

José Maurício da Rocha Júnior

T636.089

R6722

2007



DA UFMG

**“LITÍASE EPIDIDIMÁRIA EM *Gallus gallus domesticus* EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL”**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Néilson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2007

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

28/10/07

3000707-11

430891

R6721 Rocha Júnior, José Maurício da, 1971-  
Litíase epididimária em Gallus gallus domesticus em diferentes regiões do Brasil / José Maurício da Rocha Júnior. - 2007.  
47 p. : il.

Orientador: Nélson Rodrigo da Silva Martins  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Galo – Doenças – Teses. 2. Epidídimo – Teses. 3. Testículos – Teses. I. Martins, Nélson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 9

Tese defendida e aprovada em 26 de junho de 2007 pela comissão examinadora constituída por:



Prof. Nélon Rodrigo da Silva Martins (orientador)

Prof. Germán Arturo Bohórquez Mahecha

Prof. José Sérgio de Resende

Prof. Ernane Fagundes do Nascimento

Prof. Bernadete Miranda dos Santos

## AGRADECIMENTOS

A Karine e Júlia que me acompanham desde a graduação, e Catarina, a partir do mestrado, pelo amor, carinho, companhia e incentivo indispensáveis à realização desse projeto.

Ao meu exemplo de vida, José Maurício da Rocha “pai”, por tudo que fez e faz por mim até hoje.

Ao professor Néelson Rodrigo da Silva Martins pelo empenho, dedicação, orientação e amizade.

Ao professor Germán Arturo Bohorques Mahecha pela ajuda e orientação indispensáveis, e principalmente pela paciência com minhas viagens.

Ao professor José Sérgio de Resende pela amizade, incentivo e participação na banca.

Aos meus tios José Ribeiro e Nina, Marcos e Gisele e ao primo Ricardo pela torcida e presenças constantes durante todos esses anos.

A minha avó Nilda e minha mãe, que mesmo à distância rezam e torcem por mim.

A D. Edna, Sinhá, tias Ana e Licinha pelo carinho, convivência e orações.

Aos amigos e “compadres” Hélio Jr. e Adriana, Leonardo Pinho, Paulo e Patrícia, Leonardo Mendes e Paulo Zonta por todos esses anos juntos.

A Deus por ter tomado conta de mim e da minha família durante todo esse período.

Ao professor Néelson Carneiro Baião pela amizade e ajuda durante todo o projeto.

Ao Antônio Carlos Junqueira, pela amizade, confiança e por sempre adequar meus horários na UNINCOR, para que eu pudesse levar esse projeto adiante junto com o trabalho.

Aos colegas do LABRE, Rubem, André e Regiane, pela companhia e ajuda na confecção das lâminas e fotos presentes nesse trabalho.

Aos professores Ernane da UFMG e Bernadete da UFV pelas valiosas contribuições na banca.

A Biovet, Hy-Line do Brasil, Sadia, Perdigão, Alimenta e Pif-Paf pelas amostras enviadas com tanta boa vontade para a realização dessa pesquisa.



---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b> .....	10
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1	Anatomia e histologia do aparelho reprodutor do galo.....	12
2.2	Fisiologia do aparelho reprodutor do galo.....	13
2.3	Métodos de avaliação da fertilidade.....	16
2.4	Fatores que afetam a fertilidade dos galos.....	17
2.4.1	Fatores comportamentais.....	17
2.4.2	Fatores genéticos.....	17
2.4.2.1	Genética quantitativa.....	17
2.4.2.2	Efeito dos genes deletérios.....	17
2.4.3	Alterações histopatológicas dos testículos e epidídimos.....	18
2.4.4	Fatores nutricionais.....	18
2.4.5	Medicamentos e produtos químicos.....	19
2.4.6	Idade.....	20
2.4.7	Fatores ambientais.....	20
2.4.7.1	Temperatura.....	20
2.4.7.2	Programas de luz.....	20
2.4.8	Proporção macho: fêmea.....	21
2.5	Litíase Epididimária.....	21
2.5.1	Lesões observadas nos testículos e vias genitais dos galos afetados.....	23
2.5.1.1	Lesões observadas no epitélio dos ductos eferentes.....	24
2.5.1.2	Lesões observadas no tecido conjuntivo.....	24
2.6	Nanobactérias e formação de cálculos.....	24
2.7	Importância do cálcio e da vitamina D3.....	25
2.8	Bronquite Infecciosa.....	25
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
3.1	Procedência do material.....	26
3.2	Local.....	26
3.3	Estudos realizados.....	26
3.3.1	Peso e características morfológicas dos testículos e epidídimos.....	26
3.3.2	ELISA.....	28
3.3.2.1	Padronização.....	28
3.3.2.2	Teste.....	28
3.4	Análise estatística.....	28
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
4.1	Prevalência da litíase epididimária por região e linhagem.....	28
4.2	ELISA.....	29
4.3	Peso testicular, linhagem e idade.....	30
4.4	Lesões macroscópicas.....	31
4.5	Lesões microscópicas.....	31
4.5.1	Testículos.....	31
4.5.2	Epidídimos.....	31
4.6	Correlações.....	38
4.6.1	Idade.....	38
4.6.2	Peso dos testículos.....	39

4.6.3	Cálculos.....	39
4.6.4	Lesões dos testículos.....	39
4.6.4.1	Descamação do epitélio dos túbulos seminíferos.....	39
4.6.4.2	Túbulos seminíferos dilatados.....	39
4.6.4.3	Túbulos seminíferos obstruídos.....	40
4.6.4.4	Destruição epitelial parcial dos túbulos seminíferos.....	40
4.6.5	Lesões no epidídimo.....	40
4.6.5.1	Aumento do número de lisossomos nos ductulos eferentes.....	40
4.6.5.2	Dilatação dos ductulos eferentes.....	40
4.6.5.3	Destruição do epitélio dos ductulos eferentes (perda de pregueamento).....	40
4.6.5.4	Infiltrado de células mononucleares (plasmócitos e macrófagos).....	41
4.6.5.5	Proliferação de tecido conjuntivo fibroso.....	41
4.6.5.6	Acúmulo de espermatozoides nos ductulos eferentes.....	41
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>

---

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência da litíase epididimária por região e linhagem.....	29
Tabela 2	Certificado de qualidade de lote SPF. Unidade de Uberlândia – MG.....	29
Tabela 3	Efeitos da linhagem sobre o peso médio dos testículos de acordo com a idade.....	30
Tabela 4	Correlações entre idade, peso testicular e lesões dos testículos e epidídimos.....	39
Tabela 5	Correlações entre peso testicular, idade e lesões.....	39
Tabela 6	Correlações entre cálculos e lesões nos testículos e epidídimos.....	39
Tabela 7	Correlações entre descamação dos túbulos seminíferos e outras lesões testiculares e epididimárias.....	40
Tabela 8	Correlações entre dilatação dos túbulos seminíferos e outras lesões testiculares e epididimárias.....	40
Tabela 9	Correlações entre túbulos seminíferos obstruídos e outras lesões testiculares e epididimárias.....	41
Tabela 10	Correlações entre destruição epitelial dos túbulos seminíferos e lesões testiculares, epididimárias, peso testicular e presença de cálculos.....	41
Tabela 11	Correlações entre dilatação dos ductulos eferentes e lesões testiculares, epididimárias e idade dos galos.....	41
Tabela 12	Correlações entre destruição do epitélio dos ductulos eferentes e lesões testiculares, epididimárias, peso testicular e idade dos galos.....	41

Tabela 13	Correlações entre infiltrado de células mononucleares e lesões testiculares, epididimárias, idade e peso testicular.....	42
Tabela 14	Correlações entre fibrose e lesões testiculares e epididimárias.....	42
Tabela 15	Correlações entre acúmulo de espermatozóides nos ductos eferentes e presença de cálculos, lesões testiculares e epididimárias.....	42

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1-	Vista ventral do aparelho reprodutor do galo.....	13
Figura 2-	Ilustração artística de uma seqüência de ductos da região epididimária em corte transversal.....	14
Figura 3-	Ilustração artística de seções dos epitélios de ductos eferentes proximais e distais.....	15
Figura 4-	Microfotografia do epidídimo de Gallus gallus domesticus mostrando os ductos eferentes proximais com epitélio luminal normal pregueado.....	15
Figura 5-	Mapa do Brasil mostrando as regiões das linhagens industriais em preto e aves caipiras em vermelho.....	27
Figura 6-	Resultados do ELISA para anticorpo contra nanobactéria em frangos de corte da linhagem Cobb com 35 dias de idade, galinhas Cobb em período de produção, galos Leghorn e galo caipira adultos.....	30
Figura 7-	Epidídimos de galo com 108 semanas de idade mostrando abundante presença de cálculos no seu interior.....	31
Figura 8-	Microfotografia de túbulos seminíferos de galos com 96 semanas de idade apresentando áreas com dilatação dos túbulos seminíferos.....	32
Figura 9-	Microfotografia de ducto eferente de galo apresentando aumento no número de lisossomos nas células epiteliais não ciliadas.....	32
Figura 10-	Microfotografia de ducto eferente de galo com 35 semanas de idade, apresentando ductos eferentes dilatados, com perda de pregueamento e cálculo no seu interior.....	33
Figura 11-	Microfotografia de ducto eferente de galo com 35 semanas de idade, apresentando células descamadas do tecido epitelial.....	34
Figura 12-	Microfotografia de testículo de galo 52 semanas de idade apresentando área de fibrose na rede testicular e ductos eferentes com dilatação, perda de pregueamento e descamação celular.....	34



Figura 13-	Microfotografia de testículo de galo apresentando ductulos eferentes com acúmulo de espermatozoides, perda de preguçamento e descamação.....	35
Figura 14-	Ductulo eferente de galo com 68 semanas de idade apresentando um cálculo no seu interior e ausência de preguçamento do mesmo.....	35
Figura 15-	Eletromicrografia de transmissão de célula de ductulo eferente de galo mostrando a presença da nanobactéria no interior.....	36
Figura 16-	Eletromicrografia de transmissão de meio de cultura DMEM mostrando a calcificação em volta da nanobactéria.....	36
Figura 17-	Eletromicrografia de transmissão de célula de ductulo eferente de galo mostrando a nanobactéria no seu interior ao lado de uma mitocôndria.....	37
Figura 18-	Eletromicrografia de transmissão de ductulo eferente de galo mostrando inúmeras nanobactérias e destruição da parede celular.....	37
Figura 19-	Eletromicrografia de transmissão de célula de ductulo eferente de galo mostrando os aumentos do número e tamanho dos lisossomos.....	38

## RESUMO

Foram utilizados 40 galos reprodutores provenientes dos estados de Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Goiás, sendo 10 galos Leghorn SPF, 05 Hy-Line, 05 Cobb, 05 Ross, 05 Leghorn SPF criados em condições não controladas e 10 caipiras. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a ocorrência da litíase epididimária em linhagens industriais de diferentes regiões do Brasil, analisar histologicamente o testículo e o epidídimo, avaliar e discutir a correlação entre a litíase e a função testicular e investigar a etiologia da doença. Durante a execução desse projeto foi desenvolvido um ELISA para a detecção de anticorpos para o possível agente causador dessa patologia. O estudo de prevalência mostrou que, nas linhagens industriais comerciais e SPF, a prevalência da litíase foi próxima de 100%. Nas aves caipiras, a prevalência foi de 50%. O ELISA realizado tanto em machos quanto fêmeas em idade de reprodução apontou altos títulos de anticorpos para todas as linhagens testadas, com exceção para frangos com 35 dias de idade. Não foram encontradas áreas de avicultura intensificada com baixa prevalência da doença. As aves de avicultura não intensificada (caipiras) apresentaram ocorrência mais baixa (50%), apenas para regiões remotas e distantes da avicultura industrial (Ubari – MG e Castelo – ES). Com relação à idade foram analisados galos no pico de produção (35 semanas) e em final de vida produtiva (96 semanas), não sendo encontradas diferenças significativas (nível de 5%) entre as idades para a presença da litíase. Em relação às lesões encontradas, nos galos houve correlação positiva entre a presença de cálculos e destruição do epitélio dos túbulos seminíferos e acúmulo de espermatozóides nos ductos eferentes.

Palavras-chave: galos; litíase; epidídimo.

## ABSTRACT

There were utilized 40 male broiler breeders from the states of Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, and Goiás, being 10 roosters leghorn SPF, 05 Hy-Line, 05 Cobb, 05 Ross, 05 Leghorns raised in non-controlled conditions and 10 farm raised. The objectives of this work were to evaluate the occurrence of epididymal lithiasis in industrial lines from different regions of Brazil, histologically analyze the testicle and the epididymis, evaluate and discuss the correlation between the lithiasis and the testicular function, and investigate the etiology of the disease. During the execution of this project, there were developed and ELISA for the detection of anti-bodies for the possible causing agent of this pathology. The prevalence study showed that, industrial commercial lines and SPF, the prevalence of lithiasis was close to 100%. Farm raised birds, the reproductions pointed high titles of anti-bodies for all lines tested, with exception of chickens older than 35 days. There were not found areas of intensified poultry keeping with low prevalence of the disease. The birds of non-intensified poultry keeping (farm raised) presented lower occurrence (50%), only for remote regions and distant from industrial poultry keeping (Ubari - MG and Castelo - ES). Relating to age, there were analyzed roosters at the peak of production (35 weeks) and in final stages of productive life (96 weeks), not finding significant differences (level of 5%) among those ages for the presence of lithiasis. Relating to injuries found on roosters, there were positive correlation among the presence of calculus and destruction of epithelial cells from seminiferous tubules and accumulation of spermatozoids on efferent ductules.

Keywords: roosters, lithiasis, epididymis.



## 1. INTRODUÇÃO

O galo doméstico (*Gallus gallus domesticus*) é a principal espécie de ave doméstica explorada como fonte de proteína animal para a alimentação humana. Esta espécie tem sido, desde épocas remotas, melhorada geneticamente para rápido crescimento ou alta produção de ovos. Originalmente, o galo doméstico em estado silvestre, apresentava reprodução tipicamente sazonal e uma limitada produção de ovos por ano. Após sua domesticação, esta ave exibe uma reprodução contínua ao longo do ano, sendo também incrementada sua produção de carne e ovos (Mahecha et al., 2002).

Desde o início da produção de frangos de corte no Brasil, a cadeia produtiva modernizou-se, devido à necessidade de redução de custos e aumento de produtividade, tentando com isso não perder competitividade em nível mundial. Como consequência, tem sido uma das mais organizadas do mundo, destacando-se das demais criações pelos resultados alcançados não só em produtividade e volume de abate, como também no desempenho econômico, onde têm contribuído de forma significativa para a economia do Brasil. Exportar tem sido uma prioridade para o setor que, já em 2001, ultrapassou a barreira do bilhão de dólares com as exportações (UBA, 2007).

De acordo com as instruções dos manuais de linhagens industriais de *Gallus gallus domesticus* em reprodução, a proporção média recomendada é de um macho para cada dez fêmeas. Cada galo, considerando uma produção de 180 ovos/ave alojada, será responsável pela fertilização de 1.800 ovos, no decorrer do período de 48 semanas de produção (20 – 68 semanas de idade). Esse fato demonstra a importância da fertilidade do reprodutor na obtenção de ovos férteis, visto que queda de 1% na fertilidade provocaria uma redução de 18 ovos férteis por galo. Considerando que, no Brasil em 2006 foram alojadas aproximadamente

39.100.000 matrizes de corte e postura (UBA, 2007), a diferença seria de 70.380.000 ovos férteis.

