UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós Graduação em Zootecnia

Departamento de Zootecnia

Dissertação

Efeito de micotoxinas sobre características associadas ao desempenho reprodutivo de galos

Hanna Graziela Soares Lima

Pelotas, 2018

Hanna Graziela Soares Lima

Efeito de micotoxinas sobre características associadas ao desempenho reprodutivo de galos

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Produção Animal Reprodução de Aves.

Orientadora: Denise Calisto Bongalhardo

Co-orientador: Eduardo Micotti da Glória

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L732e Lima, Hanna Graziela Soares

Efeito de micotoxinas sobre características associadas ao desempenho reprodutivo de galos / Hanna Graziela Soares Lima ; Denise Calisto Bongalhardo, orientadora ; Eduardo Micotti da Glória, coorientador. — Pelotas, 2018.

41 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Sêmen. 2. Fumonisina. 3. zearalenona. 4. Deoxinivalenol. 5. Aflatoxinas. I. Bongalhardo, Denise Calisto, orient. II. Glória, Eduardo Micotti da, coorient. III. Título.

CDD : 636.5

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Hanna Graziela Soares Lima

Efeito de micotoxinas sobre características associadas ao desempenho reprodutivo de galos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do título de grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/02/2018

Banca examinadora:

_____

Prof ª Orientadora PhD Denise Calisto Bongalhardo

_____

Prof° Doutor Victor Fernando Roll

_____

Doutora Beatriz Simões Valente

_____

Prof° Doutor Paulo Roberto Dallmann

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelo acolhimento e ensino proporcionado.

À minha professora orientadora Denise Bongalhardo, pela paciência e conhecimento transmitido.

Ao professor Eduardo Micotti da Glória, por ter acreditado neste trabalho.

Ao professor Fernando Rutz, por todo conhecimento e conselhos ofertados.

Aos colaboradores do Laboratório de Biotécnicas em Reprodução de Aves, Flávia Milech, Júlia Castro, Bolivar Hences e Igor Alves, pela contribuição, comprometimento e disponibilidade durante o período experimental.

Ao Biotério Central e seus funcionários; Danúbio, Leandro e Seu Florisbaldo, por toda ajuda.

Às minhas colegas de apartamento; Taiani Toledo, Camila Macari e Maria Macari, pela amizade, parceria, companheirismo, conversas e risadas durante estes quase dois anos.

À todos meus colegas e amigos, que fizeram parte desta jornada .

À toda minha família, aos meus irmãos, Pablo Camilo e Claube Camile e minha sobrinha Caroline Reis, pela paciência, amizade, companheirismo e carinho.

À minha mãe, Claudete Soares, dedico este trabalho integralmente à ti, por sempre ter acreditado em mim, ter me apoiado em todas etapas da minha vida e por ser meu exemplo de perseverança, alegria, caridade, honestidade e amor. Sem você, eu não teria conseguido chegar até aqui. Te amo!

Resumo

LIMA, H.G.S. **Efeito de micotoxinas sobre características associadas ao desempenho reprodutivo de galos**. 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho reprodutivo de galos submetidos à dieta contendo micotoxinas e seus possíveis efeitos no desempenho reprodutivo dos galos. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com dois tratamentos e dezoito repetições. Foram utilizados 36 galos da raça Rhode Island Red, com 57 semanas de idade, alojados em boxes individuais com dimensões de 70x70x70 cm, equipados com comedouro tipo calha e bebedouros tipo *nipple*. Os animais receberam água *add libitum* e foram alimentados com uma ração comercial.Os tratamentos consistiram em duas dietas experimentais: T1 – dieta basal sem adição de micotoxinas; T2– dieta basal com adição de micotoxinas (Fumonisina 10 ppm, zearalenona 300 ppb, deoxinivalenol 700 ppb) e aflatoxinas 25 ppb. Os resultados foram avaliados através da análise de variância para dados normais e os dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. As variáveis analisadas foram: volume seminal, motilidade espermática, concentração espermática, vigor espermático, morfologia espermática, biometria dos testículos e peso de fígado. Encontrou-se diferença estatística ($P<0,05$) para as variáveis total de espermatozoides normais e anormais, as demais não diferiram estatisticamente ($P>0,05$).

Palavras-chave; sêmen, fumonisina, zearalenona, deoxinivalenol, aflatoxinas.

Abstract

LIMA, H.S.G. **Effect of mycotoxins on characteristics associated with the reproductive performance of roosters**.2018. 45f. Dissertation (Master's Degree) - Postgraduate Program in Zootechny. Federal University of Pelotas, Pelotas / RS.

The objective of this study was to evaluate the reproductive performance of roosters submitted to the diet containing mycotoxins and their possible effects on the reproductive performance of roosters. A total of 36 Rhode Island Red cocks with 57 weeks of age were housed in individual boxes with dimensions of 70x70x70 cm, equipped with chute type feeder and nipple type drinkers. The animals received water *add libitum* and were fed a commercial food. The experimental design was completely randomized, with two treatments and eighteen replicates. The treatments consisted of two experimental diets: T1 - basal diet without addition of mycotoxins; T2- basal diet with addition of mycotoxins (Fumonisin 10 ppm, zearalenone 300 ppb, deoxynivalenol 700 ppb) and 25 ppb aflatoxins. The results were evaluated through analysis of variance for normal data and data without normal distribution were analyzed by the Kruskal-Wallis test for non-parametric data. The variables analyzed were: seminal volume, sperm motility, sperm concentration, sperm vigor, sperm morphology, biometry of the testicles and liver weight. There was a statistical difference ($P < 0.05$) for the variables total normal and abnormal spermatozoa, the other variables did not differ statistically ($P > 0.05$).

Keywords: semen; fumonisin, zearalenone, deoxynivalenol, aflatoxins.

Lista de Figuras

Figura 1 Setor de aves do Biotério Central.....19

Figura 2 Local de alojamento dos animais.....20

Figura 3 Massagem dorso abdominal.....22

Lista de tabelas

Tabela 1 Composição nutricional das dietas experimentais..... 20

Tabela 2 Número de animais (N), média, erro padrão (SE), valor mínimo e máximo e valor de P para Volume Seminal (mL), Motilidade espermática (%), Concentração Espermática (bilhões/mL) e Vigor Espermático (escore 0-5) de galos alimentados com dieta basal (T1) e dieta basal mais adição de micotoxinas (T2)..... 25

Tabela 3 Número de animais, média, erro padrão, e valor de P para Defeito de Cabeça, Defeito de Cauda, Total de Normais e Total de Anormais de espermatozoides (%) de galos alimentados com dieta basal (T1) e dieta basal mais adição de micotoxinas (T2)..... 26

Tabela 4 Número de animais (N), média, erro padrão (SE), valor mínimo e máximo e valor de P para comprimento do testículo esquerdo e direito (cm), largura de testículo esquerdo e direito (cm), peso de testículo esquerdo e direito (g), peso relativo dos testículos esquerdo e direito (%) e peso relativo de testículo esquerdo mais testículo direito ao peso dos animais (%), de galos alimentados sem e com adição de micotoxinas na dieta..... 29

