os níveis de descompactação da cromatina: leve, o qual apresenta um pequeno ponto de descompactação na estrutura da cromatina; médio, onde a cromatina apresenta entre um e três pontos de descompactação; intenso, presença acima de três pontos de descompressão ou apresentação muito heterogênea em mais de um ponto da cabeça do espermatozoide.

Os dados de eclosão foram obtidos pela empresa Pole Alimentos, responsável pela incubação dos ovos, conforme fórmula de eclosão:

$$Eclos\tilde{a}o = \frac{n^{\circ} \text{ pintos nascidos} \times 100}{n^{\circ} \text{ total de ovos incubados}}$$

Os ovos foram incubados em máquinas do modelo multiestágio, com período médio de armazenamento de sete dias. No 19º dia de incubação, os ovos foram transferidos para nascedouros, onde permaneceram até completarem 21 dias. Para análise de fertilidade os ovos foram submetidos à quebra e análise visual do disco germinativo e classificado como fértil ou não fértil, no segundo dia de armazenamento, após 50 semanas de idade, semanalmente, 50 ovos por tratamento, conforme padrão da empresa.

$$Fertilidade = \frac{n^{\circ} \text{ de ovos férteis} \times 100}{n^{\circ} \text{ ovos avaliados}}$$

Para análise estatística, os dados foram verificados quanto à presença de outliers. Os dados referentes à perfuração espermática da membrana perivitelina e eclosão foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade de variância e posteriormente

ao teste de Kruskal-Wallis juntamente com avaliação post hoc de Wilcoxon e correção de Bonferroni foi empregada para comparação entre os grupos ⁽¹¹⁾. O nível de significância foi fixado em 0,05, em teste bilateral. Para verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de fecundidade, após verificação da normalidade dos dados, foi aplicado o teste T aos dados em questão. O nível de significância foi fixado em 0,05, em teste bilateral. Para verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre as medidas testiculares, também foi aplicado o teste T para duas médias após verificação da normalidade dos dados. O nível de significância foi fixado em 0,05, em teste bilateral. Para os dados de compactação da cromatina foi aplicado o teste binomial para duas proporções, com nível de significância fixado em 0,05. A esses dados também foi aplicado o teste Odds Ratio, que compara a taxa de relacionamento entre duas medidas ⁽¹²⁾.

3. Resultados

De acordo com os resultados, foram encontradas diferenças entre o número de perfurações espermáticas, obtidas nas, 30, 40 e 50 semanas de idade, e nas três idades observadas, a maior taxa de perfuração espermática na membrana perivitelinea (PEMP) ocorreu em o lote suplementado com cantaxantina (Tabela 1). Como resultado do presente trabalho, também foi observado, maior número de perfurações espermáticas na membrana perivitelinea dos animais tratados com o aditivo antioxidante em todas as idades testadas (30, 40 e 50 semanas), indicando também possíveis melhorias na fertilidade e taxas de eclosão.

Tabela 1. Número médio de perfurações espermáticas na membrana perivitelinea de ovos provenientes de lote suplementado com cantaxantina (T1) e não suplementados com cantaxantina (T2) em três idades distintas

Semana	T1	T2	P-valor
30	266 a	71 b	0,049*
40	344 a	114 b	0,041*
50	190 a	75 b	0,021*

Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores ($p \leq 0,05$).

Os resultados do teste estatístico para verificar ou não a diferença entre o número de PEMP com relação à idade dos lotes estão representados na tabela 2. Em relação ao tempo de vida analisado, 30, 40 e 50 semanas, não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Isso significa que em ambos os tratamentos, o comportamento da perfuração média na membrana perivitelinea dos ovos foi semelhante, apresentando queda proporcional na última semana testada (Tabela 2). Na Figura 1 há uma ilustração das perfurações espermáticas na membrana perivitelinea. Não houve diferenças entre as medidas de diâmetro total e altura do epitélio dos túbulos seminíferos nos diferentes tratamentos. (Tabela 3).

Tabela 2. Teste de probabilidade para as variáveis tempo de análise – 30, 40 e 50 semanas – e tratamento, com cantaxantina (T1) e sem cantaxantina (T2), para o teste de perfuração da membrana previtelínea

Tratamentos	semanas		P-valor
T1	30 a	50 a	0,42
T2	30 a	50 a	0,96

Letras distintas indicam diferença significativas entre os valores ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Resultados da mensuração testicular, diâmetro total e altura de epitélio dos túbulos seminíferos de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, nas 40 semanas de vida

Medida	T1	T2	P-valor
diâmetro(μm)	232,58 a	207,49 a	0,06
Epitélio (μm)	67,83 a	61,54 a	0,22

Letras distintas indicam diferença significativas entre os valores ($p \leq 0,05$).