Nilipour (1994) estimou que 30% dos machos em produção apresentavam problemas de fertilidade. Isso leva a um grande aumento de custo e redução da eficiência reprodutiva.

Vários fatores podem mudar a capacidade de fertilização dos galos. Entre esses fatores destacam-se: restrição alimentar, composição do alimento, peso corporal, idade, período de luminosidade, doenças (Marek, leucose linfóide, salmoneloses, micoplasmoses), intoxicações (aflatoxinas, zearalenona, T2 e outras micotoxinas, chumbo, sal) e alguns medicamentos (Sexton et al, 1989; Lake, 1989).

Os manuais de linhagem preconizam o final da vida produtiva tanto para machos como para as fêmeas às 68 semanas de idade. Entretanto, estudos avaliando a produção de sêmen de galos mostraram que o potencial para variáveis tais como volume, concentração, número total de espermatozoides por ejaculado e fertilidade mantiveram-se satisfatórios até uma idade avançada (105 semanas), possibilitando seu aproveitamento para a inseminação artificial por muitos ciclos de produção, adiando, dessa forma, a reposição. Isso levaria a uma grande redução de custos devidos ao alto preço dos reprodutores (Renden e Pierson, 1982).

Em 1995 foi descrita uma patologia em galos Cornish e White Rock que causava retenção de esperma e declínio prematuro da fertilidade. Com 110 semanas de idade, a fertilidade desses galos era de apenas 5%, para aves que, segundo os autores, poderiam viver até os 10 anos de idade. Essa redução da fertilidade foi atribuída à diminuição da concentração de esperma no ejaculado (Muncher et al, 1995).

Janssen et al, (2000) observaram que galos adultos Leghorn desenvolviam litíase na região do epidídimo e como consequência disso, tinham a fertilidade reduzida. Os cálculos eram compostos principalmente de cálcio (48%). Às 62 semanas de idade, a produção diária de espermatozóides e os níveis de testosterona sanguínea eram significativamente menores nos galos afetados quando comparados com os normais.

No Brasil, Mahecha et al (2002), trabalhando em Minas Gerais com aves silvestres e domésticas, incluindo galos das linhagens White Leghorn, Ross e caipiras, encontram cálculos nos ductos eferentes em 94,3% dos galos. Em outras vinte e uma espécies de aves silvestres e quatro de aves domésticas não foram encontrados cálculos. Os cálculos eram compostos principalmente de cálcio (43,5%), oxigênio (28%) e carbono (23,5%).

O objetivo geral desse trabalho é avaliar a ocorrência da litíase epididimária em galos domésticos de linhagens industriais de diferentes regiões do Brasil. Os objetivos específicos são analisar histologicamente o epidídimo, avaliar e discutir a correlação entre a litíase e a função reprodutiva e investigar algumas evidências teciduais da etiologia. Galos de avicultura artesanal serão examinados para estabelecer comparação entre a ocorrência da litíase epididimária em aves intensificadas e não.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Anatomia e histologia do aparelho reprodutor do galo

Os órgãos genitais do galo (fig. 1) consistem em um par de testículos, região epididimária (ductos eferentes proximais e distais), ducto epididimário, ductos deferentes e falo, que é o órgão copulador. O cordão espermático, a túnica vaginal e o escroto estão ausentes. Também não há

glândulas acessórias genitais nem uretra (Dyce et al, 1990). Devido à ausência de glândulas acessórias nessa espécie, produz-se pequeno volume de sêmen, variando de 0,2 – 0,3 ml de sêmen por ejaculado (Van Krey, 1993). A concentração varia de três a sete milhões de espermatozóides por mm<sup>3</sup> (Lake e Stewart, 1978).

Os testículos têm o formato oval e durante a estação de reprodução são relativamente grandes (cerca de cinco cm de comprimento e 30 gramas de peso). Estão localizados simetricamente em contato com o lobo cranial do rim e com o pulmão. Os túbulos seminíferos passam na parede dorso-medial, onde se abrem na rete testis (Dyce et al, 1990). O testículo ativo não é firme ao toque, como nos mamíferos. Isso é devido ao fato da túnica albugínea que reveste o testículo não originar septos de tecido conjuntivo para o interior do órgão; portanto, as lobulações estão ausentes. Quando seccionado, um líquido viscoso flui do órgão, que contém lipoproteínas e espermatozóides (Getty, 1981). Os testículos, além de produzirem espermatozóides, representam um reservatório de sêmen, devido ao desenvolvimento escasso do epidídimo (Etches, 1996).

Diferente dos mamíferos, o epidídimo do galo não é dividido em cabeça, corpo e cauda. Ele aparece como uma discreta elevação na superfície medial dos testículos (McLelland, 1990). É formado por um aglomerado de ductos eferentes, que se juntam para formar o ducto do epidídimo, através do qual os espermatozóides atingem o ducto deferente. Este nasce na extremidade caudal do epidídimo, é intensamente espiralado e acompanha o ureter até a cloaca, onde se abre uma papila na parede lateral do urodeu (fig. 2). O líquido seminal é produzido nos testículos, pelas células epiteliais que revestem os ductos extracelulares (Dyce et al, 1990).



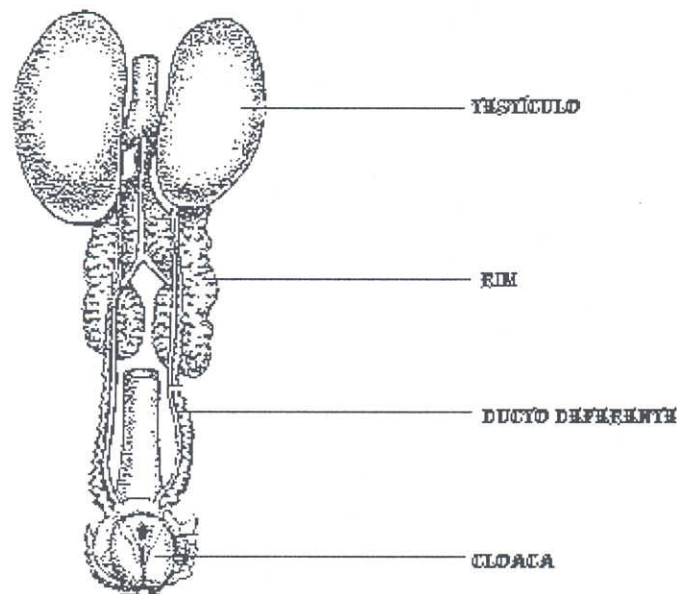


Figura 1 – Vista ventral do aparelho reprodutor do galo (Animal Research, 2006).

Aire (1982) descreve a existência de uma parte da rede testicular fazendo conexão com o epidídimo. Foi demonstrado que, da rede testicular partem aproximadamente 70 ductulos eferentes espiralados. Budras e Sauer (1975) consideram que os ductulos eferentes no galo doméstico consistem de duas porções: o ductulo eferente proximal e o ductulo eferente distal. Há dois tipos celulares nesse epitélio: células ciliadas e células não ciliadas. As células não ciliadas sempre se estendem para o lúmen e apresentam vilosidades na face luminal. (Aire, 1980). As células ciliadas revestem o lúmen dos ductulos (fig. 3) e parecem não atingir a membrana basal. Os cílios projetam-se livremente para o lúmen do ductulo que, à medida que se torna mais estreito, passa a ser referido como ductulo eferente distal. O epitélio dos ductulos eferentes distais é constituído por células ciliadas e não ciliadas. Essas células não ciliadas são classificadas como tipo II. A diferença para as células não ciliadas tipo I (encontradas nos ductulos eferentes proximais) é que essas não possuem vacúolos. É encontrado também no ductulo eferente o linfócito intra-epitelial, cuja função ainda é controversa (Aire, 1980).

A morfologia dos ductulos eferentes (epitélio luminal altamente pregueado) indica que estes desempenham um papel importante na absorção do fluido seminal (fig. 4). Foi observado que, quando a atividade sexual é mínima, os ductulos eferentes são mais estreitos. Os ductulos eferentes conectam-se ao ducto epididimário via ductulos conectivos. O ducto epididimário caudalmente conecta-se com o ducto deferente. Esse, desemboca na cloaca através da papila do ducto deferente (Tingari, 1971).

## 2.2 Fisiologia do aparelho reprodutor do galo

O ciclo do epitélio dos túbulos seminíferos é também chamado de epitélio germinativo, pois originará as células germinativas masculinas, os espermatozoides. O ciclo desse epitélio compreende a sua proliferação (espermatogênese), a qual é seguida de uma fase de regressão. Essa fase de regressão é pouco estudada e consiste, principalmente, em uma grande massa de células necróticas e fraca espermatogênese (Barbier et al, 1970). Nos testículos de aves de quinze dias de idade, o epitélio

germinativo consiste, principalmente, em espermatogônias entremeadas pelas células de Sertoli. Os espermatócitos primários começam a surgir na sexta semana de vida. Como resultado da primeira etapa da divisão meiótica, surgem os espermatócitos secundários. Essas células começam a aparecer em torno da décima semana de idade. Os espermatócitos secundários sofrem a segunda etapa da meiose, originando, cada uma, duas espermátides.

Em torno da vigésima semana de idade, essas estão presentes em todos os túbulos seminíferos. Durante esse estágio, há um grande crescimento no comprimento dos túbulos, aumentando a capacidade dos testículos em produzir espermatozóides maduros. Deve ser enfatizado que as células germinativas não apresentam o mesmo grau de evolução, seguindo toda a extensão dos túbulos seminíferos.

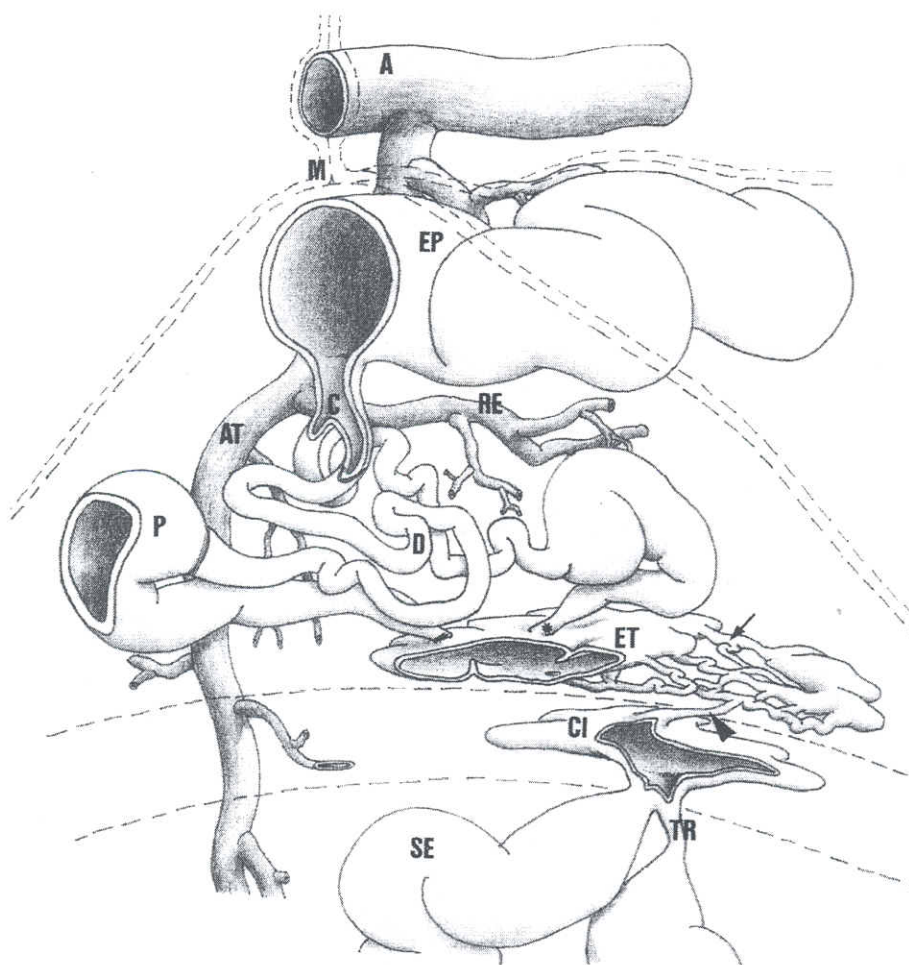


Figura 2 – Ilustração artística de Bruno Câmara de uma seqüência de ductos da região epididimária em corte transversal apresentando, túbulos seminíferos, SE; túbulos retos, TR; cisternas da rede testicular intracapsular, CI; ducto afluyente, cabeça de seta; rede de ductos intercomunicantes, seta; rede testicular extratesticular, ET; ducto efluente, asterisco; ducto eferente proximal, P; ducto eferente distal, D; ducto de junção, C; ducto do epidídimo, EP; aorta, A; artéria testicular, AT; artéria epididimária e suas ramificações, RE; mesórquio, M (Câmara, 2001).



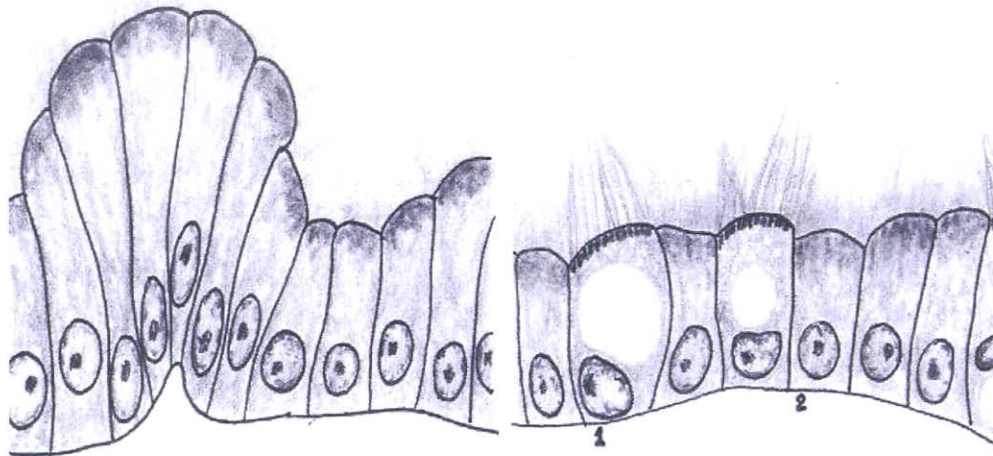


Figura 3 – Ilustração artística de Bruno Câmara de seções dos epitélios de ductulos eferentes proximais e eferentes distais. 1 - células ciliadas; 2 - células não ciliadas do tipo I. (Câmara, 2001).