Tabela 5 Número de animais, média, erro padrão, valor mínimo e máximo e valor de P para peso de Fígado (g) de galos alimentados sem e com adição de micotoxinas na dieta..... 30

Sumário

1. Introdução 11
2. Revisão Bibliográfica 13
2.1. Micotoxinas 13
2.2. Micotoxinas e seus efeitos nas aves 15
2.3. Desempenho reprodutivo de galos e avaliação através das técnicas laboratoriais 16
3. Material e Métodos 18
3.1. Local e período experimental 19
3.2. Animais experimentais, instalações e manejo 19
3.3. Delineamento experimental e tratamentos 22
3.4. Coleta de dados 22
3.5. Análise estatística 24
4. Resultados e Discussão 24
4.1. Volume seminal, Motilidade, Concentração e Vigor espermático 24
4.2. Morfologia espermática 25
4.3. Biometria dos testículos 27
4.4. Peso de fígado 30
5. Conclusão 31
6. Referências 32

1. Introdução

A palavra micotoxina é originada da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxican” que significa toxinas, ou seja, micotoxinas são toxinas produzidas pelo metabolismo secundário de fungos e podem causar micotoxicoses, tanto em humanos quanto em animais. Os fungos se proliferam naturalmente em plantas, principalmente em leguminosas devido aos seus altos valores energéticos e em culturas de clima tropical, onde a temperatura e umidade são propícias para o seu desenvolvimento.

A presença de micotoxinas nos grãos é afetada por fatores biológicos das plantas, tais como a susceptibilidade e compatibilidade toxicogênicas dos fungos, fatores ambientais como temperatura, umidade e gênero de fungos presentes no desenvolvimento das culturas, bem como injúrias mecânicas, temperatura e umidade dos grãos no ato da colheita e na estocagem dos grãos.

Micotoxinas são comumente encontradas em sorgo, trigo, soja e milho, grãos estes largamente utilizados em fabricação de rações para animais de produção. Mais de quinhentos tipos de micotoxinas são conhecidas, dentre elas as fumonisinas, aflatoxinas, zearalenona e deoxinevalenol. O milho representa 70% da composição das rações utilizadas para aves e, com a ingestão de micotoxinas, estes animais podem apresentar baixo desempenho de produtividade.

A gravidade com que estas micotoxinas podem afetar as aves depende do estado nutricional, idade, sexo, categoria, raça, genética e susceptibilidade de cada animal, bem como grau de toxidade e tempo de exposição às toxinas. As micotoxicoses em aves são caracterizadas por redução de peso, consumo, conversão alimentar, produção de ovos, reprodutividade e imunodepressão; no entanto, ainda pouco se sabe sobre como as micotoxinas podem afetar a qualidade de sêmen e desempenho de machos reprodutores.

Os machos reprodutores são muito importantes na indústria avícola, pois, representam 10% dos lotes e contribuem com 50% da genética transmitidas as progênies. Um bom reprodutor pode aumentar o número de

pintos produzidos por fêmeas, assim como melhorar o desempenho e qualidade dos seus descendentes.

Tradicionalmente a seleção dos reprodutores se faz através de características fenotípicas, como escore de peito, coloração de crista, barbela e patas. Contudo, as características reprodutivas também podem ser avaliadas através de técnicas laboratoriais para análise de volume seminal, motilidade, concentração, vigor e morfolologia espermática, sendo mais precisas no que se refere à qualidade de sêmen.

Tendo em vista a importância de galos reprodutores na indústria de aves e a incidência de micotoxicoses em aves, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos das micotoxinas nas características associadas ao desempenho reprodutivo de galos semi-pesados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Micotoxinas

O estudo das micotoxinas, conhecido como micotoxicologia, iniciou-se em 1960 numa fazenda na Inglaterra; alguns surtos relatados incluem a aleuquia alimentária tóxica (ATA), que matou cerca de 100.000 russos entre 1942 e 1948 (Joffe, 1978); a stachybotryotoxicose, que matou milhares de cavalos, também na Rússia, em 1930 (Moreau, 1979), e a aflatoxicose que matou 100.000 perus jovens no Reino Unido, em 1960, sendo também responsabilizada pela morte de outros animais e até, provavelmente, de humanos (Hocking, 1986), no entanto o caso mais conhecido é o do ergotismo, que foi responsável pela morte de milhares de pessoas na Europa, no milênio passado (MATOSSIAN, 1981).

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas são necessárias condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox (PEREIRA et al., 2002). A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (DINIZ, 2002).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de toxina. Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas ou com doenças, principalmente imunossupressoras (HUSSEIN & BRASSEL, 2001).

A presença de micotoxinas em grãos e rações, cujo tipo ou estrutura química depende do desenvolvimento de linhagens fúngicas específicas, está sujeita à influência de fatores ambientais como umidade do substrato e temperatura ambiente. Portanto, a contaminação de rações e outros alimentos por micotoxinas pode variar de acordo com as condições ambientais, métodos de processamento ou produção e armazenamento. Vai também depender do tipo alimento, já que alguns grãos são substratos mais aptos que outros para o crescimento de determinados fungos (SANTURIO, 2000).

As aflatoxinas são produzidas pelos fungos Aspergillus flavus e A. parasiticus (LEESON et al., 1995), os quais apresentam elevada toxicidade para várias espécies de animais domésticos, com efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, sobretudo no fígado (OSWEILER, 1990). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as principais fontes de aflatoxinas na ração animal são o milho, caroço de algodão e torta de amendoim (WHO, 2002). Em aves, as aflatoxinas causam danos ao fígado, prejuízo na produtividade e eficiência reprodutiva, decréscimo na produção de ovos, qualidade inferior da casca do ovo, qualidade da carcaça inferior e aumento na susceptibilidade às doenças (IAMANAKA et al, 2010).

A zearalenona é produzida principalmente por *Fusarium graminearum*, sobretudo em trigo e milho, mas também em sorgo, cevada e rações animais. Esta micotoxina e seus derivados têm efeitos estrogênicos em várias espécies animais causando infertilidade, edema vulvar, prolapso vaginal e hipertrofia mamária em fêmeas e feminização de machos, atrofia testicular e aumento de tamanho das glândulas mamárias (PERAICA et al., 2000).

A fumonisina é produzida pelas cepas de *Fusarium moliniforme*, encontrada principalmente em milho, podendo ser fatal para alguns animais, como os equinos, nos quais causa a leucoencefalomálacia, que se caracteriza pela formação de cavitações na substância branca do cérebro (Iamanaka et al., 2010), acompanhada de amolecimento da mesma, resultando em morte. As fumonisinas têm sido encontradas como um contaminante comum de alimentos e rações à base de milho nos EUA, China, Europa, África do Sul e América do Sul (MILLER, 1995).