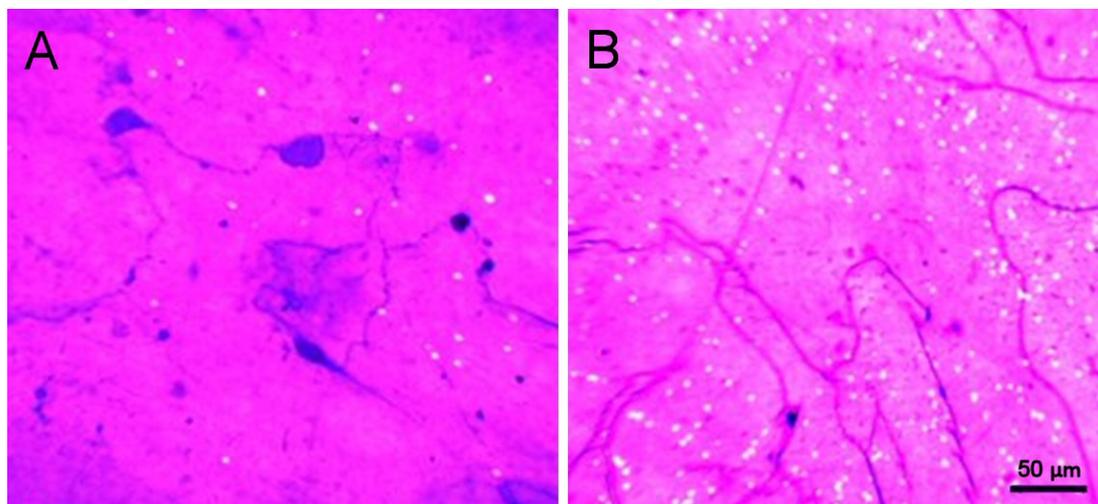


Figura 1. A- Membrana perivitelínea com baixa quantidade de perfurações espermáticas, B- com grande quantidade de perfurações na membrana espermática. Barra = 50 μm

Houve diferença entre os tratamentos na 30ª semana de vida, e os galos que receberam cantaxantina apresentaram maior quantidade de espermatozoides normais. Quanto ao grau de descompactação, nesta idade, foi possível observar diferenças em termos do nível de classificação leve, ou seja, os galos não suplementados apresentaram maior quantidade de espermatozoides com apenas um ponto de descompactação, em toda a extensão de sua cabeça. (Tabela 4). Na semana 50, também foi possível observar maior quantidade de espermatozoides normais nos galos que receberam cantaxantina. Em todos os graus de descompactação da cromatina, houveram diferenças indicando que os galos que não receberam o antioxidante na dieta apresentaram maior quantidade de espermatozoides com descompactação parcial ou total da cromatina (Tabela 5).

Tabela 4. Grau de descompactação da cromatina observada em espermatozoides de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, nas 30 semanas de vida

	Grau de descompactação de espermatozoides			
	Normal	Leve	Médio	Intenso
T1	79,45 a	3,08 a	5,82 a	11,64 a
T2	67,96 b	15,49 b	5,99 a	10,56 a
P-valor	0,00*	0,00*	0,99	0,98

Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Grau de descompactação da cromatina observada em espermatozoides de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, nas 50 semanas de vida

	Grau de descompactação de espermatozoides			
	Normal	Leve	Médio	Intenso
T1	89,31 a	0,85 a	5,98 a	3,85 a
T2	59,11 b	7,73 b	17,68 b	15,47 b
P-valor	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*

Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores ($p \leq 0,05$).

Observamos que em T2 a quantidade de espermatozoides com algum grau de descompactação da cromatina aumentou em relação ao tempo de vida dos galos, ou seja, galos mais velhos apresentaram maiores quantidades de descompactação parcial ou total da cromatina. No T1, o grau de descompactação foi menor, ou seja, os galos que receberam o antioxidante na dieta apresentaram menor quantidade de alteração da cromatina ao longo das semanas de vida. (Tabela 6). A Figura 2 ilustra os diferentes graus de descompactação da cromatina do esperma de galo.

Tabela 6. Número de espermatozoides de galos suplementados (T1) e não suplementados (T2) com cantaxantina, que apresentaram anormalidade na compactação de cromatina, nas 30 e 50 semanas de vida

semanas	T1	T2	P-valor
30	20,54 a	32,04 b	0,01*
50	10,68 a	40,88 b	0,00*

Letras distintas indicam diferença significativa entre os valores ($p \leq 0,05$).

De acordo com o Odds Ratio, entre o número de alterações na compactação da cromatina dos tratamentos na semana 30 de vida dos galos, a probabilidade de observar alterações na compactação da cromatina espermática de galos não suplementados com cantaxantina (T2), é maior do que em galos suplementados. Na semana 50, essa probabilidade aumenta, neste caso, quanto maior for a chance de observar alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides de galos que não receberam o antioxidante na dieta (Tabela 7). Isto sugere que o efeito negativo da idade na eficiência reprodutiva das matrizes reprodutoras foi minimizado pela adição de cantaxantina à dieta. Observamos diferenças na taxa de eclosão no período correspondente às semanas 35 a 45 semanas, ou seja, para essas idades, as taxas de eclosão semanais apresentaram melhora nos lotes que receberam o antioxidante na dieta (Tabela 8).