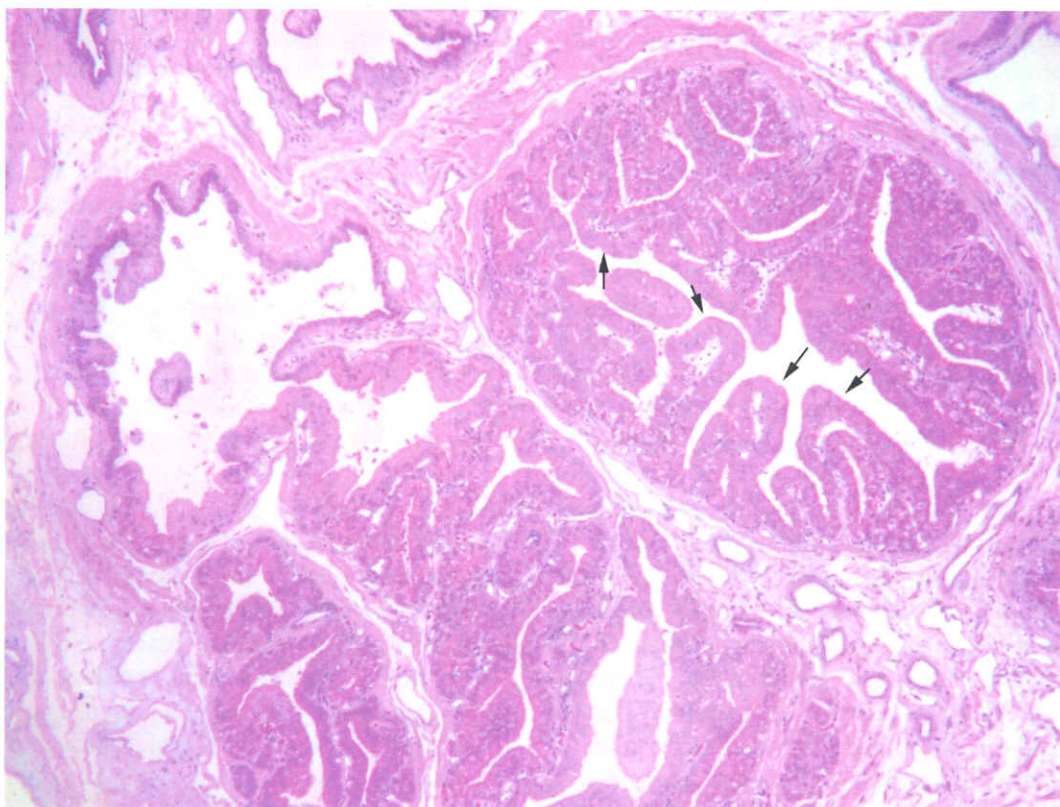


Figura 4 – Microfotografia do epidídimo de *Gallus gallus domesticus* mostrando os ductulos eferentes proximais com epitélio luminal (setas) normal pregueado (100x - PAS).

Enquanto um segmento possui apenas espermatogônias, o outro segmento já possui espermatócitos primários; e assim por diante. A esse fato dá-se o nome de onda espermatogênica (Amer et al, 1975). Os principais componentes produtores de hormônios do sistema reprodutivo são o cérebro, a glândula hipófise e as gônadas. A hipófise produz o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH atua nos testículos para estimular a produção de andrógenos. O FSH provavelmente atua nos testículos para estimular a produção de esperma.

Nos testículos, os hormônios esteróides (andrógenos), são produzidos pelas células intersticiais, ou de Leydig, sob o controle do LH. O FSH provavelmente estimula o crescimento, diferenciação e a espermatogênese nos túbulos seminíferos. À medida que o macho se aproxima da maturidade sexual, há um rápido aumento da produção de andrógenos, sob o estímulo do LH. Tanto o LH quanto o FSH são controlados pelo "hormônio liberador de gonadotrofinas" (GnRH) que é produzido no hipotálamo (Etches, 1996).

A produção de espermatozóides atinge seu máximo entre 24 e 30 semanas de idade, mantendo esse alto nível até 40 - 45 semanas de idade, e decrescendo à medida que os galos envelhecem (Brillard & McDaniel, 1985; Rosenstrauch et al, 1994).

A cópula das aves é rápida e o trato reprodutor da galinha contém reservatórios, conhecidos como "glândulas hospedeiras de esperma", localizadas na junção útero-vaginal e no infundíbulo, nas quais os espermatozóides são armazenados e sua capacidade fertilizante é mantida. Em galinhas, a capacidade de fertilização pode ser mantida por até três semanas, embora a porcentagem de ovos férteis comece a declinar depois de cinco a sete dias (Van Krey, 1993).

### 2.3 Métodos de avaliação da fertilidade

A produção espermática do galo pode ser medida pelo exame de sêmen ou pela histologia do epitélio seminífero. O sêmen é coletado por massagem abdominal. O ideal é que se faça a avaliação no início do ciclo reprodutivo. Essa técnica consiste em coletar o ejaculado em recipiente graduado, estéril e seco. Esse deve ser examinado quanto às características físicas como volume, concentração, motilidade, vigor e pH e morfológicamente quanto à patologia espermática e porcentagem de espermatozóides vivos e mortos. A motilidade é avaliada ao microscópio, em uma escala de um a seis, onde um é dado para ausência de motilidade e seis para motilidade total com turbilhão. Para se determinar anomalias nos espermatozóides, toma-se uma alíquota de 0,05 ml de sêmen e faz-se a diluição em 05 ml de formol salina para análise na microscopia de contraste de fase (Lake & Stewart, 1978; Wilson et al, 1979; Lake, 1984).

A técnica fluorimétrica mostrou ser bem precisa para avaliar a concentração e a porcentagem de espermatozóides mortos ou com defeito (Bilgili & Renden, 1984). Técnicas como a coloração por azul de Tripán (Wilson et al, 1979) ou eosina e nigrosina (Wishart e Palmer, 1986) também podem ser utilizadas para determinar a porcentagem de espermatozóides mortos.

Outro método de avaliação da fertilidade consiste em verificar a presença de disco germinativo em ovos incubados por dez dias oriundos de galinhas inseminadas artificialmente, embora esse método não seja muito preciso porque existem fatores relacionados às fêmeas que podem interferir no resultado desse teste (Rosenstrauch et al, 1994).



## 2.4 Fatores que afetam a fertilidade dos galos

### 2.4.1 Fatores comportamentais

Existe, na organização social das aves, uma hierarquia social, baseada na relação entre indivíduos submissos e dominantes entre os membros da população. De um modo geral, os machos não bicam as fêmeas; entretanto, formam uma ordem entre eles, mais relacionada à agressividade (Mauldin, 1992).

O comportamento sexual varia de acordo com a estratificação social: os machos dominantes são mais ativos do que os machos subordinados. Por outro lado, o comportamento sexual depende de ambos, machos e fêmeas; a maior frequência de cópula ocorre à tarde, coincidindo com a ausência de postura nas fêmeas e maior volume de sêmen produzidos pelos machos. As fêmeas podem evitar a cópula ou interferir na sua seqüência, prejudicando o ato (Kratzer & Craig, 1980). North (1984) observou que os galos em condições normais de criação, no período de pico de produção, realizam de dez a trinta cópulas por dia.

### 2.4.2 Fatores genéticos

#### 2.4.2.1 Genética quantitativa

Entre as características de interesse econômico, a seleção para taxa de crescimento afeta negativamente, de maneira acentuada, o desempenho reprodutivo. Pym et al (1985) verificaram que a seleção para ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, entre a quinta e nona semana de idade, levou a diminuição na eclodibilidade dos ovos. Dunnington et al (1985) observaram que a seleção para peso corporal na oitava semana de idade, produziu um declínio no número total de ovos, na eclodibilidade e na fertilidade. O incremento genético do

crescimento tem influência negativa nas características reprodutivas do macho. A correlação genética estimada e realizada entre peso corporal e motilidade do espermatozóide é negativa.

O volume de sêmen de galos selecionados para rápido crescimento é maior quando comparado ao de machos de linhas selecionadas em sentido oposto; porém, com menores concentrações de espermatozoides, menor taxa metabólica dos mesmos e aumento na incidência de gametas mortos ou anormais. Esses resultados vêm acompanhados de redução da libido e frequência de acasalamentos, determinando, conseqüentemente, uma redução no desempenho reprodutivo das linhagens. (Chambers, 1990).

Altas pressões de seleção para melhorar ou manter a fertilidade e a eclodibilidade têm se mostrado ineficientes na prática. Por outro lado, a eliminação de fêmeas e especialmente machos com baixa fertilidade evitam uma queda na fertilidade da progênie (Gowe, 1983).

#### 2.4.2.2 Efeito dos genes deletérios

Anormalidades genéticas são pouco comuns em aves; e, no caso das aberrações cromossômicas, resultam em gametas com desbalanço de material genético, o que ocasiona letalidade, semi-esterilidade e inter-sexualidade. Essas condições tendem a ser auto eliminadas. Nos galos, apenas a hipoplasia gonadal hereditária (Hgh) é conhecida. Essa patologia é caracterizada por uma baixa concentração de espermatozoides e alta incidência de patologia espermática no sêmen, reduzindo a fertilidade dos galos portadores (Crawford, 1965).

### 2.4.3 Alterações histopatológicas dos testículos e epidídimos

As alterações do sistema reprodutor das aves serão refletidas na fertilidade do lote. As modificações são subdivididas em alterações do desenvolvimento, regressivas, inflamatórias e progressivas (Thomson, 1983).

As alterações do desenvolvimento referem-se a distúrbios na formação e crescimento dos órgãos, não sendo freqüente em galos. Encontram-se em galos a hipoplasia testicular e o testículo acessório, esse não interferindo na fertilidade (Thomson, 1983; Jubb et al, 1985).

A degeneração testicular e a hipotrofia são alterações regressivas, sendo que a primeira é uma das causas mais importantes na redução da fertilidade. A degeneração é muito freqüente, podendo ser uni ou bilateral e focal ou generalizada, dependendo da causa que desencadeia o processo (McEntee, 1979). As causas de degeneração são variáveis e entre as principais, salientam-se os fatores nutricionais e de manejo (Jubb et al, 1985).

Hall et al (1983) relataram a degeneração dos testículos em aves com deficiência de vitamina A. Da mesma forma, Siller et al (1978) verificaram que a ingestão excessiva de sal e a intoxicação por fungicidas são causas freqüentes de degeneração. As alterações degenerativas no testículo culminam com distúrbios na espermatogênese, causando, principalmente, defeito de cabeça espermática (Jaenish, 1989).

Nas alterações inflamatórias, destacam-se a orquite e a epididimite. As orquites em galos geralmente aparecem com a evolução de infecções sistêmicas, sendo as salmoneloses e as micoplasmoses apontadas como importantes causas dessa alteração (Hofstad et al, 1978). A

epididimite foi descrita por Jaenish (1989) como o processo inflamatório mais freqüente. Segundo McEntee (1979), a epididimite crônica, com formação de granuloma espermático, é causada por obstrução do ducto epididimário. Jaenish & Silva (1991) observaram maior severidade dessas lesões em galos com alto peso corporal.

As alterações progressivas incluem a doença de Marek, leucose linfóide, teratoma (não é freqüente em aves), tumor das células de Sertoli e seminoma (Fredrickson & Helmboldt, 1991).

### 2.4.4 Fatores nutricionais

Antes da introdução do sistema de alimentação separada para machos e fêmeas através da utilização de comedouros que permitem acesso só para as fêmeas, e comedouros exclusivos para os machos, os índices de fertilidade dos plantéis eram muito baixos. Isso porque os galos se alimentavam no mesmo comedouro das fêmeas e devido à sua maior capacidade de competição pelo alimento, comiam praticamente à vontade, e apresentavam um peso corporal muito acima do recomendado pelos manuais de linhagem. Esse excesso de peso comprometia seriamente a fertilidade e conseqüentemente as taxas de eclosão. Após a utilização do sistema de alimentação em separado, com recomendações para o fornecimento de apenas 130g/galo/dia, aqueles galos perderam peso e em plantéis comerciais, foram observadas melhorias de até 10% na taxa de eclosão (Sexton et al, 1989).

Fontana et al (1990) demonstraram que a eclosão foi maior nos ovos originados de fêmeas que foram criadas com machos alimentados separadamente, independente do nível protéico das rações (12 ou 14%), em relação aos ovos de lotes com alimentação conjunta, cujos machos estavam mais pesados. Dois grupos com



alimentação separada receberam rações com diferentes teores protéicos (12 e 14%), diferentes valores de energia metabolizável (2.781 e 2.922 kcal/kg) e diferentes níveis de cálcio (0,89 e 3,13%), não havendo diferença de fertilidade entre os tratamentos com alimentação separada. Os diferentes níveis nutricionais não tiveram influência na concentração de sêmen.

Segundo Sexton et al (1989) e Palotta (1994), os galos alimentados "ad libitum" apresentavam uma carcaça muito grande, revelando que o tamanho e a conformação corporal são fisicamente prejudiciais para um bom acasalamento e com isto, a obtenção de uma boa fertilidade. Esses autores relataram também que, uma melhor fertilidade é obtida com machos submetidos à restrição alimentar quando comparados com machos alimentados "ad libitum". Portanto, é necessária a restrição alimentar para controlar o aumento do peso corporal e melhorar a fertilidade durante todo o período de produção.

Os efeitos da restrição alimentar podem ser tanto prejudiciais quanto favoráveis à fertilidade, de acordo com a idade em que a restrição alimentar é realizada e a intensidade do racionamento; quanto mais cedo o racionamento se inicia, melhor a fertilidade na produção. Se a restrição alimentar é feita entre a segunda e décima segunda semanas, (durante a fase pré puberal de desenvolvimento dos testículos) as conseqüências serão, principalmente, uma redução de carcaça e peso corporal do macho, com uma leve diminuição no crescimento dos testículos, já que o peso destes só começa a aumentar após doze semanas de idade, bem como a produção de sêmen e sua persistência. Se uma restrição moderada for feita mais tarde, entre doze e vinte e quatro semanas (fase puberal), a conseqüência será, principalmente, um atraso no crescimento dos testículos e, conseqüentemente, ocorrerá um atraso na maturidade sexual. Se a intensidade do

racionamento for muito forte, induzirá a um deficiente crescimento dos testículos e, em decorrência, tanto um atraso na maturidade sexual quanto uma deficiente fertilidade na produção (Buckner et al, 1984).

Deficiências de vitamina E e selênio provocam uma queda não reversível na fertilidade. Nesse caso, diferentes oxidantes danificam o tecido intersticial do testículo, comprometendo assim, o seu funcionamento normal (Adjanohoun, 1994).

#### **2.4.5 Medicamentos e produtos químicos**

O uso de alguns antibióticos e produtos químicos pode ter um efeito negativo sobre a fertilidade; que é, geralmente, reversível. A maioria dos antibióticos diminui a motilidade do espermatozóide, por um período limitado de tempo. Isso diminuirá levemente a fertilidade (não mais que 5%), pelo menos por uma semana. Os maiores efeitos indesejáveis acontecem com as sulfonamidas, que destroem alguns dos estágios intermediários da diferenciação das células germinativas: espermátócitos I e II, ou espermátides. Isso interrompe a produção de espermatozoides e a fertilidade pode cair em mais de 50%, até que as células germinativas recriem os estágios destruídos. A queda de fertilidade não duraria mais que três semanas, que é o tempo total da espermatogênese em galos. Entretanto, esse período para a fertilidade voltar ao nível anterior tende a ser maior. Na medicação prática habitual de galos, todos os tipos de antibióticos podem ser usados para machos, geralmente com poucos ou nenhum problema detectável. Exceto para as sulfonamidas que não são recomendadas depois de dezesseis semanas de idade, durante a fase puberal, visto que podem reduzir o crescimento exponencial do testículo e afetar a fertilidade do plantel e durante a fase de produção, para evitar uma acentuada queda na fertilidade, que poderá durar de três a seis semanas (Adjanohoun, 1994).