O desoxinivalenol é um tricoteceno do tipo B, um epoxi–sesquiterpenoide, comum em grãos como trigo, cevada, aveia, centeio, milho e sorgo e sua ocorrência está associada primariamente com *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) e *F. culmorum*. Provavelmente o desoxinivalenol é a micotoxina mais largamente distribuída em alimentos e rações (MILLER, 1995). Esta micotoxina raramente causa uma toxicidade aguda porque a sua presença na ração faz o animal rejeitar a ração, as aves são mais tolerantes do que os suínos quanto à sua presença na dieta, embora a qualidade do ovo e o peso possam ser reduzidos (IAMANAKA et al, 2010).

2.2. Micotoxinas e seus efeitos nas aves

A dieta das aves de produção é basicamente composta por milho e farelo de soja; estes cereais são altamente susceptíveis à contaminação por micotoxinas, as quais podem provocar a morte em intoxicações agudas, ou determinar alterações que afetam diretamente a produção animal, como redução do peso, conversão alimentar, reprodutividade e aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias (CORRIER, 1991; CRUZ, 1995).

Segundo Santurio (2000), níveis de zearalenona normalmente encontrados em rações comerciais não demonstram alterações no consumo alimentar, ganho de peso, produção ou qualidade de ovos, nem nos parâmetros hematológicos e bioquímicos e do sangue, aspecto micro e macroscópico dos tecidos e no comportamento das aves. Com concentrações de zearalenona elevadas ou toxicoses induzidas em perus machos, os sinais clínicos não foram específicos, mas incluíram redução na conversão alimentar, pequena alteração no peso dos órgãos, redução na fertilidade e mudança no comportamento das aves (MERONUCK *et al.,* 1970). Com exceção de níveis extremamente altos de contaminação, as aves não são afetadas pela ingestão de zearalenona, mas existem indícios de que perus são levemente mais sensíveis que poedeiras e frangos de corte (CHI *et al.,* 1980; Estudos realizados no Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (LAMIC) mostraram que, em 47,1% das 169 amostras de milho, foi detectada fumonisina B1, sendo a concentração média de 8,4 ppm (DILKIN, 1998). Quando ingeridas, as fumonisinas apresentam baixa biodisponibilidade, sendo rapidamente metabolizadas e excretadas (NORRED et al, 1998). As fumonisinas podem induzir degeneração hepatocelular, alterações no sistema imune, inibição metabólica em vários tecidos e efeitos deletérios sobre a morfologia intestinal em animais de produção (DILKIN et al, 2007). A fumonisina B1 pode contribuir para o aparecimento de petéquias, aumentando o tempo de coagulação sangüínea e diminuindo a concentração de albumina sérica em aves (ESPADA *et al.,*1997).

As aflatoxinas são extremamente tóxicas para as aves, uma das causas se deve a sua rápida absorção pelo trato gastrointestinal, que é evidenciada através do aparecimento imediatamente na corrente sanguínea após a ingestão da micotoxina (WYATT, 1991). A primeira mudança nas aves é alteração no tamanho dos órgãos internos, ocorrendo aumento de tamanho no fígado, baço e rins, enquanto a bursa e timo estão diminuídos; somando-se à alterações de tamanho ocorrem alterações na coloração e textura dos órgãos (SANTURIO, 2000).

Segundo Vieira (1995), além de reduzir a produção de ovos, a aflatoxicose também é responsável pela redução do tamanho dos ovos, bem como pela redução proporcional no tamanho das gemas, devido aos prejuízos causados na síntese protéica e lipídica. De maneira geral, os principais sinais clínicos verificados em animais intoxicados por aflatoxinas são anorexia, redução no desempenho, diminuição na produção de ovos, hemorragias, má qualidade das carcaças, embriotoxidade e teratógena (HYGINO DA CRUZ, 1996; MOREIRA, 2000).

O desoxinivalenol raramente causa uma toxicidade aguda porque a sua presença na ração faz o animal rejeitá-la, a toxicose aguda é manifestada como uma desordem intestinal. As aves são capazes de tolerar concentrações relativamente altas de deoxinivalenol, no entanto, a intoxicação pode causar uma redução transitória nos níveis de hemoglobina e um levíssimo efeito na qualidade dos ovos, não havendo evidência significativa de que esta toxina afete o rendimento das aves (MALMANN et al, 2007).

2.3. Desempenho reprodutivo de galos e avaliação através das técnicas laboratoriais

A seleção de reprodutores capazes de transmitir características de valor econômico para a progênie é fundamental para o sucesso da indústria de aves. Mesmo que a proporção dos machos represente apenas 10% em relação à das fêmeas, os machos contribuem com 50% da carga genética do plantel e são fundamentais para a fertilização do ovo. Bongalhardo et al. (1994), encontraram correlações positivas entre características seminais de galos e

fertilidade dos ovos. Assim, a avaliação da fertilidade de cada reprodutor é de extrema relevância, sendo necessários métodos precisos e de baixo custo (SOARES; BELETTI, 2003).

Na indústria avícola, tradicionalmente a seleção dos galos não é feita através de características reprodutivas dos machos, e sim através da avaliação do tamanho da crista e da barbela, da cor, do peso corporal e do comprimento e aspecto das patas (WILSON *et al*., 1979). Entretanto, é importante enfatizar que as características físicas não apresentam uma correlação exata com a fertilidade do macho. Já no sêmen, existe um número de características vitais que um reprodutor deve possuir para ser bem sucedido. A fertilização requer o sêmen de qualidade suficiente para que o espermatozoide possa alcançar e penetrar o ovo (McDANIEL, 2001).

Os procedimentos tradicionalmente utilizados para a avaliação da qualidade espermática incluem a determinação do volume do ejaculado, aspecto (coloração), concentração, motilidade, viabilidade e morfologia celular (DONOGHUE & WISHART, 2000), sendo correlacionados com a capacidade fertilizante do espermatozoide. As características seminais, tais como volume seminal, concentração espermática e motilidade espermática são influenciadas pela idade do galo, aumentando nas primeiras semanas reprodutivas até alcançar a maturidade sexual completa, e diminuindo após um período de pico de produção (CEROLINI,1997).

A avaliação do volume seminal pode ser feita utilizando-se tubos *Falcon* de 15 mL, com graduação de 0,1 mL. Segundo Moraes (2002), o volume de sêmen de galos varia de 0,5 a 1,0 mL. No entanto, Resende et al.(1983), revisando dados de diferentes autores, verificaram grande variação quanto ao volume de ejaculado para galos, os mesmos afirmaram que as variações encontradas ocorrem devido ao tipo, linhagem, idade do reprodutor, fatores climáticos, regime alimentar, frequência e tecnologia de coleta.