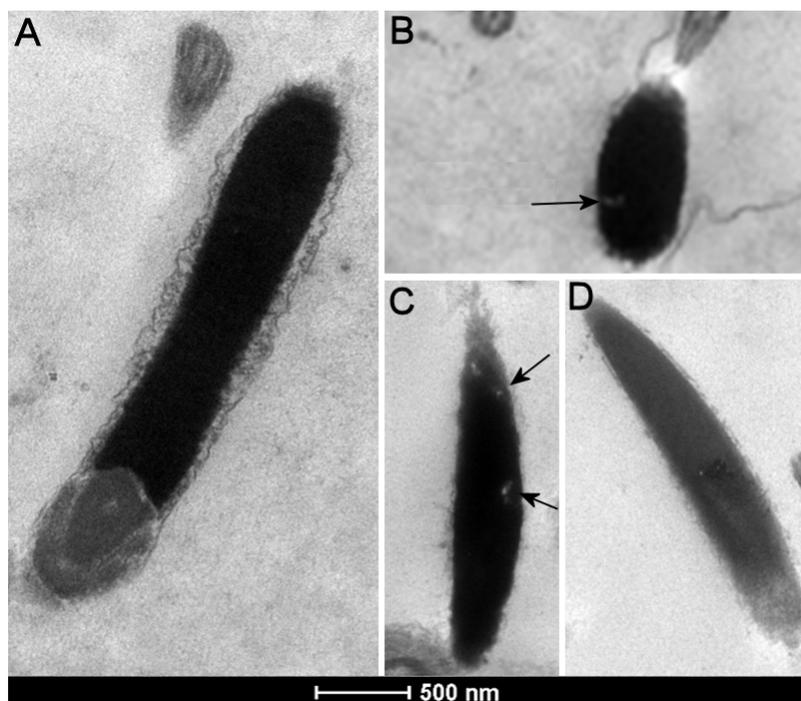


Figura 2. Micrografia eletrônica de cabeças de espermatozoides de galo. A: Cabeça espermática com compactação normal da cromatina. B: Grau leve de descompactação da cromatina espermática caracterizada por pequena área mais clara (seta); C: Grau médio de descompactação da cromatina caracterizado por diversas pequenas áreas mais claras (setas); D: Cabeça espermática com intensa descompactação da cromatina e caracterizada por região mais clara que atinge quase toda a cabeça. Barra = 500 nm

Tabela 7. Odds Ratio, entre número de alterações na compactação de cromatina dos tratamentos 1 e 2, nas idades de 30 e 50 semanas

semanas	T1:T2	P-valor
30	1,82	0,00*
50	5,78	0,00*

Letras distintas indicam diferença significativas entre os valores ($p \leq 0,05$).

Tabela 8. Eclosão média analisada em três períodos, dos ovos de matrizes suplementadas (T1) e não suplementadas (T2) com cantaxantina

Período (semanas)	T1	T2	P-valor
29 - 35	83,12 a	79,37 a	0,14
35 - 45	86,16 a	82,66 b	0,00*
45 - 55	77,85 a	73,86 a	0,17

Letras distintas indicam diferença significativas entre os valores ($p \leq 0,05$).

Foi analisada a fertilidade média no período de 50-60 semanas, foi possível observar diferenças entre as taxas de fertilidade, sendo que o lote que foi alimentado com adição de cantaxantina apresentou maiores taxas de fertilidade (tabela 9).

Tabela 9. Fertilidade média analisada em um período, dos ovos de matrizes suplementadas (T1) não suplementadas (T2) com cantaxantina

Período (semanas)	T1	T2	P-valor
50 - 60	91,54 a	88,36 b	0,02*

Letras distintas indicam diferença significativas entre os valores ($p \leq 0,05$).

4. Discussão

As matrizes de corte que receberam cantaxantina em sua dieta apresentaram melhora na eficiência reprodutiva, com melhores taxas de eclosão na idade de 35 a 45 semanas de vida, e maior taxa de fertilidade após 50 semanas de vida, período em que a análise de fertilidade foi possível a ser realizado em um campo. A melhoria nos índices reprodutivos do lote que recebeu cantaxantina, pode ser explicada pelo efeito antioxidante que o aditivo promove, reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides.

A correlação entre fertilidade, eclosão e o número de perfurações na membrana perivitelina, foi encontrada por Christensen et al. ⁽¹³⁾, onde, em seu estudo, linhagens selecionadas para crescimento rápido apresentaram índices inferiores de perfurações espermáticas na membrana perivitelínica, quando comparadas com linhagens selecionadas para produção de ovos. Conseqüentemente, a fertilidade dos ovos e a viabilidade embrionária também foram afetadas negativamente.

Essa correlação entre eclosão, fertilidade e perfurações da membrana perivitelínica pode ser explicada, conforme Robertson et al. ⁽¹⁴⁾, para que os espermatozoides perfurem é necessária uma complexa interação de parâmetros reguladores hormonais e metabólicos, juntamente com fatores como a motilidade espermática, a ligação entre ovócito e espermatozoide, a indução da reação acrossômica e a hidrólise da membrana perivitelínica. Segundo o autor, a técnica de contagem de perfurações espermáticas na membrana perivitelina avalia o resultado da soma de todos os eventos citados acima, o que confere ao teste ampla capacidade de avaliação das taxas de fertilização e eclodibilidade das aves.

Triques et al. ⁽⁵⁾, verificaram em sua pesquisa que o aumento do número de perfurações está diretamente ligado ao número de espermatozoides que conseguem atingir o ovócito no infundíbulo, indicando indiretamente a capacidade reprodutiva dos galos. Ele concluiu, que os resultados sugeriram que a adição de antioxidantes à ração de galos reprodutores resultou em aumento no número de espermatozoides produzidos pelos machos ou que as células depositadas na vagina tiveram melhores condições de sobrevivência no oviduto e conseguiram chegar ao infundíbulo logo após a ovulação.