#### 2.4.6 Idade

De acordo com Jones et al (1967) entre os diversos fatores que podem mudar a capacidade de fertilização dos machos, a idade é um dos principais.

Lake (1989) relatou que a queda da fertilidade, a partir das 45 semanas de idade dos galos foi acompanhada de redução do número de espermatozoides no volume ejaculado. A literatura cita ainda que os galos nessa fase, acima de 45 semanas de idade, apresentam libido diminuída e menor número de cópulas férteis (Wilson et al, 1979).

Hocking (1989) mostrou que, a correlação entre o volume de sêmen e idade é negativa. Uma prática que pode ser utilizada para evitar queda de fertilidade devido à idade é a substituição de galos velhos por novos. Tal procedimento proporciona bons resultados, embora onerem a produção, devido ao elevado preço dos reprodutores (Branco, 1994).

Utilizando galos Cornish, Rosenstrauch et al (1994) avaliaram a fertilidade dos galos às 32, 48, 70 e 110 semanas de idade, obtendo, respectivamente, os valores de 95, 90, 75 e 15%. Observaram também redução na concentração espermática do sêmen. O epitélio seminífero dos galos em teste foi examinado através de microscopia eletrônica e foi detectada redução do diâmetro das células de Sertoli e elevação do número de espermatozoides retidos pelas mesmas, de acordo com o aumento da idade, exceto em machos de fertilidade muito baixa. A fertilidade também foi avaliada através do exame de ovos incubados por 10 dias, oriundos de galinhas inseminadas artificialmente, observando-se da mesma forma a redução da fertilidade com o aumento da idade.

#### 2.4.7 Fatores ambientais

##### 2.4.7.1 Temperatura

A melhor temperatura para ótima espermatogênese está entre 15 e 20° C. Na produção, a fertilidade normalmente não é afetada por temperaturas baixas (6 ou 7° C), desde que os machos sejam alimentados corretamente. Temperaturas abaixo de 6° C podem levar a queda de fertilidade devido à redução das atividades do galo. Por outro lado, temperaturas acima de 30° C, levarão a queda na espermatogênese. Em épocas quentes, observou-se uma fertilidade menor em 2 a 3% do que a alcançada em estações frias (Adjanohoun, 1994).

##### 2.4.7.2 Programas de luz

A escolha e o planejamento do regime de iluminação a ser utilizado serão determinados pelo objetivo da produção (engorda, postura, criação de matrizes) e pelas condições existentes de alojamento. Instalações com iluminação controlada permitem um domínio maior das funções reprodutivas. Em um aviário com luz controlada, a duração do dia e do ciclo luz-escuro, deve ser decidido para cada fase do ciclo produtivo (Etches, 1996).

Durante o período pré-puberal (anterior a 12 semanas de idade), um fotoperíodo constante não tem nenhum efeito no desenvolvimento dos testículos. Entretanto, durante o período puberal (após 12 semanas de idade), a utilização de um fotoperíodo crescente tem um grande efeito na antecipação da puberdade. A utilização de fotoperíodos curtos e constantes (08 horas) retardarão a puberdade em duas a quatro semanas, mas evitarão uma queda posterior no peso dos testículos, na produção e aumentarão a produção de sêmen. Por outro lado, fotoperíodos longos (16 horas) e constantes anteciparão a puberdade, mas irão acelerar a regressão do peso dos testículos e levarão a uma queda na

produção de sêmen, no final da fase de produção. Um aumento na duração do dia, antes de 18 semanas de idade, adiantará a puberdade. Tal estímulo de luz pode superar o atraso causado por uma restrição alimentar moderada. Desse modo, a fotoestimulação associada à restrição alimentar ajudará a controlar o aumento do peso corporal na cria, sem retardar a puberdade (Adjanooun, 1994).

#### 2.4.8 Proporção macho: fêmea

Craig et al (1977) estudaram a proporção entre machos e fêmeas, durante a fase de reprodução, em uma população de White Leghorn. Foram utilizadas as proporções 1:24, 1:12 e 1:8. Apesar do tratamento com menor número de machos ter apresentado uma menor taxa de fertilidade, as diferenças não foram significativas.

Zuin (1998) utilizando 24 galos e 240 galinhas da linhagem Ross com 54 semanas de idade nas proporções de 1:5, 1:10 e 1:15 encontrou que, os índices de fertilidade dos três tratamentos foram considerados equivalentes ( $p > 0,05$ ).

#### 2.5 Litíase Epididimária

A região epididimária do trato reprodutivo do macho é essencial para a maturação espermiática e, desordens nessa região resultarão em infertilidade. Os ductos eferentes compõem 70% da região epididimária. Suas funções incluem absorção de fluido, transporte e concentração de esperma, fagocitose e secreção de proteínas (Janssen et al, 2000).

Janssen et al (2000) observaram em galos adultos o desenvolvimento de cálculos no epidídimo e conseqüentemente, queda de fertilidade. Cistos nos ductos eferentes foram primeiramente observados em galos White Leghorn com idade entre 18 e 26 semanas. Essas aves, quando comparadas com machos normais apresentavam redução

da fertilidade. O número e o tamanho dos cálculos aumentaram com a idade. Às 62 semanas de idade a produção diária de espermatozoides e os níveis de testosterona estavam significativamente menores em galos com litíase. Esses cálculos estavam presentes em 75% dos 141 galos estudados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Boltz et al (2004), que estudaram galos Leghorn SPF afetados pela litíase, com redução da massa testicular ( $12,01 \pm 0,76g$ ) quando comparados aos sem cálculos ( $15,2 \pm 0,81g$ ). A concentração de testosterona sanguínea também estava significativamente reduzida em galos acometidos ( $3,6 \pm 0,3$  ng/ml) quando comparada aos normais ( $7,0 \pm 1,63$  ng/ml). A produção diária de espermatozoides nos acometidos com cálculos estava reduzida ( $5,03 \pm 0,31 \times 10^8$  espermatozoides/testículo/dia) quando comparada com os normais ( $7,43 \pm 0,52 \times 10^8$  espermatozoides/testículo/dia).

A histologia do trato reprodutivo revelou inflamação crônica no epidídimo com abundante infiltrado mononuclear predominantemente de linfócitos. No epitélio havia descamação ou então a completa destruição do mesmo. Os autores indicaram duas hipóteses para o aparecimento dos cálculos. A primeira seria o resultado de uma possível infecção pelo vírus da bronquite infecciosa. A segunda devido à elevada concentração de cálcio ou vitamina D3 nas dietas (Janssen et al, 2000).

Em estudo realizado por Mahecha et al (2002), foram encontrados cálculos em 94,3% dos galos examinados. Esses galos foram divididos em três grupos: (1) caipiras, (2) White Leghorn e (3) Ross. Todas as aves eram provenientes do estado de Minas Gerais. O primeiro grupo consistia de 22 aves com 70 – 106 semanas de idade. O segundo era composto de 10 aves com idades variando entre 82 – 96



semanas. Tanto o primeiro quanto o segundo grupos não eram vacinados contra nenhuma das doenças da avicultura industrial. O terceiro era de três galos com 70 semanas de idade vacinados contra bronquite infecciosa e outras doenças. Além dos galos, foram examinadas 21 espécies de aves silvestres (perdiz – *Rhynchotus rufescens*, codorna do campo – *Nothura maculosa*, ema – *Rhea americana*, mergulhão – *Podilymbus podiceps*, biguá – *Phalacrocorax olivaceus*, garça-branca – *Egretta thula*, urubu – *Coragyps atratus*, gavião cará-cará – *Polyborus plancus*, gavião carijó – *Buteo magnirostris*, jacú – *Penelope superciliosa*, rolinha cascavel – *Scardafella squamata*, papagaio verdadeiro – *Amazona aestiva*, guanu preto – *Crotophaga ani*, coruja da igreja – *Tyto alba*, corujinha-do-mato – *Otus choliva*, coruja buraqueira – *Speotyto cunicularia*, mãe-da-lua – *Nictibius griseus*, curiango – *Nyctidromus albicollis*, martin-pescador – *Chloroceryle amazona*, tucano – *Rhamphastus toco* e pica-pau – *Chrysoptilus melanochlorus*) e 4 de aves domésticas (pato doméstico – *Anas platyrhynchos*, codorna doméstica – *Coturnix coturnix*, pombo – *Columba livia* e peru – *Meleagris gallopavo*). Cálculos não foram encontrados em nenhuma dessas aves, sugerindo ser uma doença exclusiva de galos.

Micro análises mostraram que os cálculos eram compostos de 43,5% de cálcio, 28% de oxigênio, 23,5% de carbono, 1,0% de enxofre, 0,3% de magnésio, 0,3% de sódio e 0,2% de fósforo. Todos os galos com litíase apresentavam alterações nos ductos eferentes (Mahecha et al, 2002). Cálculos encontrados por Janssen et al (2000) apresentavam 48% de cálcio, 0,94% de magnésio e 0,18% de fósforo.

O teste ELISA para anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) nas aves estudadas por Mahecha et al (2002) revelaram serem todas negativas nos

grupos 1 e 2. Também não foram encontradas correlações entre peso de testículo e concentração de cálcio na água e entre número de cálculos nos ductos eferentes e concentração de cálcio na água. Foi também rejeitada a hipótese de que a origem dos cálculos poderia ter como causa a suplementação com vitamina D3, uma vez que um dos grupos estudados nesse experimento era de galos caipiras que nunca receberam suplementação.

Boltz et al (2004) trabalharam com galos Leghorn SPF divididos em dois grupos. O primeiro grupo recebeu vacina de bronquite infecciosa das galinhas (BIG) estirpe Mass, administrada via oral às 2, 4, 10 e 14 semanas de idade. O segundo grupo não recebeu a vacina. As 26 semanas de idade, o sangue desses galos foi coletado para determinar a concentração de testosterona e após isso, o trato reprodutivo foi retirado para analisar a produção espermática diária e detectar cálculos epididimários. Nove dos doze galos vacinados apresentaram cálculos, já os que não receberam a vacina não desenvolveram a patologia. A concentração de testosterona sanguínea estava significativamente reduzida em galos vacinados com cálculos ( $3,6 \pm 0,3$  ng/ml) quando comparados com os não vacinados ( $7,0 \pm 1,63$  ng/ml). O peso testicular e a produção diária de espermatozoides também estavam reduzidos nos galos vacinados acometidos pelos cálculos. Os autores concluíram que o uso da vacina viva atenuada para BIG aumenta a incidência de cálculos epididimários em galos, resultando em redução da produção de esperma e declínio da concentração de testosterona sanguínea.

Jackson et al (2006) imunizaram galos SPF Leghorn antes do período de puberdade com uma vacina viva atenuada para BIG. O primeiro grupo (vacinado) era composto de 38 aves e recebeu vacina viva atenuada contra a BIG (estirpe Mass) às 02, 06 e 10 semanas de idade. O segundo grupo (não

vacinado) era composto de 33 galos. A região epididimária do grupo vacinado esteve normal até as 16 semanas de idade. Entretanto, descamação celular, agregação de espermatozoides, macrófagos e cálculos estavam presentes nos ductos eferentes proximais no grupo vacinado às 20 e 26 semanas de idade. Cálculos ocorreram também no grupo não vacinado (25% das aves) às 26 semanas de idade, mas em uma frequência menor que no grupo vacinado (57%). Os autores sugeriram que a infecção por IBV pode contribuir na patogenia.

Diferente dos resultados encontrados por Boltz et al (2004), Jackson et al (2006) estudaram galos SPF não vacinados para bronquite infecciosa com cálculos numa proporção de 25% às 26 semanas de idade. Foi uma frequência menor do que o grupo dos vacinados (57% apresentaram cálculos). Os autores sugeriram que a vacinação antes do período da puberdade em galos acelera a formação dos cálculos, mas não é a causa do processo.

Boltz et al (2006) utilizaram a vacina inativada de bronquite infecciosa (estirpe Mass) para determinar se ocorreriam cálculos epididimários como ocorreram galos em vacinados com a vacina atenuada. Nesse experimento, os galos foram divididos em três grupos: não vacinados, vacinados com a vacina viva atenuada (estirpe Mass) e vacinados com a vacina inativada. Os galos foram vacinados as 2, 6, 10 e 14 semanas de idade e a região epididimária foi observada as 27 semanas de idade. Cálculos epididimários estavam presentes em 13% das aves não vacinadas, 50% das vacinadas com a inativada e 64% das vacinadas com a atenuada. Os resultados mostraram que o uso da vacina inativada não reduziu a incidência de cálculos no epidídimo que são observados em galos imunizados com a vacina viva atenuada. Os autores não encontraram diferenças estatísticas no peso dos testículos dos três grupos analisados. Já a produção

diária de espermatozoides estava reduzida tanto no grupo imunizado com a vacina inativada quanto a atenuada.

Madeu et al (2005) testaram a hipótese de um agente infeccioso como causa da litíase epididimária. Para isso, macerados de epidídimos de galos com litíase epididimária foram cultivados em meio DMEM e posteriormente, 100 µl da cultura foram injetados na membrana cório-alantóidea de ovos de galinha White Leghorn com nove dias de incubação. A mesma quantidade dessa cultura foi injetada via intraperitoneal em 36 codornas machos (*Coturnix coturnix*) adultos. Todos os galos provenientes de ovos injetados com macerado epididimário e sacrificados com dez meses de idade, apresentaram, na região dos ductos eferentes abundante infiltrado de células mononucleares, descamação do epitélio e numerosos cálculos obstruindo o lúmen. As codornas não desenvolveram a doença. Os resultados do trabalho indicaram que a litíase epididimária é uma doença de natureza infecciosa, que se desenvolve exclusivamente em galos domésticos.

### **2.5.1 Lesões observadas nos testículos e vias genitais dos galos afetados**

As primeiras lesões observadas por Janssen et al (2000) ocorreram no epidídimo de galos entre 18 e 26 semanas de idade. Nessas aves, foram encontradas formações císticas, esféricas, lisas e repletas de fluido transparente na região epididimária. Acima de 26 semanas de idade, os cistos tornaram-se sólidos, irregulares e com cálculos amarelo-esverdeados no seu interior. O tamanho e o número de cálculos aumentam com a idade. Análises feitas por esses autores mostraram que as lesões são inicialmente mais simples, e à medida que o processo avança, elas tornam-se mais complexas. Os cálculos foram encontrados somente em galos maduros sexualmente.