A concentração espermática pode ser avaliada através de espectofotometria de transmitância, resultando em bilhões de espermatozoides por mililitro de sêmen (bilhões/mL). De acordo com Moraes (2002), a concentração espermática média dos galos é de 3,5 bilhões por mL, contrastando com Bakst & Bahr (1995) que afirmam que galos ejaculam em média 0,25 ml, com cerca de 5 bilhões de espermatozoides por mL.

Garner & Hafez (2004), afirma que a proporção média de espermatozoides normais encontrada em galos é de 85% a 90%. Em perus, uma taxa de 80% de formas normais garante uma boa fertilização, enquanto que valores menores podem resultar em redução na fertilidade em até 8% (SURAI & WISHART, 1996). Esta avaliação de proporção de espermatozoides normais pode ser feita através da morfologia espermática com a técnica de esfregaço e coloração com eosina-nigrosina, possibilitando a visualização pela microscopia óptica de porções danificadas nas células. A morfologia espermática pode variar entre raças ou linhagens. Alkan et al. (2002), verificaram maior número de alterações em galos New Hampshire em comparação com galos Leghorn.

O vigor espermático é classificado através de escore de 0 a 5, como sugere Celeghini et al (2001), sendo o escore 0 equivalente a imobilidade total do espermatozoide, e o 5 à movimentação intensa, vigorosa, progressiva e com formação de ondas. Assim como a motilidade espermática, o vigor também é um importante fator na avaliação do sêmen. Segundo Celeghini et al. (2000), existe correlação entre as medidas de motilidade e vigor espermáticos em amostras de sêmen de galos da linhagem AgRoss.

A motilidade é um dos testes utilizados para avaliar a qualidade do sêmen e tem sido considerada como um bom indicador da viabilidade espermática em geral, pois espermatozoides que não apresentam motilidade não alcançam as glândulas hospedeiras (ALLEN e GRIGG, 1957). Porém, a motilidade não deve ser reconhecida como apenas um dos fatores para a estimativa de fertilidade (Gomes, (1970). A variação média da motilidade espermática, segundo Maciel (2006), está entre 60% e 80%. A técnica para avaliação de motilidade se dá a partir da aferição logo após a coleta de sêmen, através da microscopia óptica e atribuição de percentual de movimentação da célula no campo, avaliando-se numa escala de 0 à 100, quanto mais próximo à 100, maior será a motilidade.

3. Material e Métodos

3.1. Local e período experimental

O experimento foi realizado no Setor de Aves do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (Figura 1), localizado na cidade de Capão do Leão, Rio Grande do Sul-Brasil, durante o período de sete semanas, sendo as duas primeiras semanas de adaptação dos animais as dietas, compreendendo os meses de novembro a dezembro de 2017. A presente pesquisa foi conduzida de acordo com o comitê institucional sobre uso de animais (Comitê de Ética e Experimentação Animal número 9017).

As micotoxinas foram fornecidas pelo Laboratório de Micotoxinas e Micologia do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/Universidade de São Paulo (USP) e as análises de sêmen foram realizadas no Laboratório de Biotécnicas de Reprodução de Aves do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Figura 1. Setor de aves do Biotério Central.

Fonte: Registrada pela autora, 2017.

3.2. Animais experimentais, instalações e manejo

Foram utilizados 36 galos da raça Rhode Island Red, com idade inicial de 57 semanas , alojados em boxes individuais com dimensões de 75x75X75 cm (Figura 2), equipados com comedouro tipo calha e bebedouros tipo *nipple*. A temperatura ambiente foi aferida diariamente, variando durante o período experimental de 7,5 °C à 36 °C. Os animais receberam água *add libitum* e foram alimentados com uma ração comercial (Tabela 1), com fornecimento de 135 g/ dia de ração, e foram pesados semanalmente. Todos os galos foram submetidos à coleta de sêmen através do método de massagem abdominal proposto por Burrows e Quinn (1937), duas vezes por semana, uma coleta para o esgotamento e outra para as análises laboratoriais (Figura 3).

Figura 2. Local de alojamento dos animais.

Fonte: Registrada pela autora, 2017.

Tabela 1. Composição nutricional das dietas experimentais

Umidade	Máx.	130,0	g/kg
Cálcio	Min.	30,0	g/kg
Cálcio	Máx.	44,0	g/kg
Fósforo	Min.	4000,0	mg/kg
Sódio	Min.	1400,0	mg/kg
Lisina	Min.	8500,0	mg/kg
Metionina	Min.	3400,0	mg/kg

Cobre	Min.	8,0	mg/kg
Ferro	Min.	46,0	mg/kg
Flúor	Max.	25,0	mg/kg
Iodo	Min.	0,98	mg/kg
Mananês	Min.	63,0	mg/kg
Selênio	Min.	0,28	mg/kg
Zinco	Min.	48,40	mg/kg
Ácido nicotínico	Min.	15,0	mg/kg
Ácido pantotênico	Min.	6,0	mg/kg
Colina	Min.	130,0	mg/kg
Vitamina A	Min.	7040,0	UI/kg
Vitamina B12	Min.	6,0	mcg/kg
Vitamina B1	Min.	1,0	mg/kg
Vitamina B2	Min.	2,3	mg/kg
Viamina B6	Min.	1,25	mg/kg
Vitamina D3	Min.	1700,0	UI /kg
Vitamina E	Min.	5,2	UI /kg
Vitamina K3	Min.	1.2	mg/kg
Fitase	Min.	500,0	mg/kg

Composição qualitativa: Farelo de soja, farelo de trigo, milho interal moído, calcário calcítico, cloreto de sódio, farinha de conchas de ostra tipo 2, fosfato bicálcico 95%, Metionina, Carbo Amino Fosfoquelato de cobre, Carbo Amino Fosfoquelato de ferro, Carbo Amino Fosfoquelato de Ferro, Carbo Amino Fosfoquelato de Manangês, Carbo Amino Fosfoquelato de Manganês, Carbo Amino Fosfoquelato de Zinco,Iodato de Cálcio, Ácido Nicotínico, Ácido Pantotênico, Cloreto de colina, Fitase, Vitamina A, Vitamina B1, Vitamina B12, Vitamina B2, Vitamina B6, Vitamina D3, Vitamina E e Vitamina K3. Peso líquido: 40 Kg.

Figura 3. Massagem dorso abdominal.

Fonte: Registrada pela autora, 2017.

3.3. Delineamento experimental e tratamentos

Os galos foram distribuídos em boxes individuais, sendo que cada animal foi considerado uma unidade experimental. Os animais tiveram quinze dias para adaptação às dietas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 18 galos por tratamento. Em um tratamento foi utilizado somente a dieta basal e no outro a dieta basal com adição de micotoxinas (Fumonisina 10 ppm, zearalenona 300 ppb, deoxinivalenol 700 ppb) e aflatoxinas 25 ppb) , resultando nos seguintes tratamentos:

T1 – Dieta basal sem adição de micotoxinas;

T2 – Dieta basal com adição de micotoxinas (Fumonisina 10 ppm, zearalenona 300 ppb, deoxinivalenol 700 ppb) e aflatoxinas 25 ppb .