Em relação ao tempo de vida das aves, observamos que o número médio de PEMP foi menor às 50 semanas, quando comparado aos resultados de 30 e 40 semanas. Ainda assim, constatou-se que o tratamento que recebeu o antioxidante na dieta apresentou menores alterações na compactação da cromatina nas 50 semanas de vida, quando comparado à semana 30 de vida das aves. Isto sugere que a adição do antioxidante foi importante para

a proteção dos efeitos da idade na compactação da cromatina, embora os resultados da perfuração tenham mostrado um declínio.

Com relação aos resultados do desenvolvimento testicular, onde nesta pesquisa, não foram observadas diferenças entre as medidas de diâmetro total e altura do epitélio dos túbulos seminíferos nos diferentes tratamentos, também em sua pesquisa Triques *et al.* ⁽⁵⁾, onde foi avaliado o efeito da suplementação dietética com antioxidantes nas características reprodutivas de machos reprodutores de frangos de corte na fase pós-pico de produção, os autores também não encontraram diferenças no desenvolvimento testicular.

Mcgary *et al.* ⁽¹⁵⁾ afirmaram haver uma correlação positiva entre o peso dos testículos e a produção espermática, e que este pode ser um dos fatores que diferenciam o índice de fertilidade do lote. Da mesma forma, como descrito por Keel e Abney ⁽¹⁶⁾, volumes testiculares alterados, podem significar inibição do desenvolvimento testicular e de todas as suas funções exócrinas e endócrinas. Além disso, Heinlein e Chang ⁽¹⁷⁾ correlacionaram que um epitélio germinativo, responsável pela produção de fluidos luminiais é um pré-requisito essencial para a espermatogênese. No entanto, Yama *et al.* ⁽¹⁸⁾ descreveram que não é inteiramente possível descrever a relação das alterações geométricas tubulares com a produção espermática, uma vez que os dados morfométricos são apenas uma parte da imagem completa, e que outros fatores são claramente importantes, como o número de células espermatogênicas, de Sertoli, e que esses dados sirvam de modelos preliminares para um estudo da capacidade fertilizante como um todo.

González-Morán *et al.* ⁽¹⁹⁾ afirmaram que até as 12 semanas de vida do galo, os túbulos seminíferos dos testículos são formados apenas por uma simples camada de células de Sertoli e espermatogônias, evoluindo, à medida que o animal amadurece, para um epitélio seminífero estratificado e notória redução de tecido intersticial no galo sexualmente maduro. Triques *et al.* ⁽⁵⁾ concluíram que a suplementação antioxidante desde a fase inicial da vida do galo, e não apenas na fase pós-pico como ocorreu em seu experimento, poderia ter algum efeito na morfometria tubular. No presente estudo, os galos começaram a receber o aditivo antioxidante em sua dieta às 22 semanas de idade, o que também pode ter contribuído para esse resultado. Embora não haja diferença estatística na histomorfometria realizada no presente estudo, a altura do epitélio tendeu a ser maior nos animais tratados ($p=0,06$).

Além das alterações morfológicas, a descompactação da cromatina também traz consequências negativas para a fertilidade. Durante a fase de espermatogênese dos mamíferos, a maioria das histonas são substituídas por protamina, esta troca é de grande importância para induzir a condensação da cromatina espermática, mas uma pequena porcentagem de histonas permanece retida no DNA, e defeitos na conversão de histonas em protamina resultam em defeitos na compactação da cromatina ^(20, 21). Sabe-se que em mamíferos a existência de histonas é normal nos espermatozoides, porém pode haver uma permanência maior que a proporção máxima de 15% de histonas na estrutura da cromatina ⁽²²⁾, o que também levaria a uma cromatina mais frouxa, interferindo na fertilidade do macho.

Neste estudo, os resultados de compactação da cromatina espermática indicaram maior grau de descompactação parcial ou total dos galos não suplementados com cantaxantina. Além disso, o lote não suplementado com cantaxantina apresentou menor taxa de eclosão entre 35 e 45 semanas de vida e pior taxa de fertilidade.

Johnson et al. ⁽²³⁾ e Carrel ⁽²⁴⁾ mostraram que as alterações da cromatina espermática não são necessariamente marcadas por danos no DNA, mas podem estar em histonas encontradas em pequenas regiões não protaminadas e que seriam importantes transportadores de informações epigenéticas, necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial. Em situações em que os distúrbios da cromatina dos espermatozoides são graves, a taxa de fertilização é baixa e o desenvolvimento embrionário é prejudicado ⁽²¹⁾. Assim, esta também poderia ser outra explicação para as piores taxas de eclosão e maior grau de descompactação da cromatina dos espermatozoides não suplementados, nesta pesquisa.

Segundo Opuwari e Henkel ⁽¹⁾, os radicais livres podem causar danos à cromatina, variando desde alterações na compactação até alterações graves no DNA. Portanto, o efeito antioxidante da cantaxantina provavelmente também colaborou na proteção da cromatina e não apenas da membrana espermática. Segundo Souza et al. ⁽²⁵⁾, a cantaxantina desempenha papel importante em processos biológicos, como a manutenção da fluidez da membrana por meio de sua ação antioxidante.

Rodrigues et al. ⁽²⁶⁾ observaram maior número de alterações na cromatina em animais mais velhos, com cromatina menos homogênea e menos compactação em comparação com cabeças normais, o que poderia estar influenciando negativamente na fertilidade. Soares e Beletti ⁽²⁷⁾ também observaram que galos velhos (60 semanas) apresentavam mais alterações na compactação da cromatina do que galos jovens.