### 2.5.1.1 Lesões observadas no epitélio dos ductos eferentes

A primeira modificação detectada no epitélio dos ductos eferentes é o aumento no número de lisossomas das células não ciliadas. Em galos não afetados pela litíase, em cada célula epitelial, são observados em média, até oito lisossomas, enquanto que nos afetados, o número é visivelmente maior. Também é observado o aumento do tamanho dos lisossomos. Análises determinaram que o aumento no volume dos lisossomos ocorre por fusão dessas organelas e pela formação de lisossomos secundários (Geraldo, 2005).

Nas regiões onde ocorrem dilatação e perda do pregueamento dos ductos eferentes, é detectada a presença de vacúolos que podem chegar a ocupar todo o citoplasma celular. Essa vacuolização das células ciliadas e não ciliadas é causada pela ruptura das membranas das células do epitélio dos ductos eferentes. A perda das membranas plasmáticas é seguida pela formação de vacúolos que contêm organelas em processo de lise. Ocorre a ruptura das membranas dos retículos endoplasmáticos liso, rugoso e lisossomos. A ruptura das membranas lisossomais permite a saída de enzimas para o citoplasma, o que resulta em lise de organelas. Ocorrem lesões no ápice das células e as células ciliadas perdem os cílios. Há ruptura das membranas apicais, levando à saída do conteúdo citoplasmático para a luz dos ductos. A fragmentação e a ruptura da membrana basal contribuem para a descamação do epitélio dos ductos eferentes (Mahecha et al, 2002; Geraldo, 2005).

### 2.5.1.2 Lesões observadas no tecido conjuntivo

As lesões consistem em intensa infiltração de células inflamatórias mononucleares (macrófagos e linfócitos) e alterações no

endotélio dos vasos, com formação de coágulos e desprendimento das células endoteliais. Em estágios avançados (processo inflamatório crônico), ocorre inicialmente a fibroplasia até a total substituição do epitélio dos ductos eferentes por tecido conjuntivo fibroso. Com a perda do epitélio, os cálculos entram em contato diretamente com o tecido conjuntivo, que com isso, pode sofrer descamação. (Janssen et al, 2000; Geraldo, 2005). Foi observado no lúmen dos ductos eferentes acúmulo de espermatozóides, possivelmente relacionado às lesões das células epiteliais que perdem ou reduzem sua capacidade de reabsorção, resultando em acúmulo de fluido testicular. Esse processo leva a dilatação dos ductos eferentes com diminuição do pregueamento do epitélio. A descamação das células epiteliais que se juntam aos espermatozóides e as células que descamam dos testículos irão formar aglomerados celulares no lúmen. Esses aglomerados se organizam formando massas compactas. Posteriormente, essas massas sofrem calcificação, resultando nos cálculos dos ductos eferentes. Após sua formação, ocorre o deslocamento desses cálculos para o ducto epididimário (Mahecha et al, 2002; Geraldo, 2005).

### 2.6 Nanobactérias e formação de cálculos

A nanobactéria é um microrganismo atípico, detectado em sangue de bovino e de humano. Trabalhos (Amaro, 2003; Çiftçioglu et al 1999) sugerem que esses microrganismos podem iniciar nos rins a formação de cálculos. Çiftçioglu et al (1999) acreditam que a formação de cálculos renais em humanos é devida a nanobactérias em mecanismo análogo a *Helicobacter pylori*. Os autores concluíram que a eliminação da infecção por *H. pylori* poderia representar uma nova terapia para pacientes com cálculos renais. Amaro (2003) descreveu que outros estudos recentes têm sugerido que as formações de

cálculos de cálcio nos rins poderiam ter origem infecciosa. A nanobactéria, encontrada em células de rins humanos, poderia ser capaz de formar uma camada de fosfato que serviria como centro de cristalização para a formação do cálculo. Não há até o momento presente, descrições de nanobactérias causando a formação de cálculos em aves.

## 2.7 Importância do cálcio e da vitamina D3

O íon cálcio é importante para reações intracelulares, incluindo a contração muscular, a atividade celular nervosa, a liberação de hormônios por exocitose e a ativação de enzimas. As funções extracelulares incluem a coagulação sanguínea, manutenção e estabilidade de membranas celulares, bem como a manutenção da integridade estrutural de ossos (Stabenfeldt, 1993).

Na litíase epididimária, ocorre a formação de cálculos ricos em cálcio na região epididimária, levando a infertilidade precoce. O segmento mais afetado pela doença são os ductos eferentes, os quais, nas aves, são responsáveis pela reabsorção de significativas quantidades de cálcio. O mecanismo de transporte transépitelial de cálcio é dependente da vitamina D3 e seus receptores VDR, que podem ser encontrados em grandes quantidades nos ductos eferentes. Dornas et al (2006) trabalharam com quatro galos afetados pela litíase (Leghorn e Ross) e quatro não afetados (caipiras). Os afetados apresentavam cálculos e os não afetados não os tinham na região epididimária. Os procedimentos utilizados (imunohistoquímica e Western Blot) revelaram aumento da expressão de VDR nos galos afetados quando comparados àqueles isentos da doença. Os autores sugeriram que a litíase epididimária pode ter sua origem em um desequilíbrio na ação da vitamina D3 e/ou seus receptores.

Rutz et al (1999) alojou individualmente em gaiolas 60 galos Leghorn de oito meses de idade, visando investigar o efeito do cálcio dietético no desempenho reprodutivo. Os galos foram alimentados com três rações: T1 – dieta sem suplemento de cálcio; T2 – dieta contendo 1% de cálcio e T3 – dieta contendo 3,5% de cálcio. Os galos foram submetidos a coleta diária de sêmen, sendo esse avaliado durante 56 dias. Foram feitas inseminações artificiais aos 28 e 56 dias do período experimental. Características como volume seminal, produção de espermatozoides, motilidade espermática e fertilidade dos ovos não foram influenciados pelos tratamentos. Os autores concluíram que nível dietético de cálcio de 3,5%, comumente utilizado para poedeiras, pode ser utilizado para galos Leghorn, sem detrimento no seu desempenho reprodutivo.

## 2.8 Bronquite Infecciosa

Quase todos os trabalhos publicados, com exceção de Mahecha et al (2002) sugerem o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) como o (ou o principal) agente para o desenvolvimento da litíase epididimária em galos (Janssen et al, 2000; Boltz et al, 2004 e 2006 e Jackson et al, 2006).

O IBV é classificado no gênero *Coronavirus* da família *Coronaviridae*. A BIG é uma doença viral aguda altamente contagiosa, comumente associada à doença respiratória devido a sua replicação primária ser nas células epiteliais da traquéia, atingindo vários sistemas, reprodutivo, digestivo e respiratório (Cavanagh, 1994; Boltz et al, 2006).

Esse vírus é, talvez, o que se dissemina mais rapidamente entre as aves, não necessitando de vetores para a sua transmissão, que ocorre de ave doente à ave sadia por contato direto ou indireto. Os portadores podem transmitir o vírus até dois meses depois da infecção inicial e as aves



recuperadas permanecem susceptíveis a uma outra infecção por outro sorotipo (Di Fabio & Rossini 2000). A vacinação tem sido usada com pouco sucesso para prevenção da BIG. Estudos recentes mostraram associação entre a vacinação com formação de cálculos epididimários e redução da produção espermática. O vírus da bronquite infecciosa foi isolado do sêmen de galos infectados. Foi demonstrado que, o vírus é replicado na cultura de tecido epididimário. Os autores sugeriram que a formação de cálculos epididimários é o resultado direto da infecção do vírus da bronquite infecciosa na região epididimária (Boltz et al, 2006).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Procedência do material**

Os testículos foram coletados de galos originados de criações comerciais de matrizes das linhagens Leghorn, Hy-line, Cobb, Ross e caipiras. Foram utilizados 40 galos provenientes de três regiões do Brasil – Centro Oeste, Sudeste e Sul (fig. 5). Os galos foram divididos em oito grupos com cinco aves cada, de acordo com a procedência. Os testículos dos grupos um e dois foram compostos de galos da linhagem Leghorn SPF provenientes de Uberlândia e Belo Horizonte, respectivamente. Os galos SPF de Belo Horizonte foram criados em condições não controladas, sob desafio limitado de agentes infecciosos e parasitários, mas sem indicações clínicas, patológicas ou sorológicas de desafio por IBV. Os testículos do grupo três foram compostos de galos caipiras de Ubari, localizado na zona da mata de Minas Gerais. Os testículos do grupo quatro eram de galos caipiras provenientes de Castelo, interior do Espírito Santo. Os testículos do grupo cinco eram de galos Leghorn SPF oriundos de Vargem Grande Paulista, cidade pertencente à grande São Paulo. Os testículos do grupo seis eram de galos Hy – Line provenientes de Nova Granada, norte

do estado de São Paulo. Os testículos do grupo sete eram compostos de galos da linhagem Cobb provenientes de Videira, município de Santa Catarina. Os testículos do grupo oito eram de galos Ross vindos do município de São Gabriel no estado de Goiás. Em cada grupo, os galos foram individualmente identificados. Essa identificação foi utilizada para todos os procedimentos de avaliação.

#### **3.2 Local**

As análises histológicas de microscopia óptica e eletrônica do epitélio seminífero e da região epididimária foram realizadas no Laboratório de Biologia da Reprodução (LABRE) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. O ELISA foi realizado no setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte – MG.

#### **3.3 Estudos realizados**

##### **3.3.1 Peso e características morfológicas dos testículos e epidídimos**

Após o sacrifício dos galos, por estiramento vertebral, os testículos e epidídimos foram removidos das carcaças e examinados macroscopicamente. Em seguida foram colocados em frascos identificados contendo os fixadores formol salina a 10%, tamponada para pH 7,2 ou solução de Bouin. Após sua chegada ao LABRE, foram pesados individualmente em uma balança de precisão (0,01 g) Sartorius BP 2105. De cada testículo e cada epidídimos foram retirados 12 fragmentos correspondentes às regiões cranial, medial e caudal. Os fragmentos foram submetidos a lavagens com álcool 70% a fim de retirar todo o fixador. Os fragmentos foram então descalcificados em líquido de Perenji.





Figura 5 – Mapa do Brasil mostrando as regiões das linhagens industriais em preto e aves caipiras em vermelho (Microsol, 2007).

Após esse procedimento, os fragmentos destinados à microscopia de luz foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina e glicolmetacrilato. As peças incluídas em glicolmetacrilato foram cortadas em seções de 05 micrômetros com navalha de vidro em micrótomo Reichert. Essas seções foram coradas em azul de toluidina 1%. Os cortes incluídos em parafina foram cortados em seções de 07 micrômetros, laminados e corados pela técnica de hematoxilina – eosina. As preparações obtidas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus com filme de 100 asa.

Os fragmentos destinados à microscopia eletrônica de transmissão foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2,5 %, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 a 4° C, por três horas e novas lavagens nesse tampão foram efetuadas. O material foi desidratado em

série crescente de etanol, seguida de três banhos de acetona e pré-infiltradas em resina composta de uma mistura de Araldite e Epon 812 com acetona, em iguais proporções. A infiltração foi feita com resina pura e a inclusão orientada das peças em cápsulas de plástico. Cortes semi-finos (0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ ) foram obtidos com navalha de vidro de seis milímetros de espessura, adaptada a ultra-micrótomo.

Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidinaborato de sódio para se estudar a orientação dos cortes ultrafinos (60 a 100 nm). Esses foram obtidos usando navalha de diamante, acoplada ao ultra-micrótomo, montados em tela de cobre de 200 ou 300 aberturas / polegada e contrastados pelo acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo.

O material foi analisado em Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM 10 A

do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram feitas microfotografias dos preparados e realizadas cópias em papel F3 da Kodak.

### 3.3.2 ELISA

#### 3.3.2.1 Padronização

Este ELISA foi padronizado seguindo os protocolos propostos previamente (Harlow & Lane, 1988; Hudson & Hay, 1989; Cardozo et al, 1999; Souza et al, 2000) para outras especificidades. Placas de ELISA foram sensibilizadas com diluições de cultivo de nanobactéria, em base 2, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, de 1:50 a 1:204.800. As lavagens entre cada etapa do ensaio foram feitas com PBS-T 20 0,05%. Antígeno afixado na placa foi detectado com soro de galos positivos para litíase epididimária, diluídos entre 1:50 e 1:204.800 na placa controle positivo. Nas placas sensibilizadas foram testados a 1:50 soros de aves sem litíase epididimária, jovens após o catabolismo dos anticorpos maternos (35 dias de vida). Anticorpo especificamente aderido foi detectado com conjugado anti-IgG de galinha (molécula inteira; SIGMA, EUA). O conjugado foi detectado com substrato pNPP (paranitrofenil fosfato) 1mg/ml em tampão de dietanolamina pH 9,8. A leitura foi realizada no leitor BioRad modelo 550 em comprimento de onda de 405 nm (contraste 415 nm). O cultivo de nanobactéria foi obtido no ICB – UFMG, em meio DMEM, sem soro fetal bovino a 34°C com período de incubação de três meses.

#### 3.3.2.2 Teste

Os soros-teste foram avaliados com antígeno a 1:200 e os soros a 1:100. Foram feitas cinco lavagens com PBS – Tween 20 0,05% (SIGMA, EUA). Os soros foram diluídos a 1:100 e a reação por 1 h/37°C em

PBS – T e o conjugado anti-IgG de galinha (SIGMA A 9171) a 1:35000/30 min/37°C em PBS – T. Substrato pNPP (SIGMA, EUA) a 1 mg/ml em tampão de dietanolamina em pH 9,8. A leitura foi realizada após 24 horas/4°C no leitor BioRad modelo 550 em comprimento de onda de 405 nm (contraste 415 nm). Foram utilizados nesse teste os soros de 12 galos da linhagem White Leghorn com 35 semanas de idade, um galo caipira com aproximadamente 80 semanas de idade, 15 frangos de corte com 35 dias de idade da linhagem Cobb e 32 galinhas da linhagem Cobb em período de produção. Para o controle negativo foram utilizados soros de 10 codornas machos, 08 avestruzes e 14 pombos. Para essas análises foram retirados aproximadamente 03 ml de sangue de cada ave.

### 3.4 Análise estatística

Foi feita uma análise de variância. A variável de distribuição normal (peso dos testículos) foi analisada pelo Procedure GLM do SAS e verificada uma significância de 5% de probabilidade. Após verificada essa significância, foi feita uma comparação de médias para cada fonte de variação, mediante o teste de Duncan. As correlações foram feitas com o coeficiente de Spearman, que é o ideal para dados não paramétricos (Sampaio, 1998).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Prevalência da litíase epididimária por região e linhagem

As regiões de Uberlândia e Belo Horizonte – MG, Nova Granada – SP, Videira – SC e São Gabriel – GO apresentaram 100% de prevalência da litíase epididimária. A região de Vargem Grande Paulista – SP apresentou 80% de prevalência. Ubari – MG e Castelo – ES apresentaram 60 e 40% de prevalência da litíase respectivamente. Os galos Leghorn SPF provenientes de



Uberlândia – MG e Vargem Grande Paulista – SP apresentaram prevalências de 100 e 80% respectivamente, mostrando que o vírus da BIG não teve ação como agente causal desse processo. Essa informação vai contra os trabalhos publicados por Janssen (2000) e Boltz (2004) que apontam esse vírus como o (principal) agente da litíase epididimária. Mahecha et al (2002) trabalhando com galos White Leghorn em Minas Gerais encontraram uma alta incidência da litíase e o ELISA de seus galos revelaram serem todas negativas para BIG. Não foram encontradas diferenças significativas entre linhagens comerciais de matriz pesada (Cobb e Ross) e as de matriz leve (Leghorn e Hy-Line). Já a prevalência média da doença em aves caipiras ficou em 50%. Isso pode ser um indicativo de que aves industriais sejam mais susceptíveis à doença que as caipiras (tabela 1).