3.4. Coleta de dados

Realizada a massagem dorso abdominal, o sêmen era coletado com tubos *Falcon* de 15 mL, com graduação de 0,1 mL e esperava-se a sedimentação do conteúdo para o aferimento do volume seminal. Após a coleta, o material era transportado para o laboratório de Biotécnicas em Reprodução de Aves, onde se realizava a diluição com diluente de Lake, na proporção de 1:1, diluente este composto por frutose (10 g/L), cloreto de magnésio (0,68 g/L), citrato de potássio (1,28 g/L), acetato de sódio (5,13 g/L) e glutamato monossódico (21,25 g/L).

Para motilidade espermática e vigor espermáticos, a amostra de sêmen era homogeneizada, colocava-se 10µL de sêmen diluído sobre a lâmina e após colocava-se a lamínula. A avaliação foi realizada através de microscopia óptica na objetiva de 40x, sempre em duplicata. A motilidade foi avaliada através de uma escala de 0 à 100% para atribuição de percentual de movimentação da célula e para vigor espermático se utilizou uma escala de 0 a 5 estimando-se o movimento progressivo retilíneo e uniforme dos espermatozoides. Estas análises, por serem subjetivas, foram realizadas sempre pela mesma pessoa para evitar variações nos resultados.

A avaliação de concentração espermática foi realizada através de espectofotometria de transmitância; em uma cubeta colocava-se 6 µL de sêmen em 3 mL de citrato de sódio, logo após se inseria esta cubeta no espectofotômetro e os valores de transmitância obtidos eram convertidos para bilhões de espermatozoides por mililitro de sêmen (bilhões/mL).

Para morfologia espermática, em uma lâmina colocava-se 5 µL de sêmen diluído mais 5 µL de corante eosina-nigrosina e se realizava a técnica de esfregaço. Após a secagem da lâmina, através de microscopia óptica com aumento de 100x, era efetuada a contagem de 100 células possibilitando a visualização de porções danificadas dos espermatozoides.

Foram abatidos cinco galos de cada tratamento, ao final do experimento, para avaliação de peso absoluto e relativo dos testículos, comprimento e largura dos testículos, bem como também foi avaliado o peso de fígado dos animais, através de balança eletrônica digital para a variável peso e de régua graduada para comprimento e largura.

3.5. Análise estatística

Os resultados foram avaliados através da análise de variância com medidas repetidas, incluindo o período de avaliação como um efeito aleatório, usando o programa estatístico STATISTIX 08. Dados que não apresentaram normalidade de acordo com o teste de Shapiro-Wilk foram submetidos à transformação (logarítimo ou arco-seno). Os dados que não apresentaram distribuição normal mesmo após transformação foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Volume seminal, Motilidade, Concentração e Vigor espermático

Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) para as variáveis volume seminal, motilidade, concentração e vigor espermático (Tabela 2).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os de Yegani et al. (2006), que avaliaram o efeito de de 12,6 mg/kg de Deoxynivalenol em características seminais de machos reprodutores pesados com 26 semanas de idade e, não encontraram diferença significativa (P>0,05) para as variáveis volume seminal, motilidade espermática e concentração espermática. Souza (2007), ao avaliar aflatoxinas e fumonisinas em machos reprodutores pesados, também não verificou alteração no vigor espermático.

Briggs et al. (1974) e Arévalo (2013), ao testarem diferentes doses de aflatoxinas em machos reprodutores, também não encontraram diferença significativa para as variáveis volume seminal e motilidade espermática, respectivamente. Contudo, (SHARLIN et al., 1980) constatou o efeito prejudicial de aflatoxinas na concentração do sêmen de machos reprodutores White Leghorn.

Tabela 2. Número de animais (N), média, erro padrão (SE), valor mínimo e máximo e valor de P para Volume Seminal (mL), Motilidade espermática (%), Concentração Espermática

(bilhões/mL) e Vigor Espermático (escore 0-5) de galos alimentados com dieta basal (T1) e dieta basal mais adição de micotoxinas (T2).
Para p<0,05 não há diferença significativa.

Volume Seminal (mL)

	N	Média	SE	Mín	Máx	P
T1	70	0,33	0,02	0,1	1,2	0.5980
T2	77	0,30	0,02	0,1	0,8	

Motilidade Espermática (%)

	N	Média	SE	Mín	Máx	P
T1	70	65.429	3,31	0	100	0.2150
T2	75	60.400	3,21	0	100	

Concentração Espermática (bilhões/mL)

	N	Média	SE	Mín	Máx	P
T1	69	5.82	0.4734	0.81	18.98	0.4604
T2	74	5.16	0.3958	0.91	18.38	

Vigor Espermático (Escore 0-5)

	N	Média	SE	Mín	Máx	P
T1	70	3,41	0,1696	0	5	0.0843
T2	75	3,07	0,1558	0	5	

4.2. Morfologia espermática

Os resultados obtidos para total de espermatozoides normais e anormais apresentaram diferença estatística (P<0,05) na 63° semana de idade entre os tratamentos; os animais alimentados com dieta basal (T1) obtiveram uma maior porcentagem total de espermatozoides normais, consequentemente, os animais alimentados com dieta basal com adição de micotoxinas (T2), obtiveram maior porcentagem total de espermatozoides anormais nesta semana (Tabela 3).

Para defeitos de cabeça e cauda não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos, no entanto, foi verificada diferença estatística (P<0,05), dentro dos tratamentos nas distintas semanas de idade dos animais.

Os animais alimentados com dieta basal mais micotoxinas (T2), na 63° semanas de idade, apresentaram a maior porcentagem de defeito de cabeça nos espermatozoides, diferindo estatísticamente da 59° e 60° semanas.

Para defeito de cauda dos espermatozoides, os animais alimentados com dieta basal com 59, 61 e 62 semanas obtiveram as maiores porcentagens de defeitos, diferindo estatisticamente da 60° e 63° semanas, as quais apresentaram as menores porcentagens. Os animais alimentados com dieta basal mais adição de micotoxinas, apresentaram diferença significativa entre a 60° semana e as demais semanas de idade.

Tabela 3. Número de animais, média, erro padrão, e valor de P para Defeito de Cabeça, Defeito de Cauda, Total de Normais e Total de Anormais de espermatozoides (%) de galos alimentados com dieta basal (T1) e dieta basal mais adição de micotoxinas (T2).