Rocha Júnior e Baião ⁽²⁸⁾ avaliaram o sêmen de galos jovens (35 semanas) e velhos (68 semanas) e não encontraram diferença significativa nas características físicas espermáticas (motilidade, vigor e turbulência), mostrando que a queda na fertilidade em galos velhos seria causada por outros fatores, como a perda de proteção contra o estresse oxidativo nas fêmeas, por exemplo.

Rosa et al. ⁽²⁹⁾ alimentaram galinhas e galos com 6 ppm de cantaxantina, das 46 a 66 semanas de idade, e encontraram melhora na fertilidade e diminuição na mortalidade embrionária. Contribuindo com esses dados já descritos na literatura, esta pesquisa demonstrou que o uso da cantaxantina na dieta melhora os índices de compactação da cromatina espermática, sugerindo que o aditivo minimiza os efeitos nocivos dos radicais livres sobre os espermatozoides do ejaculado enquanto estes permanecem estocados no túbulos de armazenamento de espermatozoides (TAE) das fêmeas, o que contribui para melhores taxas de perfuração espermática e melhores taxas de eclosão e fertilidade no lote suplementado.

Embora seja encontrado na literatura que no sêmen de galos férteis existe uma pequena quantidade de espermatozoides com baixa compactação da cromatina e alterações morfológicas ⁽³⁰⁾, também se sabe que defeitos morfológicos nos espermatozoides podem

ter sérias implicações nas propriedades hidrodinâmicas destas células, incluindo efeitos negativos nos movimentos retilíneos normais e progressões desiguais, diminuindo as taxas de fertilidade ⁽³¹⁾.

Soares e Beletti ⁽²⁷⁾ comentam que segundo estudos em mamíferos, as alterações da cromatina poderiam não alterar a capacidade do espermatozoide de fecundar o ovócito, ou seja, a taxa de fertilidade poderia estar alterada ou não, mas interfeririam na evolução do embrião, impedindo a formação de blastocistos ou mesmo levando à morte na fase pré-eclosão, tendo assim um impacto direto na taxa de eclosão.

Outros estudos em mamíferos que concluem na mesma direção dos nossos achados são Ellington et al. ⁽³²⁾ e Twigg et al. ⁽³³⁾, que concluíram que alguns espermatozoides com anormalidades na cromatina podem fertilizar ovócitos *in vivo* e *in vitro*, porém os danos no DNA podem permanecer durante todo o período embrionário para induzir a apoptose e posterior fragmentação do embrião, o que pode levar ao aborto espontâneo. Twigg et al. ⁽³³⁾ comentam que, em circunstâncias normais, os danos ao complexo DNA-proteína poderiam ser reparados pelo ovócito, sem maiores consequências.

A provável contribuição das galinhas para a melhoria da fertilidade e das taxas de eclosão deve ser considerada, pois neste estudo as fêmeas também receberam o antioxidante em sua dieta. Segundo Bonagurio et al. ⁽³⁴⁾, a suplementação de cantaxantina e 25-hidroxicoлекаliferol aumentou a expressão de enzimas antioxidantes (GPx-7, SOD1 e catalase) na mucosa vaginal de codornas, propõe efeito positivo na fertilidade, através da proteção dos espermatozoides presentes nas glândulas hospedeiras contra o dano oxidativo, resultando em uma melhora no desempenho reprodutivo.

A ação dos carotenoides dietéticos possui um papel importante na proteção da membrana plasmática dos espermatozoides contra o estresse oxidativo ⁽³⁵⁾. Outro fato importante é a ação pró-vitamina A da cantaxantina. A deficiência de vitamina A afeta o desempenho produtivo dos machos, afetando a espermatogênese, através da incapacidade de proteger as células do tecido reprodutivo e das gônadas contra o estresse oxidativo ⁽³⁶⁾. De acordo com Najafi et al. ⁽³⁷⁾, a cantaxantina reduz a peroxidação lipídica da membrana nos espermatozoides, melhora a motilidade espermática, reduz os agentes do estresse oxidativo, mantém a fluidez e a integridade da membrana, suprimindo a atividade da caspase-3 e aumentando a atividade da superóxido dismutase. A suplementação de espermatozoides humanos congelados com cantaxantina em concentrações de 10 e 25 µM, obtiveram aumento na motilidade progressiva, melhorou a integridade do acrossomo, a morfologia do espermática e a compactação da cromatina após o descongelamento quando comparado ao grupo controle ⁽³⁷⁾.

Rocha et al. ⁽⁶⁾ observaram aumento de vitamina A em gemas de ovos provenientes de lotes tratados com cantaxantina e relacionaram a melhora na fertilidade das matrizes a dois fatores: aumento de vitamina A e proteção antioxidante dos espermatozoides. Rosa et al. ⁽³⁸⁾ nos mostram que altos níveis de carotenoides na dieta de reprodutores atuam na resistência à peroxidação lipídica, e, portanto, a presença desses carotenoides no ovo teria

a ação de auxiliar o desenvolvimento protegendo contra a peroxidação lipídica. Araujo et al. ⁽³⁹⁾ acreditam que o aumento na fertilidade dos ovos de matrizes suplementadas se deve à capacidade da cantaxantina em prevenir a oxidação dos lipídios presentes na gema.