As ocorrências de litíase indicam alta disseminação da doença, tanto em galos caipiras (40 – 60%), como industriais (100%) e de linhagens SPF especiais para pesquisa (80 – 100%). Os resultados mais

surpreendentes são os encontrados para as linhagens SPF (tabela 2). Estes plantéis são mantidos em condições de biossegurança estrita, em galpões com ambiente controlado. Todos os lotes são monitorados para todos os agentes infecciosos e parasitários conhecidos, incluindo IBV de 04 sorotipos diferentes.

#### 4.2 ELISA

Não foram detectados títulos de anticorpos para nanobactéria nos frangos Cobb com 35 dias de idade (0,146). Frangos com essa idade não possuem mais anticorpos maternos (imunidade passiva) (Toivanen, 1987). Valores abaixo de 0,184 (controle negativo + 3 desvios-padrão) foram considerados negativos. A ausência de títulos nos frangos de corte poderia permitir a hipótese de que essas aves não foram desafiadas. Outra possibilidade seria a imaturidade do sistema reprodutor. Os frangos de corte são jovens e estão com o sistema reprodutor infantil. Seria possível que as condições para a infecção epididimária ainda não estejam ideais.

Tabela 1 – Prevalência da litíase epididimária por grupo, região e linhagem.

Grupo	Região	Linhagem	Nº. de aves <sup>1</sup>	Prevalência <sup>2</sup>
1	Uberlândia – MG	Leghorn – SPF	5	100%
2	Belo Horizonte - MG	Leghorn – SPF <sup>3</sup>	5	100%
3	Ubari – MG	Aves caipiras	5	60%
4	Castelo – ES	Aves caipiras	5	40%
5	Vargem Grande – SP	Leghorn – SPF	5	80%
6	Nova Granada – SP	Hy-Line	5	100%
7	Videira – SC	Cobb	5	100%
8	São Gabriel – GO	Ross	5	100%

1- número de aves; 2 – prevalência da litíase; 3 – galos Leghorn SPF criados em condições não controladas.

Tabela 2 – Certificado de qualidade de lote SPF. Unidade de Uberlândia – MG.

Agentes Aviários	Antígenos	Testes	Resultado
Bronquite Infecciosa das Galinhas	Ark 99	HI/SN/EIA <sup>1</sup>	Negativo
Bronquite Infecciosa das Galinhas	Conn A5968	HI/SN/EIA <sup>1</sup>	Negativo
Bronquite Infecciosa das Galinhas	JMK	HI/SN/EIA <sup>1</sup>	Negativo
Bronquite Infecciosa das Galinhas	Mass 66579	HI/SN/EIA <sup>1</sup>	Negativo

1 – inibição da hemaglutinação (HI), soroneutralização (SN), ensaio imuno enzimático (EIA).

As galinhas apresentaram os mais altos níveis de anticorpos (0,425) o que indica presença de infecção nas mesmas. Faz-se necessário investigar nas fêmeas sítios onde possam ocorrer mineralização (ossos, útero). Ainda não foram encontrados cálculos nas fêmeas. Tanto os galos Leghorn (0,278) quanto o galo caipira (0,253) apresentaram também altos níveis de anticorpos (figura 6).

### 4.3 Peso testicular, linhagem e idade

Com relação à linhagem, o que se observou foi que os galos Hy-Line com 68 semanas

de idade apresentaram maiores pesos testiculares, mas não apresentaram diferenças significativas para os galos Cobb e Ross (35 e 52 semanas respectivamente). Essas linhagens apresentaram diferenças significativas para os galos Leghorn e caipiras (tabela 3). Rocha Jr. (2000) e Zuin (1998), trabalhando com galos de matriz pesada, encontraram diferenças significativas entre o peso dos testículos de galos no pico e no final do período reprodutivo. Os galos no pico de produção apresentaram testículos mais pesados do que os galos no final de vida produtiva.

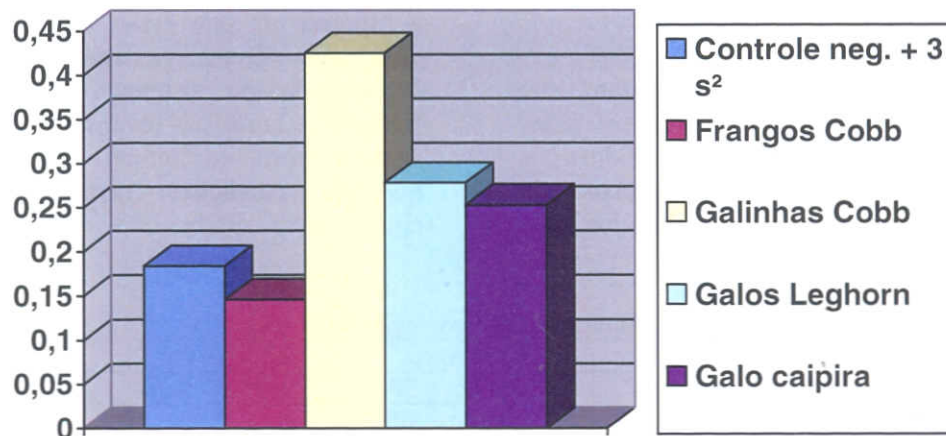


Figura 6 – Resultados do ELISA para anticorpo contra nanobactéria em frangos de corte da linhagem Cobb com 35 dias de idade, galinhas Cobb em período de produção, galos Leghorn e galo caipira adultos.

Tabela 3 – Efeitos da linhagem sobre o peso médio dos testículos de acordo com a idade.

Linhagem	Peso testicular médio (n = 05)	Idade (média)
Leghorn – SPF	10,327 ± 0,66 g	92 semanas
Hy-Line	16,535 ± 0,81 g	68 semanas
Cobb	15,427 ± 1,01 g	35 semanas
Ross	15,553 ± 0,78 g	52 semanas
Caipira	10,071 ± 0,84 g	80 semanas



#### 4.4 Lesões macroscópicas

As lesões observadas nos epidídimos (figura 7) consistem de grumos brancos (cálculos) visíveis através da serosa.

#### 4.5 Lesões microscópicas

##### 4.5.1 Testículos

Os galos analisados nesse experimento apresentaram diferentes lesões testiculares. Na análise dos cortes histológicos, parte dos túbulos seminíferos apresentou áreas com descamação do epitélio germinativo e áreas totalmente sem epitélio. Geralmente essas lesões estavam próximas à região epididimária. Alguns túbulos seminíferos apresentaram dilatados (figura 8) e outros com obstrução da luz. Nos quadros mais avançados observou-se proliferação de

tecido conjuntivo fibroso, caracterizando atrofia testicular.

##### 4.5.2 Epidídimos

Nos epidídimos, as alterações aparentemente iniciam nos ductulos eferentes com o aumento no número de lisossomas no epitélio dos mesmos (figura 9). Resultado semelhante foi encontrado por Geraldo (2005) que, trabalhando com galos afetados pela litíase provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais encontrou aumento no número de lisossomas. O autor encontrou além do aumento na quantidade, aumento no tamanho das organelas. Os lisossomos aumentariam em volume por fusão e o aumento numérico ocorreria por formação de lisossomos secundários.

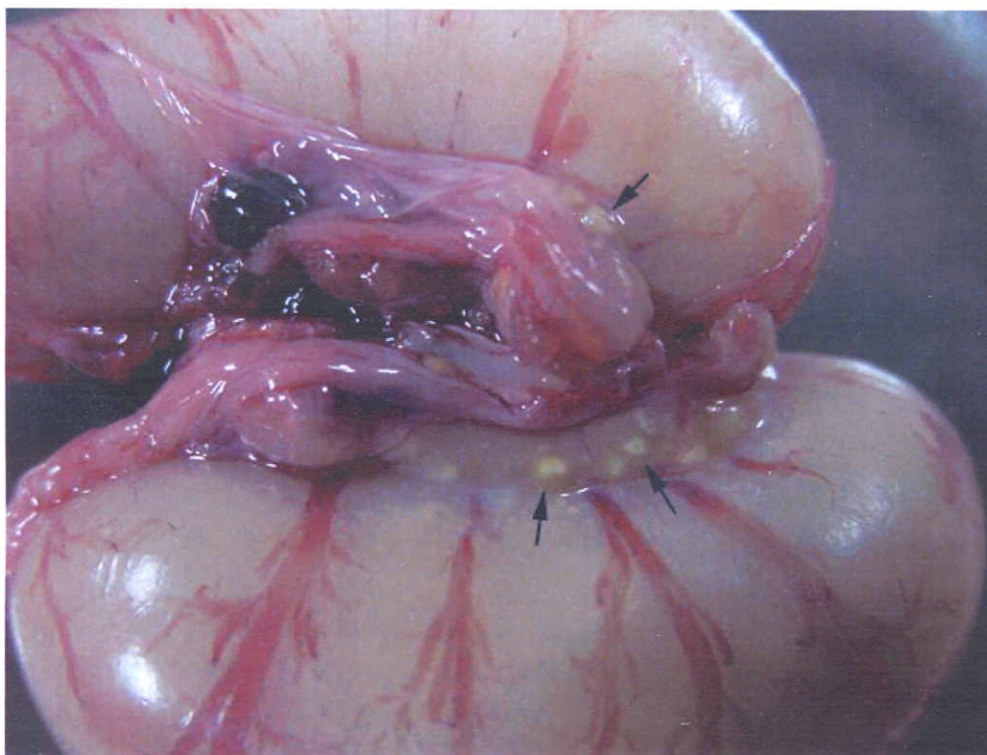


Figura 07 - Epidídimos de galo com 108 semanas de idade mostrando abundante presença de cálculos (setas) no seu interior.

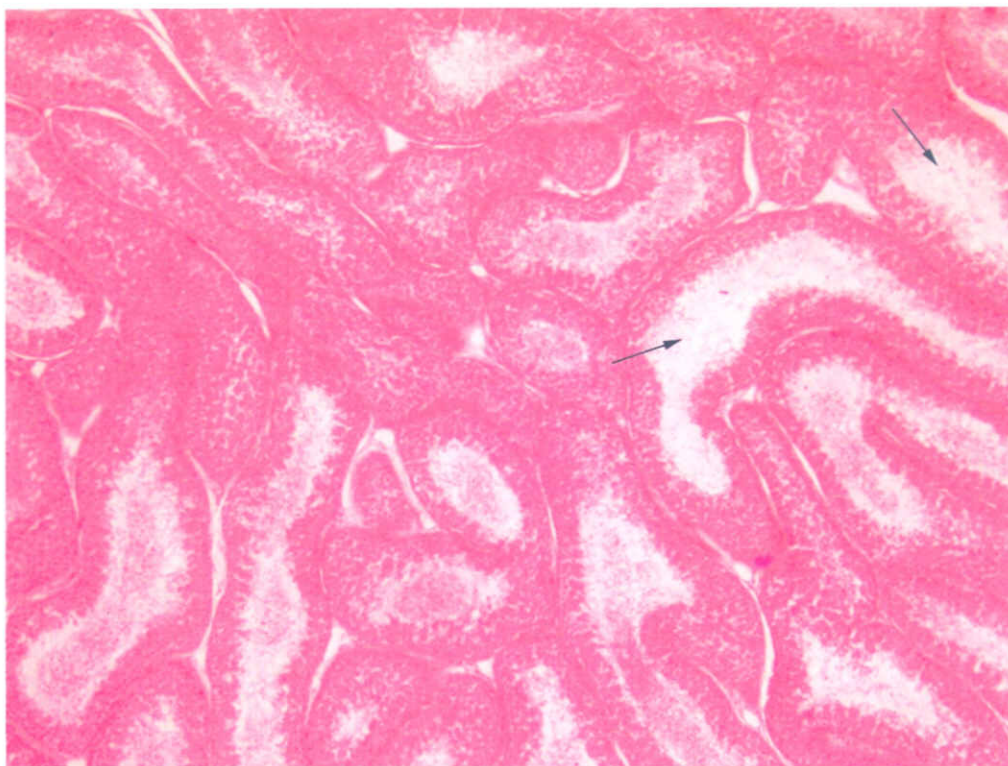


Figura 08 – Microfotografia de túbulos seminíferos de galo com 96 semanas de idade apresentando áreas com dilatação (setas) dos túbulos seminíferos (100x – HE).

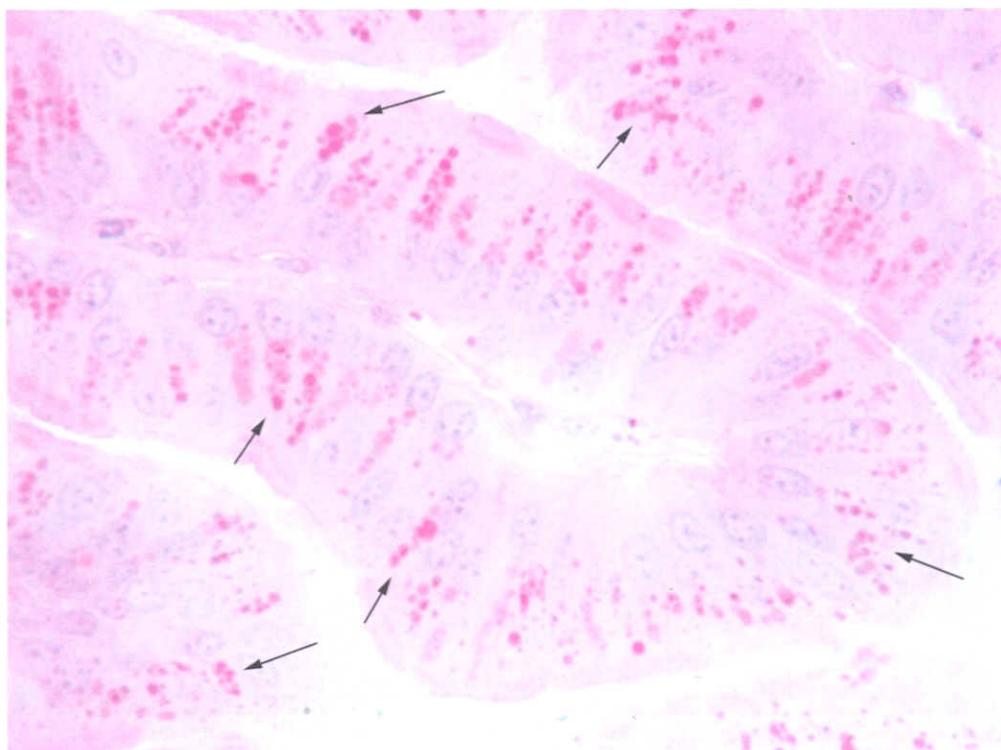


Figura 09 – Microfotografia de duto eferente de galo apresentando aumento no número de lisossomos (setas) nas células epiteliais não ciliadas (100x – PAS).