Defeito de Cabeça

	Dieta Basal (T1)		Dieta com micotoxina (T2)		
Idade (semanas)	N	Média ± SE	N	Média±SE	Valor de P
59	13	7.6585±1.52^{Aa}	15	6.1460±1.42^{Ab}	0.8627
60	15	5.4253±1.02^{Aa}	16	5.5394±0.98^{Ab}	0.7223
61	15	8.6953±1.83^{Aa}	15	7.5420±1.06^{Aab}	0.7904
62	13	10.052±1.54^{Aa}	11	10.759±1.67^{Aab}	0.9472
63	14	7.816±1.65^{Aa}	17	12.009±1.49^{Aa}	0.0763
Valor de P		0.1357		0.0032	

Defeito de Cauda

	Dieta Basal (T1)		Dieta com micotoxina (T2)		
Idade (semanas)	N	Média ± SE	N	Média±SE	Valor de P
59	13	19.649±3.63^{Aab}	15	23.045±3.38^{Aa}	0.4813
60	14	6.5871±2.06^{Ac}	16	6.9969±1.93^{Ab}	0.6525
61	15	27.229±4.51^{Aab}	15	24.824±4.85^{Aa}	0.5816
62	13	19.602±4.98^{Aab}	11	21.708 ±5.41^{Aa}	0.7754
63	14	13.421±3.37^{Abc}	17	21.819±3.06^{Aa}	0.0544
Valor de P		0.0003		0.0002	

Total de Normais

Dieta Basal (T1)	Dieta com micotoxina (T2)

Idade (semanas)	N	Média ± SE	N	Média±SE	Valor de P
59	13	72.484±4.54^{Ab}	15	69.973±4.23^{Ab}	0.5745
60	15	88.414±2.72^{Aa}	16	87.451±2.63^{Aa}	0.9693
61	15	64.195± 5.22^{Ab}	15	67.348±5.11^{Ab}	0.6416
62	13	70.335±5.66^{Ab}	11	67.522±6.15^{Ab}	0.6330
63	14	78.610±4.05^{Aab}	17	66.741±3.68^{Bb}	0.0499
Valor de P		0.0006		0.0008	

Total de Anormais

Dieta Basal (T1)			Dieta com micotoxina (T2)		
Idade (semanas)	N	Média ± SE	N	Média±SE	Valor de P
59	13	27.310 ±4.52^{Aa}	15	30.017±4.20^{Aa}	0.5284
60	15	11.577±2.72^{Ab}	16	12.541±2.63^{Ab}	0.8110
61	15	35.927±5.15^{Aa}	15	32.431±5.01^{Aa}	0.5963
62	13	29.657±5.66^{Aa}	11	32.469±6.15^{Aa}	0.8180
63	14	21.382±4.06^{Aab}	17	33.251±3.68^{Ba}	0.0290
Valor de P		0.0003		0.0003	

^{AB}Médias com letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05).

^{ab}Médias com letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey(P<0,05).

O resultado deste trabalho discorda de Souza (2007) que ao avaliar a morfologia espermática em galos Cobb 500 com 22 semanas de idade, durante 46 dias, submetidos a diferentes níveis de fumonisinas e aflatoxinas, não verificou diferenças significativa (P>0,05) entre os tratamentos para defeitos de cauda e cabeça, bem como, para os defeitos totais de espermatozoides. Esta diferença significativa entre os tratamentos na 63° semana de idade, que compreendeu a última semana experimental, pode ser justificada pelo efeito acumulativo das micotoxinas no organismo animal.

4.3. Biometria dos testículos

As variáveis analisadas através da biometria dos testículos foram comprimento, largura e peso dos testículos esquerdo e direito; também foi calculado o peso relativo do testículo esquerdo, o peso relativo do testículo

direito e o peso relativo do testículo direito mais o peso do testículo esquerdo. Não foram encontradas diferenças significativas (P>0,05) entre nenhuma das variáveis de biometria (Tabela 4).

No que diz respeito ao comprimento e largura dos testículos, os resultados encontrados neste trabalho estão dentro dos valores descritos por Bahr & Bakst (1989), que afirmam que em machos adultos e sexualmente ativos os testículos medem de 3,25 a 5,6 cm de comprimento e aproximadamente 2,5 cm de largura.

Segundo Rospigliosi & Figueroa (2003), o peso de cada testículo varia de 25 a 35g, normalmente o esquerdo sendo 0,5 a 3 g mais pesado que o direito, no entanto, o peso dos testículos encontrados neste trabalho variaram apenas de 10 à 20 g, discordando neste quesito, mas corroborando ao que se refere ao peso do testículo esquerdo ser superior ao direito.

Tanto Arévalo et al. (2015), que avaliaram peso absoluto e relativo de testículos esquerdo e direito, utilizando galos da raça Isabrown com 27 semanas de idade alimentados com 20 ppb e 5000 ppb de aflatoxinas, como Briggs et al. (1974), que utilizaram galos alimentados com 20000 ppb de aflatoxinas durante quatro semanas, não encontraram diferenças significativas (p>0,05), concordando assim com os resultados obtidos neste trabalho. No entanto, discordam dos resultados obtidos por Ortatatli et al. (2002), que relataram atrofia testicular (p <0,01) em todos os grupos tratados, em galos utilizando doses de 5000, 10000 e 20000 ppb de aflatoxinas, durante um período de quatro semanas.

Tabela 4. Número de animais (N), média, erro padrão (SE), valor mínimo e máximo e valor de P para comprimento do testículo esquerdo e direito (cm), largura de testículo esquerdo e direito (cm), peso de testículo esquerdo e direito (g), peso relativo dos testículos esquerdo e direito (%) e peso relativo de testículo esquerdo mais testículo direito ao peso dos animais (%), de galos alimentados sem e com adição de micotoxinas na dieta.

	Dieta basal sem adição de micotoxinas (T1)					Dieta com adição de micotoxinas (T2)					
	N	Média	SE	Mín	Máx	N	Média	SE	Mín	Máx	P***
Comprimento testículo esquerdo (cm)	5	4.46	0.0927	4.30	4.80	5	4.44	0.2249	3.80	4.90	0.9365
Comprimento testículo direito (cm)	5	4.42	0.1200	4.00	4.70	5	4.64	0.2112	4.00	5.30	0.2986
Largura testículo esquerdo (cm)	5	2.30	0.1225	2.00	2.50	5	2.08	0.0583	2.00	2.30	0.2339
Largura testículo direito (cm)	5	2.54	0.1435	2.00	2.80	5	2.36	0.1568	2.00	2.80	0.4208
Peso testículo esquerdo (g)	5	15.0	1.5811	10.0	20.0	5	13.0	12.247	10.0	15.0	0.3694
Peso testículo direito (g)	5	14.0	1.0000	10.0	15.0	5	12.0	12.247	10.0	15.0	0.2415
Peso relativo testículo esquerdo (%)	5	0.40	0.0441	0.27	0.54	5	0.35	0.0364	0.24	0.42	0.3986
Peso relativo testículo direito (%)	5	0.37	0.0280	0.27	0.43	5	0.32	0.0375	0.24	0.42	0.3129
Peso relativo testículo direito + esquerdo (%)	5	0.78	0.0687	0.54	0.95	5	0.68	0.0691	0.48	0.84	0.9919

Para P>0,05, não há diferença significativa.