O declínio da eficiência reprodutiva com o aumento da idade das matrizes de corte já é conhecido na literatura. Rocha et al. ⁽⁶⁾, encontraram que independentemente da dieta, a fertilidade foi reduzida em 0,75% por semana de envelhecimento em matrizes de corte entre 50 e 60 semanas de idade. O efeito negativo da idade sobre a fertilidade poderia ser explicado pela maior suscetibilidade dos espermatozoides de galos velhos aos danos oxidativos, o que, nesta pesquisa, foi compensada pela adição de cantaxantina à dieta, devido aos melhores resultados obtidos pelos reprodutores que recebam o antioxidante. Matrizes de corte com 54 semanas de idade suplementadas com cantaxantina tiveram uma taxa de eclosão aumentada quando comparadas com matrizes não suplementadas ⁽³⁸⁾.

Sobre a capacidade de neutralizar radicais livres em relação à idade, Weir e Robaire ⁽⁴⁰⁾ compararam a atividade enzimática antioxidante dos espermatozoides e a produção de radicais livres na maturação dos espermatozoides em ratos velhos e jovens e observaram diminuição da capacidade antioxidante associada com o aumento da produção de radicais livres com o envelhecimento dos animais. Os autores concluíram que a queda na qualidade espermática de animais mais velhos está associada ao aumento da suscetibilidade dos espermatozoides ao dano oxidativo.

Quanto à redução da fertilidade devido a fatores relacionados às galinhas, pode ter ocorrido uma redução na eficiência do mecanismo antioxidante de ação do TAE sobre os espermatozoides armazenados no oviduto, com o avanço da idade ⁽⁴¹⁾, o que teria sido compensado pela adição de cantaxantina na dieta das fêmeas.

O declínio “natural” na duração da fertilidade com a idade, observado nesta pesquisa, também pode estar associado a uma maior facilidade na liberação de espermatozoides no TAE das galinhas, reduzindo o número de espermatozoides capazes de realizar a fertilização do ovócito ⁽⁴²⁾. Quanto à fertilidade, no que diz respeito aos fatores relacionados às galinhas, a adição de cantaxantina também para as fêmeas pode ter contribuído para a melhoria da eficiência dos mecanismos antioxidantes de ação do TAE sobre os espermatozoides armazenados no oviduto, com o avançar da idade ^(4,41). Matrizes de corte suplementadas com cantaxantina e 25-hidroxicoлекаliferol em sua dieta tiveram resultados mais elevados para produção de ovos, fertilidade, eclodibilidade total e eclodibilidade de ovos férteis, e tiveram resultados mais baixos para mortalidade embrionária precoce quando comparados a matrizes sem suplementação ⁽³⁹⁾.

Portanto, além dos machos, também seria importante suplementar as fêmeas durante a fase reprodutiva, devido ao seu papel na condução e preparação dos espermatozoides até o local de fertilização. Segundo Gumulka e Kapkowska ⁽⁴³⁾, a duração da fertilidade está mais relacionada à fêmea, devido a uma possível perda na capacidade de armazenamento dos

túbulos de estocagem seminal. Eles observaram que as taxas de fertilidade diminuíram com o aumento da idade das fêmeas, mesmo quando estas foram inseminadas com sêmen de galos mais jovens.

Vários autores propõem que para que os espermatozoides sobrevivam dentro do TAE das aves e mantenham sua capacidade de fertilização, eles necessitam de uma contribuição desta estrutura feminina, que tem, sugerida por seus estudos, como funções primárias de ser fonte de substratos para o metabolismo dos espermatozoides residentes; sendo fonte de macromoléculas que alteram a função de fertilização e proporcionando proteção contra o estresse oxidativo ⁽⁴⁴⁾.

Os efeitos da utilização da cantaxantina como aditivo antioxidante em dietas já foram descritos na literatura por outros autores, demonstrando o grande interesse do mercado de matrizes de corte por esse aditivo, por estar disponível comercialmente. Triques et al. ⁽⁵⁾ constataram que a suplementação com antioxidantes (cantaxantina e vitamina D) pode influenciar positivamente a taxa de fertilidade no lote de matrizes de corte. E concluíram que os ovos provenientes de galpões onde os galos foram suplementados com blend de antioxidantes apresentaram maior quantidade de perfurações espermáticas na membrana perivitelina, indicando a possibilidade de ganhos de fertilidade com o uso desses aditivos, resultando em maior eclodibilidade.

Bisht et al. ⁽³⁾ e Bansal e Bilaspuri ⁽³⁵⁾ destacaram os antioxidantes dietéticos na redução do estresse oxidativo dos espermatozoides, consistindo de vitaminas C, E, beta-carotenos, carotenoides e flavonoides. Rocha et al. ⁽⁶⁾, em seu estudo, constataram que a cantaxantina está incluída no grupo dos carotenoides e, adicionada à dieta de matrizes de corte, pode desempenhar seu papel antioxidante de três maneiras: 1) no embrião – protegendo os tecidos embrionários durante a incubação, 2) no ovo – protegendo os nutrientes da gema durante o armazenamento para o embrião em desenvolvimento e, 3) nas matrizes pesadas – apoiando os mecanismos antioxidantes do sêmen e do oviduto e reduzindo o estresse oxidativo dos espermatozoides.