Os ductos eferentes acometidos estavam dilatados e com perda de pregueamento (figura 10), áreas de descamação (figura 11) e destruição do epitélio. Foram observadas áreas próximas aos cálculos com intenso infiltrado mononuclear constituído principalmente de plasmócitos e macrófagos. Esse infiltrado inflamatório foi descrito primeiramente por Janssen (2000) e depois por Mahecha (2002), Geraldo (2005), Boltz e Jackson (2006).

Nos casos mais avançados da doença, ocorre agravamento do quadro, levando a destruição do epidídimo e formação de grandes áreas constituídas por tecido conjuntivo fibroso (figura 12). Alterações semelhantes com fibrose também foram descritas por Geraldo (2005).

Resultados surpreendentes foram os encontrados com os galos Cobb de Santa

Catarina com 35 semanas de idade. Essas aves apresentaram lesões avançadas da litíase como grande número de cálculos no epidídimo, descamação do epitélio dos ductos eferentes e acúmulo de espermatozoides no mesmo, intenso infiltrado de macrófagos e plasmócitos, fibrose e atrofia testicular. Essas características foram descritas na literatura em galos com idade mais avançada (após pico de produção - 45 semanas de idade). Esse resultado mostra que aves jovens (pico de produção) também podem apresentar lesões avançadas da litíase epididimária.

Foi encontrado no lúmen dos ductos eferentes, acúmulo de espermatozoides (figura 13). Esse fenômeno provavelmente ocorre devido às lesões das células epiteliais que perdem sua capacidade de reabsorção. Tal fato foi também descrito por Mahecha (2002) e Geraldo (2005).

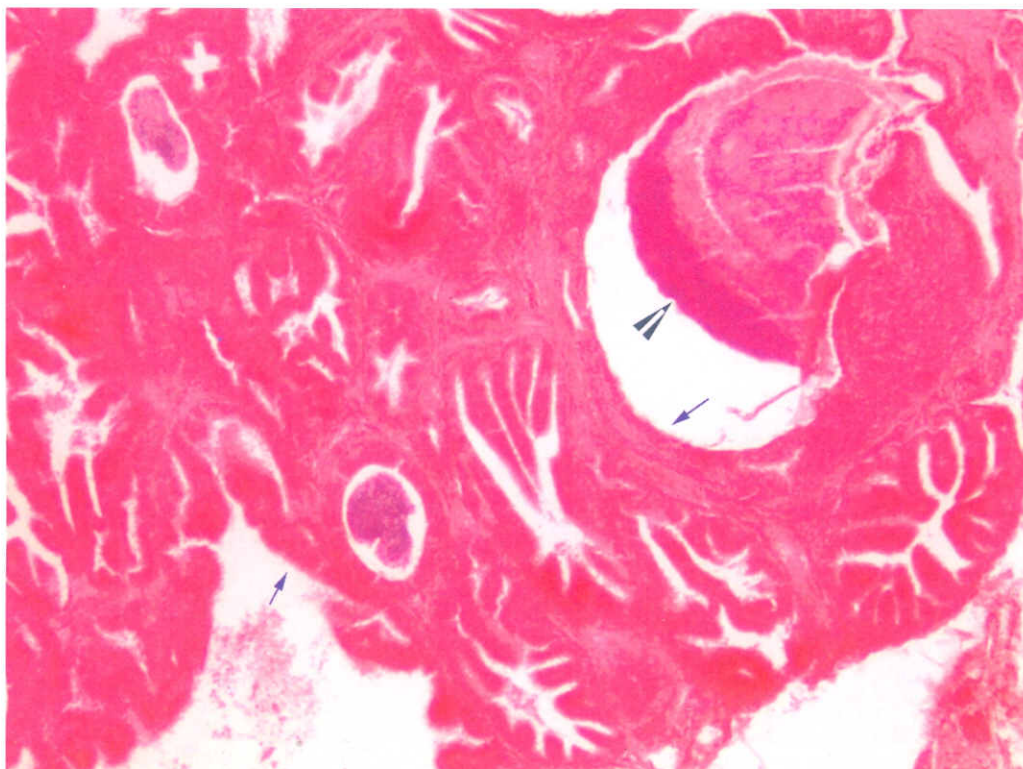


Figura 10 – Microfotografia de ducto eferente de galos com 35 semanas de idade, apresentando ductos eferentes dilatados, com perda de pregueamento (setas) e cálculo (cabeça de seta) no seu interior (100x - HE).



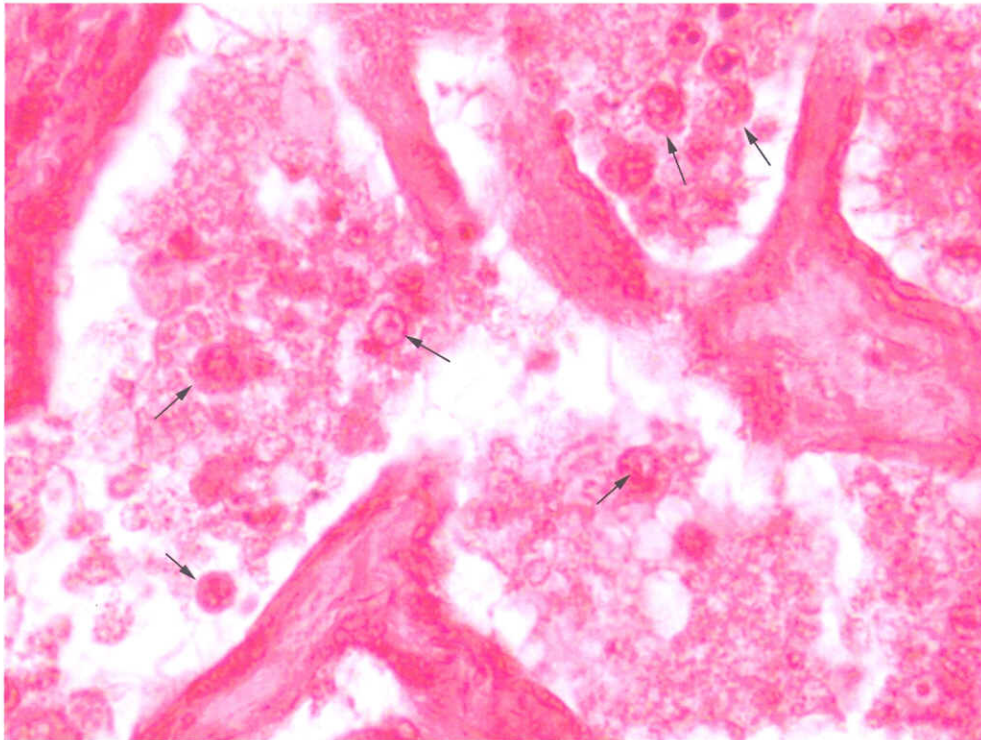


Figura 11 – Microfotografia de ductulo eferente de galo com 35 semanas de idade, apresentando células descamadas (setas) do tecido epitelial (400x – HE).

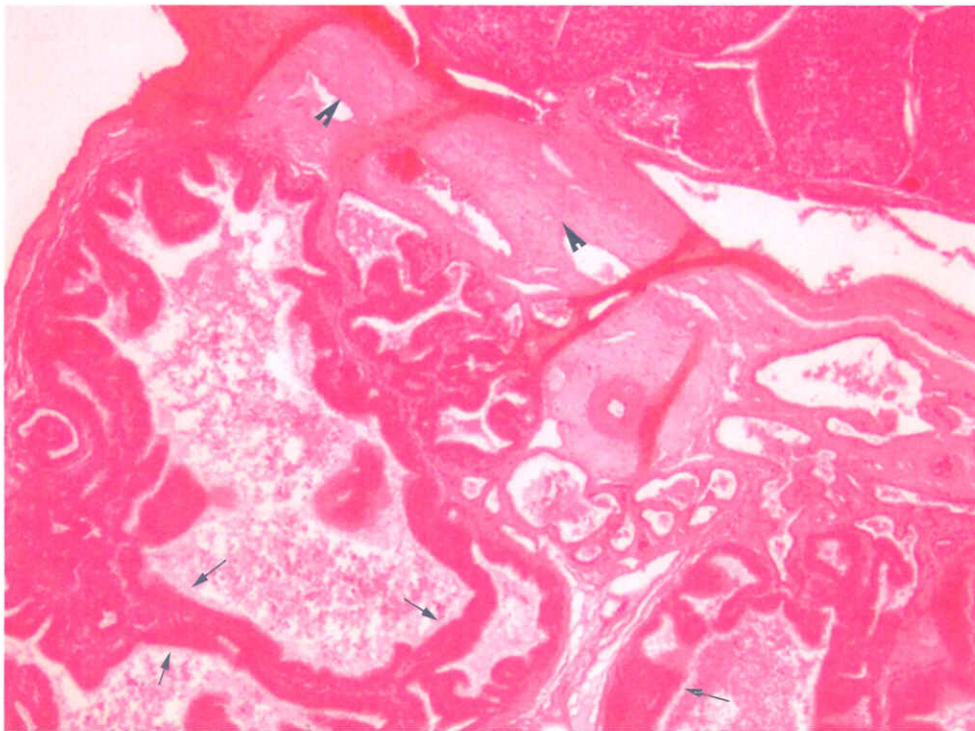


Figura 12 – Microfotografia de testículo de galo 52 semanas de idade apresentando área de fibrose na rede testicular (cabeças de setas) e ductulos eferentes com dilatação, perda de pregueamento (setas) e descamação celular (aumento 100x – HE).

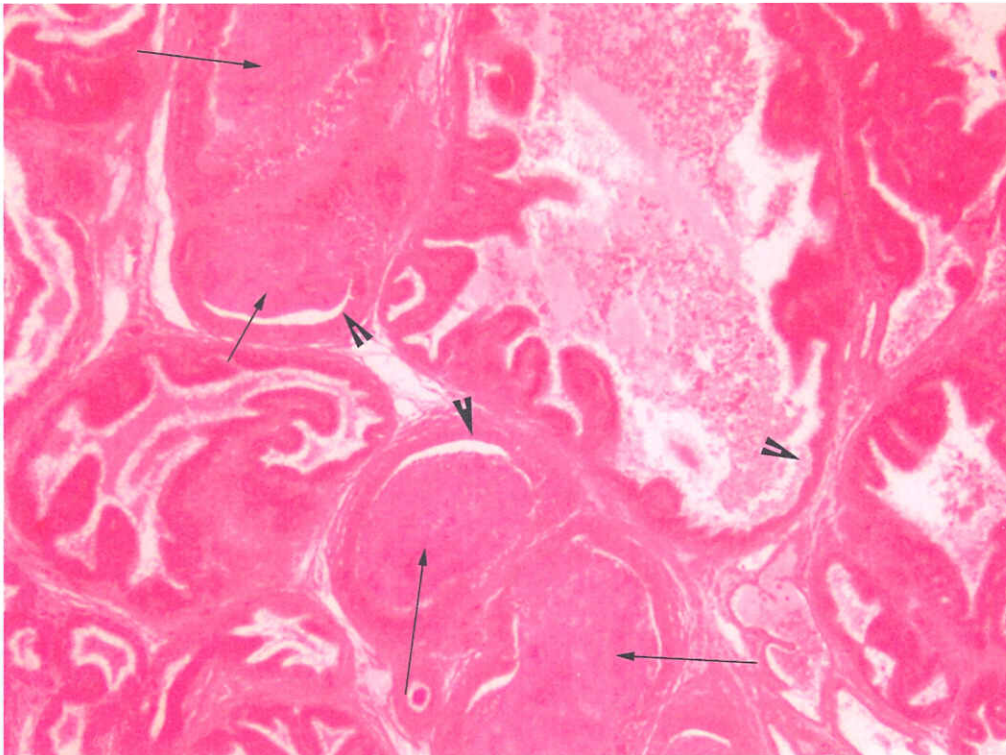


Figura 13 – Microfotografia de testículo de galo apresentando ductulos eferentes com acúmulo de espermatozoides (setas), perda de pregueamento (cabeça de seta) e descamação (100x – HE).

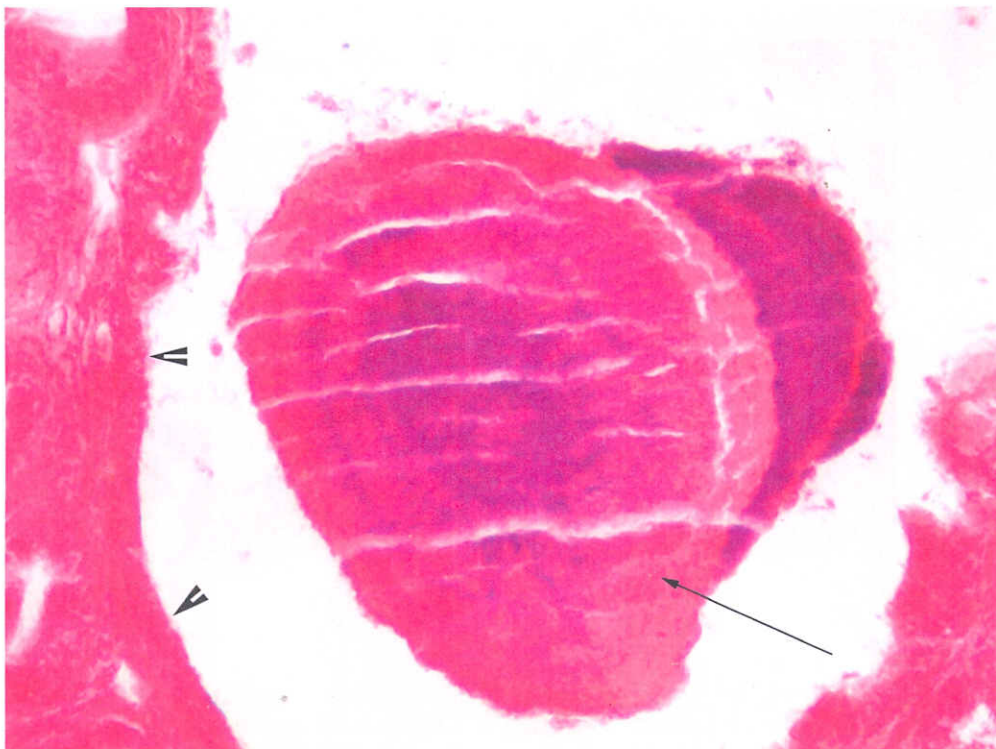


Figura 14 – Dúctulo eferente de galo com 68 semanas de idade apresentando um cálculo (seta) no seu interior. Notar a ausência de pregueamento (cabeças de setas) do mesmo (400x – HE).