4.4. Peso de fígado

Os resultados obtidos para peso de fígado não apresentaram diferença significativa (p>0,05); os pesos de fígado do tratamento sem adição de micotoxinas variaram de 40 à 55g e do tratamento com adição de micotoxinas de 25 à 55g, totalizando uma média de 46 g e 38 g, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Número de animais, média, erro padrão, valor mínimo e máximo e valor de P para peso de Fígado (g) de galos alimentados sem e com adição de micotoxinas na dieta.

	N° de animais	Média	SE	Mín	Máx	P
T1	5	46	2.915	40	55	0,2277
T2	5	38	5.3852	25	55	

* Para P>0,05, não há diferença significativa.

Provavelmente pelo nível de fumonisina ser superior a o utilizado neste trabalho (10 ppm de fumonisina), Weibking *et al. (*1993) tiveram uma diminuição significativa no ganho de peso e conversão alimentar, aumento no peso dos rins, fígado e concentração de hemoglobina quando alimentaram frangos de corte de 1 dia durante 3 semanas com rações que continham em torno de 525 ppm de fumonisina B1.

Entretanto Henry & Wyatt (1994) estudaram a toxicidade da fumonisina B1 purificada em frangos em crescimento; a toxina foi incorporada na dieta de pintinhos de 1 dia nas concentrações de 0, 20, 40 e 80ppm e os autores verificaram que níveis de até 80ppm não alteraram peso dos órgãos (fígado, baço e rins). Norred & Voss (1994) afirmam que em aves, somente níveis de fumonisina acima de 150mg/kg causam diarreia, diminuição do consumo de alimentos e do ganho de peso, aumento do peso do fígado e rins e necrose hepática, concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

5. Conclusão

A adição de micotoxinas (Fumonisina 10 ppm, zearalenona 300 ppb, deoxinivalenol 700 ppb) e aflatoxinas 25 ppb) na dieta de galos reprodutores da raça Rhode Island Red, entre 59 e 63 semanas de idade, aumentou o número de anomalias espermáticas, no entanto, não foram observadas diferença estatística (P>0,05) para as variáveis: volume seminal, concentração espermática, motilidade espermática, vigor espermático, peso de testículos esquerdo, peso testículo direito, comprimento do testículo esquerdo, comprimento do testículo direito, largura do testículo esquerdo, largura do testículo direito, peso relativo do testículo esquerdo, peso relativo do testículo direito, peso relativo dos testículos esquerdo mais direito, peso de fígado, defeito de cauda e cabeça dos espermatozoides.

6. Referências

AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; IULIIS, G.N.D. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.

ALLEN, T. E. & GRIGG, G. W. Sperm transport in the fowl. **Aust. J. agrie**. Res. 8, 788, 1957.

ALKAN, S.; BARAN, A.; ÖZDAfi, Ö. B.; EVECEN, M. **Morphological defects in turkey semen**. Disponível em: <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-02-26-05/vet-26-5-16-0107-40.pdf.>. Acesso em: janeiro. 2018.

ARÉVALO, M. L. P; MÉNDEZ, A.; MÁRQUEZ, J. M. R; SARAS, G. M; Efecto de las aflatoxinas totales sobre el volumen y peso testicular en gallos (Gallus gallus). **An International Refereed Scientific Journal of the Facultad Experimental de Ciencias at the Universidad del Zulia**, Maracaibo – Venezuela, 55-61p , Maracaibo, Venezuela, 2015.

ARÉVALO, M. L. P. Efecto de las aflatoxinas sobre aspectos fisiológicos y morfológicos reproductivos em gallos (Gallus gallus) así como el efecto detoxificador de la vitamina c sobre los mismos. **Tese de doutorado.** Córdoba Septiembre, 2013.

BAHR, J. M.; BAKST, M. R. Aves. En: Reproducción e inseminación artificial en animals. 5ta ed. **Editorial Interamericana**. **Mexico.** pp. 419-422, 1989.

BAKST M.R.; LONG J.A. Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. 2nd ed. Buffalo, MN: **The Midwest Poultry Federation**, 2010.

BENNET, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical of Microbiology Review** 16: 497–516. 2003.

BERGSJO, B.; KALDHUSDAL, M. No association found between the ascites syndrome in broilers and feeding of oats contaminated whith deoxynivalenol up to thirty-five days of age. **Poultry Science,** v.73, p.1758-1762, 1994.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins of filamentous fungi. **Chem Immunol**. v.81, p.167-206, 2002.

BONGALHARDO, D. C.; DIONELLO, N. J. L.; CARDELLINO, R. A.; BRACCINI NETO, J. Repetibilidade e correlações fenotípicas do caráter volume de sêmen de galos Withe Leghorn. **Rev. Soc. Bras. Zootec**., Viçosa, v. 23, n. 6, p.1002-1007, 1994.

BONGALHARDO, D. C, Produção e preservação do sêmen de galos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** Belo Horizonte, v.37, n.2, p.131-135, abr./jun. 2013.

BORGES, C. A. Q.; ROSTAGNO, H. S.; DA SILVA, J. H. V.; ALBINO, L. F. T.; TORRES, C. A. A.; FILHO, J. J.; RIBEIRO, M. L. G. Exigências de energia e composição da carcaça de galos reprodutores pesados em função do consumo energético na fase de reprodução. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 1978 – 1984, 2006.

BRAKE, J.; HAMILTON, P. B.; KITTRELL, R. S. Effect of the trichothecene mycotoxin diacetoxyscirpenol on fertility and hatchability of broiler breeders. **Poultry Science,** Champaign, 78:1690–1694, 1999.

BRIGGS, D. M.; WYATT, R. D.; HAMILTON P. B. The effect of dietary aflatoxina on semen characteristics of mature broiler breeder males. Poult Sci. 53 pp. 2115-2119.

BURROWS, W. R.; QUINN, A. Method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. **Poultry Science**, Champaign, v. 14, p. 253, 1935.

CELEGHINI, E. C. C.; ALBUQUERQUE, R.; ARRUDA, R. P; LIMA, C. G. Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso e histologia) e peso corporal em galos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, SP, n. 2, p. 57, 2000.

CELEGHINI, E. C. C.; ALBUQUERQUE, R.; ARRUDA, R. P.; LIMA, C. G. Avaliação das características seminais de galos selecionados para reprodução pelo desenvolvimento da crista. Braz. J. **Vet. Res. Anim. Sci**., São Paulo, v. 38, n. 4, p. 177-183, 2001.

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

CHALAH, T.; BRILLARD, J. P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosinnigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/IP). **Theriogenology 50**:487–493, 1998.

CORRIER, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Veterinaty Immunology and imunnopathology.** v. 30 , p. 73-87, 1991.

COTTA, J.T.B., Galinha: produção de ovos. Viçosa: **Aprenda Fácil,** 2002.