Segundo Rosa et al. ⁽³⁸⁾, os altos níveis de cantaxantina presentes na dieta e absorvidos pelas matrizes são transferidos para a gema do ovo, o que leva a aumentos nos níveis de carotenoides no embrião em desenvolvimento, e os altos níveis de carotenoides permanecem presentes nos pintinhos durante ao longo da primeira semana após a eclosão. Além disso, o aumento na concentração de cantaxantina presente na gema do ovo está correlacionado com o aumento da resistência ao estresse oxidativo. Segundo Duarte et al. ⁽²⁾, a inclusão de Cantaxantina e 25-hidroxicoлекаliferol na dieta reduziu a mortalidade embrionária e aumentou a porcentagem de eclosão e o número de pintinhos viáveis produzidos pelas aves.

5. Conclusão

A adição de cantaxantina na dieta de matrizes de corte melhora as taxas de fertilização e eclosão dos ovos e a fertilidade dos galos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Contribuições do autor

Conceituação: Lucca, E.C.L e Beletti, M.E. *Análise formal*: Lucca, E.C.L e Beletti, M.E. *Aquisição de financiamento*: Beletti, M.E. *Investigação*: Lucca, E.C.L e Teixeira, P.A. *Metodologia*: Lucca, E.C.L e Beletti, M.E. *Recursos*: Beletti, M.E. *Validação*: Lucca, E.C.L; Teixeira, P.A; Beletti, M.E e Silva, M.V. *Visualização*: Lucca, E.C.L. *Redação (esboço original)*: Lucca, E.C.L; Teixeira, P.A; Beletti, M.E e Silva, M.V. *Redação (revisão e edição)*: Lucca, E.C.L; Teixeira, P.A; Beletti, M. E e Silva, M.V.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o financiamento para a realização deste estudo fornecido pelas agências brasileiras CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil), Código Financeiro 001, e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil).

Referências

1. Opuwari CS, Henkel RR. An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. *BioMed Research International*, v.2016, p.1-11, 2016. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/9540142>.
2. Duarte V, Minafra CS, Santos FR, Perim FS. Inclusion of canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol in the diet of broiler breeders on performance and incubation parameters. *Ciência Rural*. 2015; 45(11):2050-2055. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140564>.
3. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2017; 14(8):470-485. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
4. Bakst MR, Bauchan G. Apical blebs on sperm storage tubule epithelial cell microvilli: Their release and interaction with resident sperm in the turkey hen oviduct. *Theriogenology*. 2015; 83(9):1438-1444. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.016>.
5. Triques GE, Schmidt JM, Oro CS, Bordignon HF, Donin DG, Fernandes JIM. Effect of dietary antioxidant supplementation on reproductive characteristics of male broiler breeders during the post-peak production phase. *Semina: Ciências Agrárias*. 2016; 37(4):2557-2566. Available from: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n4Sup1p2557>
6. Rocha JSR, Barbosa VM, Lara LJC, Baião NC, Cançado SV, Lana AMQ, Pompeu MA, Vasconcelos RJC, Machado ALC, Miranda DJA, Fernandes MNS, Mendes PMM. Efeito do armazenamento e da cantaxantina dietética sobre a qualidade do ovo fértil e o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2013; 65(3):792-800. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000300027>.
7. Bramwell RK, Howarth Bjr. Preferential attachment of cock spermatozoa to the perivitelline layer directly over the germinal disc of the hen's ovum. *Biology Reproduction*. 1992; 47(6):1113-1117. Available from: <https://doi.org/10.1095/biolreprod47.6.1113>.
8. Donoghue AM. The effect of twenty-four hour in vitro storage on sperm hydrolysis through the perivitelline layer of ovipositioned turkey eggs. *Poultry Science*. 1996; 75(8):1035-1038. Available from: <https://doi.org/10.3382/ps.0751035>.
9. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 1st ed. São Paulo: Editora Manole, 2003. 341p. Portuguese.
10. Burrows WH, Quinn JP. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*. 1937; 16(1):19-24. Available from: <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>.