CRUZ, L. C. H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses: Reflexos na indústria avícola. **Anais do I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves- FACTAp.**-1-13, 1995.

DILKIN, P. Micotoxicose suína: aspectos preventivos, clínicos e patológicos. **Biológico**, v.64, p.187-191, 2002.

DOERR, J. A.; HAMILTON, P. B.; BURMEISTER, H. R. T-2 toxicosis and blood coagulation in young chickens.**Toxicol and Appl Pharmacol**, v.60, p.157-162, 1981.

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

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A. F; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; GARDE, J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and

importance of individual male variability. **Reprod Domest Anim,** v 46: p 393–403, 2011.

ETCHES, R. J. Reproducción aviar. **Editorial Acribia**, Zaragoza. España. pp 339, 1996.

FERNÁNDEZ-GAGOA, R., DOMINGUEZ, J. C., MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**. 80:400–410, 2013.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ,E.S.E. (Ed.). **Reprodução animal**. São Paulo: Manole. cap. 7, p. 167-189, 2003.

GILLAN L.; EVANS G.; MAXWELL W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology** 63, 445–457, 2005.

GOMES, W. R. Artificial Insemination. In: **The Testes.** New York: Academic. p. 257-279, 1970.

HENRY, M. H; WYATT, R. D. A review of fumonisin production by Fusarium moniliforme and fumonisin toxicoses in animals. **Appl Poult Sci**, v.2, p. 188-192, 1994.

HUSSEIN, S. H., BRASELL, J. M,. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

IAMANAKA, T.; OLIVEIRA I; TANIWAKA M. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol. 7, p.138-161, 2010.

LAKE, P. E.; STEWART, J. M. Comparative physiology of turkey and fowl semen, In: CUNNIGHAN. **Reproductive biology of poultry**. Harlow: British Poultry Science, London, p. 151-160, 1978.

LARBIER, M.; LECLERCQ, B. **Nutrition and feeding of poultry,** Loughborough : Nottingham University, 305p, 1992.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mytoxins**. Guelph: University Books, p.249-280, 1995.

LUNA, L. G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute Pathology**. 3. ed. New York: McGraw hill, 258 p, 1968.

MALLMANN, C. A.; GIACOMINI, L. Z.; RAUBER, R. H.; PEREIRA, C. E. Micotoxinas em ingredientes para alimento balanceado de aves. In: **CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA,** Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: 2007. p.191-204, 2007.

MACIEL, M. P.. Características reprodutivas de galos leves e semipesados submetidos a diferentes fotoperíodos. **Tese (Doutorado)** – Lavras : UFLA, 2006. 126 p. : il. Orientador: Judas Tadeu de Barros Cotta. 2006.

MARTIN RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA ARTIAGA, C.; DE ALBE, C. Bora semen evaluation in practice. **Reproduction Domestics Animal**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 519-526, 1996.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram sêmen. **Anim Reprod Sci**, v.84, p.121-133, 2004.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE J. J. Suitability of novel antioxidants for protecting thawed spermatozoa from red deer. **Reprod Fertil Dev doi**:10.1071/RD09197, 2010.

MCDANIEL. **Alpharma Breakfast Meeting**. Jan., 2001.

MILLER, J. D. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research** 31:1–16, 1995.

MORAES, I. A. **Fisiologia da reprodução das aves domésticas**, 2002.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. **Food Mycotoxins:** An Update. J. Food Scien. v.71, n.5, p.51-65, 2006.

NORRED, W. P.; VOSS, K. A. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. **Journal of Food Protection**, v.57, p.522-527, 1994.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v.85, p.89-94, 1990.

ORTATATLI, M.; CIFTCI, M. K.; TUZCU, M.; Y KAYA, A. The Effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters. **Research in Veterinary Science**. 72 pp. 29-36, 2002.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. **Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano**. Bol. OMS. n.2, 2000.

REMUS, A; ANDRETTA, I ; KIPPER, M; LEHNEN, C; LOVATTO, P. **Presença de zearalenona na alimentação de suínos e aves: estudos meta-analíticos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

RESENDE, O. A.; SANTOS, M. W.; DIAS, P. G. O. Inseminação artificial em galinhas. **Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro**, Niterói, maio, 28 p. (Boletim Técnico, 6), 1983.

ROBERTSON, L.; WISHART, G.J. In vitro sperm-egg interaction assay utilizing inner perivitelline layer from laid chicken eggs.Techniques for semen evaluation, semen storage, and fertility determination. Savoy, IL: **Poultry Science Association**, p.64-67, 1997.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M. **Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review**. Braz. J. Microbiol. v.33, p.1-11, 2002.

ROSMANINHO, J.F.; OLIVEIRA, C.A.F.; BITTENCOURT, A.B.F. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. **Arq. Inst. Bio**l. v.68, n.2, p. 107-114, 2001.

ROSPIGLIOSI, J.; Y FIGUEROA, E. Desarrollo anátomo-histológico del testículo del nacimiento a la madurez de la codorniz (Coturnix coturnix) variedad japonesa. **Rev Inv Vet Perú**. 14(1) pp.74-78, 2003.

ROSTAGNO, H. S.; SILVA, D. J.; COSTA, P. M. A.; FONSECA, J. B.; SOARES, P. R. **Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos** (tabelas brasileiras) Viçosa: UFV, 60 p, 1992.

SHARLIN, J. S., HOWARTH, B. R., THOMPSON F. N. Y WYATT, R. D. Decreaed reproductive potential and reduced feed consumption in mature white leghorn males fed aflatoxina. **Poult. Sci**. 60 pp. 2701- 2708, 1981.

SILVA, F. C. O. Níveis de energia digestível para suínos machos inteiros e fêmeas dos 60 aos 100Kg. 89 p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (Gallus gallus, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades. **Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, MG, 2003.

SOUZA, F.R.; Avaliação de diferentes doses de aflatoxina e fumonisina sobre os parâmetros reprodutivos de galos. 114 p. **Dissertação** - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

STATISTIX®. Statistix® 8 Analytical Software. **User's manual**. Tallahassee. FL. p.396, 2003.

SURAI, P.F.; WISHART, G.J. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, New York, v. 52, p. 27-43, 1996.

WEIBKING, T. S.; LEDOUX, D. R.; BERMUDEZ, A. J.; TURK, J. R. ; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of feeding Fusarium moniliforme culture material, containing know levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. **Poultry Science** 1993; 72: 456-66.

WILSON, H.R.; PIESCO, N.P.; MILLER, E.R. Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. **Worlds Poult. Sci. J**., v.35, p.95-118, 1979.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food. **Technical Report Series** 906:1–62, 2002.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15, p.129-144, 2011.

YEGANI M.; Smith, T. K.; Leeson S.; Boermans, H. J. Effects of Feeding Grains Naturally Contaminated with *Fusarium* Mycotoxins on Performance and Metabolism of Broiler Breeders. **Poultry Science**, [S.l], 85:1541–1549, 2006.