11. Pantos K, Sfakianoudis K, Maziotis E, Rapani A, Karantzali E, Gounari-Papaioannou A, Vaxevanoglou T, Koutsilieris M, Simopoulou M. Abnormal fertilization in ICSI and its association with abnormal semen parameters: a retrospective observational study on 1855 cases. *Asian Journal of Andrology*. 2021; 23(4):376-385. Available from: https://doi.org/10.4103/aja.aja_84_20.
12. Rumel D. "Odds ratio": algumas considerações. *Revista Saúde Pública*. 1986; 20(3):253-258. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300011>.
13. Christensen VL, Fairchild BD, Ort DT, Nestor KE. Dam and sire effects on sperm penetration of the perivitelline layer and resulting fecundity of different lines of turkeys. *Journal Applied of Poultry Research*. 2005; 14(3):483-491. Available from: <https://doi.org/10.1093/japr/14.3.483>.
14. Robertson L, Brown HL, Staines HJ, Wishart GJ. Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1997; 110(2):205-211, 1997. Available from: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100205>.
15. McGary S, Estevez I, Bakst MR, Pollock DL. Phenotypic traits as reliable indicators of fertility in male broiler breeders. *Poultry Science*. 2002; 81(1):102-111, 2002. Available from: <https://doi.org/10.1093/ps/81.1.102>.
16. Keel BA, Abney TO. Influence of bilateral cryptorchidism in the mature rat: Alterations in testicular function and serum hormone levels. *Endocrinology*. 1980; 107(4):1226-1233. Available from: <https://doi.org/10.1210/endo-107-4-1226>.
17. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine Reviews*. 2002; 23(2):175-200. Available from: <https://doi.org/10.1210/edrv.23.2.0460>.
18. Yama OE, Duru FI, Oremosu AA, Noronha CC, Abayomi O. Stereological evaluation of the effects of *Momordica charantia*, antioxidants and testosterone on seminiferous tubules of rat. *International Journal of Morphology*. 2011; 29(3):1062-1068. Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022011000300068>.
19. González-Morán MG, Guerra-Araiza C, Campos MG, Camacho-Arroyo I. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature and aged chickens. *Domestic Animal Endocrinology*. 2008; 35(4):371- 379. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2008.08.001>.
20. Yoshida K, Muratani M, Araki H, Miura F, Suzuki T, Dohmae N, Katou Y, Shirahige K, Ito T, Ishii S. Mapping of histone-binding site in histone replacement-completed spermatozoa. *Nature Communications*. 2018; 9(1):3885. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06243-9>.
21. Colaco S, Sakkas D. Paternal factors contributing to embryo quality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018; 35(11):1953-1968. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1304-4>.
22. Beletti ME. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2013; 37(2):92-96. Available from: [http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20\(RB465\).pdf](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20(RB465).pdf).
23. Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*. 2011; 141(1):21-36. Available from: <https://doi.org/10.1530/REP-10-0322>.
24. Carrel DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertility and Sterility*. 2012; 97(2):267-274. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>.
25. Souza HM, Arruda LCP, Monteiro MM, Nery IHAV, Araújo Silva RAJ, Batista AM, Guerra MMP. The effect of canthaxanthin on the quality of frozen ram spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*. 2017; 15(3):220-227. Available from: <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0049>.
26. Rodrigues ACN, Rocha JV, Beletti ME. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2009; 61(6):1302-1307. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000600008>.

27. Soares JM, Beletti ME. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada de duas idades. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2006a; 42(4):543-553. Available from: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26471>.
28. Rocha Júnior JM, Baião NC. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001; 53(6):683-685. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000600012>.
29. Rosa AP, Scher A, Sorbara JO, Boemo LS, Forgiarini J, Londero A. Effects of canthaxanthin on the productive and productive and reproductive performance of broiler breeders. *Poultry Science*. 2012; 91(3):660-666. Available from: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01582>.
30. Soares JM, Beletti ME. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozóides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2006b; 43(4):554-560. Available from: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26472>.
31. Beletti ME, Costa LF, Guardieiro MM. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Brazilian Journal Morphology Science*. 2005; 22(2):85-90. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/252360754>.
32. Ellington JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA, Broder SJ, Wright RW Jr. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertility and Sterility*. 1998; 69(4):643- 649. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00023-5).
33. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. 1998; 13(7):1864-1871. Available from: <https://doi.org/10.1093/humrep/13.7.1864>.
34. Bonagurio LP, Cruz FK, Kaneko IN, Matumoto-Pinto PT, Murakami AE, Santos TC. Dietary supplementation with canthaxanthin and 25-hydroxycholecalciferol has beneficial effects on bone and oxidative metabolism in European quail breeders. *Poultry Science*. 2020; 99(10):4874-4883. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.021>.
35. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. 2010; 2011:686137. Available from: <https://doi.org/10.4061/2011/686137>.
36. Vanderhout SM, Rastegar Panah M, Garcia-Bailo B, Grace-Farfaglia P, Samsel K, Dockray J, Jarvi K, El-Soheemy A. Nutrition, genetic variation and male fertility. *Translational Andrology and Urology*. 2021; 10(3):1410-1431. Available from: <https://doi.org/10.21037/tau-20-592>.
37. Najafi L, Halvaei I, Movahedin M. Canthaxanthin protects human sperm parameters during cryopreservation. *Andrologia*. 2019; 51(10):e13389. Available from: <https://doi.org/10.1111/and.13389>.
38. Rosa AP, Bonilla CE, Londero A, Giacomini CB, Orso C, Fernandes MO, Moura JS, Hermes R. Effect of broiler breeders fed with corn or sorghum and canthaxanthin on lipid peroxidation, fatty acid profile of hatching eggs, and offspring performance. *Poultry Science*. 2017; 96(3):647-658. Available from: <https://doi.org/10.3382/ps/pew294>.
39. Araujo LF, Araujo CSS, Pereira RJG, Bittencourt LC, Silva CC, Cisneros F, Hermes RG, Sartore YGA, Dias MT. The dietary supplementation of canthaxanthin in combination with 25OHD3 results in reproductive, performance, and progeny quality gains in broiler breeders. *Poultry Science*. 2019; 98(11):5801-5808. Available from: <https://doi.org/10.3382/ps/pez377>.
40. Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. *Journal of Andrology*. 2007; 28(2):229-240. Available from: <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.001362>.
41. Rutz F, Anciuti MA, Pan EA. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. In: Macari M, Mendes AA. 1st ed. *Manejo de matrizes de corte*, Campinas: FACTA, 2005. pp. 76-143. Portuguese.

42. Rutz F, Anciuti MA, Xavier EG, Roll VFB, Rossi P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2007; 31(3):307-317. Available from: <http://cabra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/307.pdf>.
43. Gumułka M, Kapkowska E. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of the perivitelline layer of the ovum. *Animal Reproduction Science*. 2005; 90(1-2):135-148. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.018>.
44. Bakst, M.R. Role of the oviduct in maintaining sustaines fertility in hens. *Journal Animal Science*. 2011; 89(5):1323