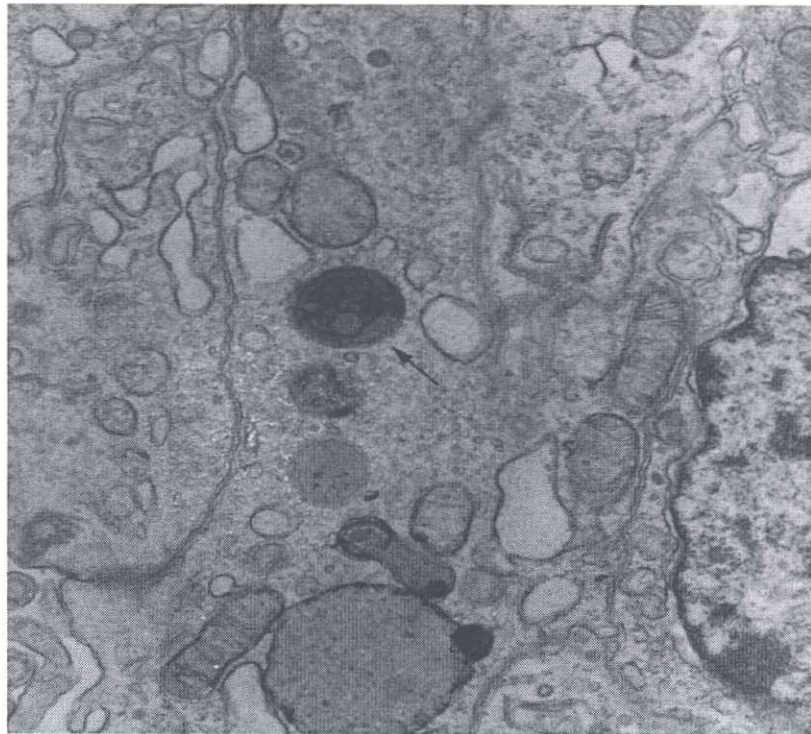


Figura 15 – Eletromicrografia de transmissão de célula de ductulo eferente de galo mostrando a presença da nanobactéria (seta) no interior (30.000 x). Fonte: LABRE – UFMG.



Figura 16 – Eletromicrografia de transmissão de meio de cultura DMEM mostrando a calcificação (setas) em volta da nanobactéria (70.000 x). Fonte: LABRE – UFMG.

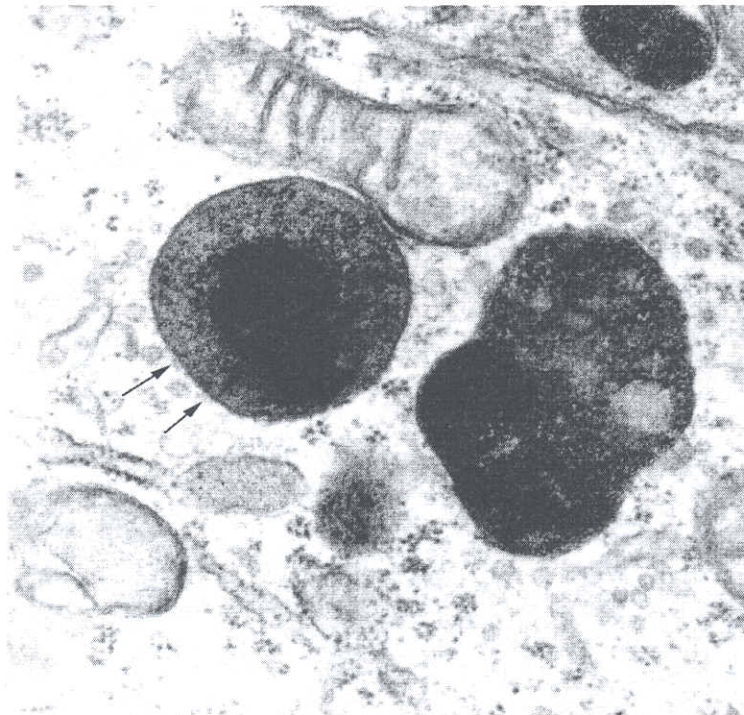


Figura 17 - Eletromicrografia de transmissão de célula de ductulo eferente de galo mostrando a nanobactéria no seu interior (setas) ao lado de uma mitocôndria (70.000 x). Fonte: LABRE – UFMG.

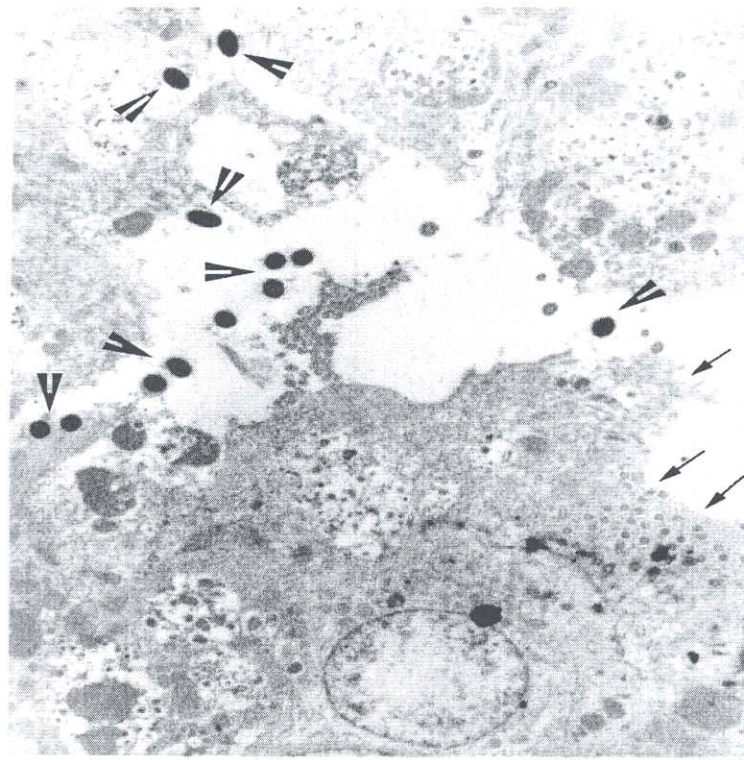


Figura 18 - Eletromicrografia de transmissão de ductulo eferente de galo mostrando inúmeras nanobactérias (cabeças de setas). Notar a destruição da parede celular (setas). (25.000 x). Fonte: LABRE – UFMG.



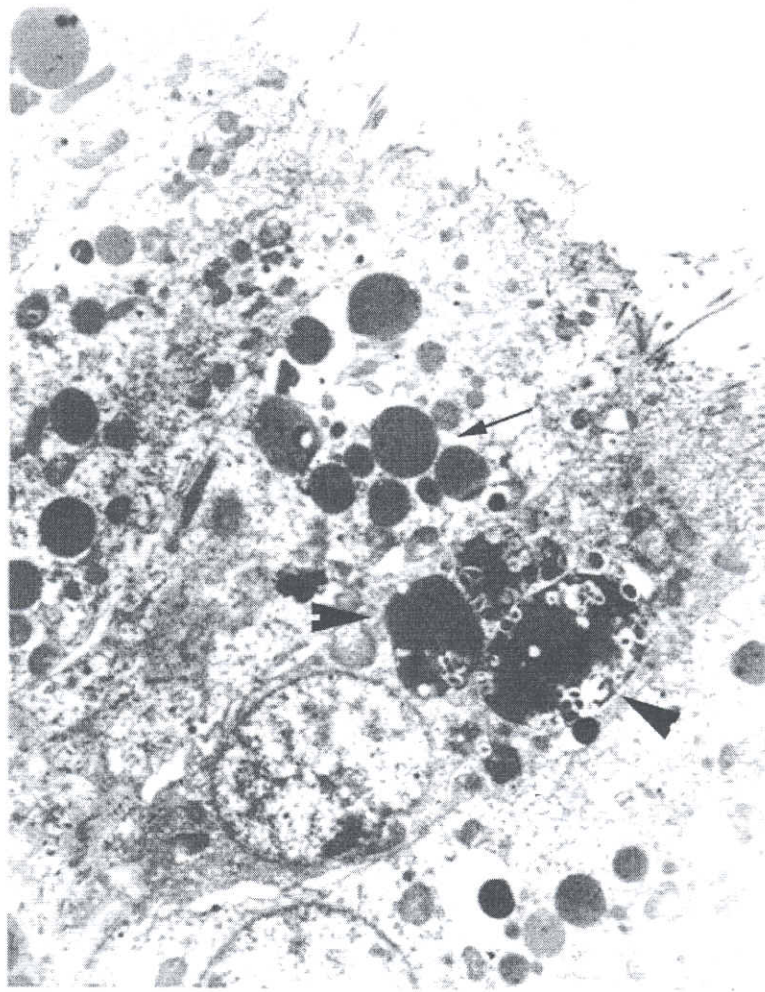


Figura 19 - Eletromicrografia de transmissão de célula de ductulo eferente de galo mostrando o aumento do número de lisossomos (seta) e o do tamanho dessas organelas (cabeças de setas). (30.000 x). Fonte: LABRE – UFMG.

Esses acúmulos de espermatozoides juntamente com as células descamadas dos ductulos eferentes formam aglomerados celulares. Esses aglomerados posteriormente sofrem calcificação, levando a formação dos cálculos dos ductulos eferentes (figura 14).

#### 4.6 Correlações

Foram realizadas correlações entre idade, peso testicular e as lesões encontradas nos testículos e epidídimos. O  $p$ , utilizado em todas as correlações para indicar se as características eram significativas, foi menor que 0,05 (Sampaio, 1998).

##### 4.6.1 Idade

A idade apresentou correlação negativa com o peso dos testículos. Aves com idade maior apresentaram menores pesos testiculares. Com relação à dilatação e perda de pregueamento dos ductulos eferentes e infiltrado inflamatório de células mononucleares (plasmócitos e macrófagos), essas características apresentaram correlação positiva com a idade. Quanto maior a idade das aves, maior a dilatação e perda de pregueamento dos ductulos eferentes e maior o infiltrado de células mononucleares (tabela 4).

Tabela 4 – Correlações entre idade, peso testicular e lesões dos testículos e epidídimos.

Correlação	Peso testicular	PP ductulos ef. <sup>1</sup>	Dilatação DE <sup>2</sup>	IM <sup>3</sup>
Idade	- 0,316	0,286	0,230	0,451

1 – perda de pregueamento dos ductulos eferentes; 2 – dilatação dos ductulos eferentes; 3 – infiltrado de células mononucleares.

#### 4.6.2 Peso dos testículos

O peso do testículo (tabela 5) apresentou correlação positiva com perda de pregueamento dos ductulos eferentes. Quanto mais pesado os testículos, maior a perda de pregueamento dos ductulos eferentes. Apresentou correlações negativas com idade (citado anteriormente), infiltrado de células mononucleares e destruição do epitélio dos túbulos seminíferos. Testículos mais pesados apresentaram menores infiltrado de células mononucleares e destruição parcial do epitélio dos túbulos seminíferos.

#### 4.6.3 Cálculos

Os cálculos só apresentaram correlação positiva com destruição do epitélio dos túbulos seminíferos e acúmulo de espermatozoides nos ductos eferentes (tabela 6). Essa destruição do epitélio dos túbulos seminíferos pode ser devida à pressão retrógrada exercida pelos cálculos ou à produção de toxinas pelas nanobactérias. Não foram encontradas correlações significativas com nenhuma outra patologia observada. Também não foram encontradas correlações entre os cálculos e idade das aves e peso dos testículos.

#### 4.6.4 Lesões dos testículos

##### 4.6.4.1 Descamação do epitélio dos túbulos seminíferos

A descamação do epitélio dos túbulos seminíferos apresentou correlações positivas com dilatação e obstrução dos túbulos seminíferos, infiltrado mononuclear, fibrose e descamação do epitélio dos ductulos eferentes (tabela 7). Quanto maior a descamação do epitélio dos túbulos seminíferos, maiores a dilatação e obstrução dos mesmos, o infiltrado de células mononucleares, a fibrose e a descamação dos ductulos eferentes.

##### 4.6.4.2 Túbulos seminíferos dilatados

Foram encontradas correlações positivas entre dilatação dos túbulos seminíferos e infiltrado de células mononucleares, descamação dos túbulos seminíferos, obstrução dos túbulos seminíferos, acúmulo de espermatozoides, dilatação e perda de pregueamento dos ductulos eferentes (tabela 8). Quanto maior a dilatação dos túbulos seminíferos, maiores o infiltrado de células mononucleares, a descamação dos túbulos seminíferos, a obstrução dos túbulos seminíferos, o acúmulo de espermatozoides, a dilatação e perda de pregueamento dos ductulos eferentes.

Tabela 5 – Correlações entre peso testicular, idade e lesões.

Correlação	Idade	DE túb. sem. <sup>1</sup>	PP dúct. ef. <sup>2</sup>	IM <sup>3</sup>
Peso testicular	- 0,316	- 0,264	0,240	- 0,263

1 – destruição do epitélio dos túbulos seminíferos; 2 – perda de pregueamento dos ductulos eferentes; 3 – infiltrado de células mononucleares.

Tabela 6 – Correlações entre cálculos e lesões nos testículos e epidídimos

Correlação	DE túb. sem. <sup>1</sup>	Acúmulo de sptz nos DE <sup>2</sup>
Cálculos	0,235	0,253

1 – destruição do epitélio dos túbulos seminíferos; 2 – espermatozoides nos ductulos eferentes.



Tabela 7 - Correlações entre descamação dos túbulos seminíferos e outras lesões testiculares e epididimárias

Correlações	TSD <sup>2</sup>	TSO <sup>3</sup>	IM <sup>4</sup>	Fibrose	PP DE <sup>5</sup>
Desc. ETS <sup>1</sup>	0,818	0,857	0,695	0,856	0,591

1 - descamação do epitélio dos túbulos seminíferos; 2 - túbulos seminíferos dilatados; 3 - túbulos seminíferos obstruídos; 4 - infiltrado de células mononucleares; 5 - perda de preguçamento dos ductos eferentes.

Tabela 8 - Correlações entre dilatação dos túbulos seminíferos e outras lesões testiculares e epididimárias

Correlações	IM <sup>2</sup>	Desc. ETS <sup>3</sup>	TSO <sup>4</sup>	AE DE <sup>5</sup>	PP DE <sup>6</sup>	DDE <sup>7</sup>
Dil. TS <sup>1</sup>	0,670	0,817	0,818	0,733	0,687	0,512

1 - dilatação dos túbulos seminíferos; 2 - infiltrado de células mononucleares; 3 - descamação epitelial dos túbulos seminíferos; 4 - túbulos seminíferos obstruídos; 5 - acúmulo de espermatozóides nos ductos eferentes; 6 - perda de preguçamento dos ductos eferentes; 7 - dilatação dos ductos eferentes.

#### 4.6.4.3 Túbulos seminíferos obstruídos

Os túbulos seminíferos obstruídos apresentaram correlação positiva com acúmulo de espermatozóides, fibrose, dilatação e perda de preguçamento dos ductos eferentes (tabela 9). Não foram encontradas correlações negativas com nenhuma variável, o mesmo ocorrido nos túbulos seminíferos dilatados.

#### 4.6.4.4 Destruição epitelial parcial dos túbulos seminíferos

Essa lesão apresentou correlação positiva com a presença de cálculos no epidídimo, dilatação dos ductos eferentes e aumento no número de lisossomas. Apresentou ainda correlação negativa com o peso testicular (tabela 10). Quanto maior a destruição epitelial dos túbulos seminíferos, menor o peso do testículo e maiores a dilatação dos ductos eferentes, a presença de cálculos e o aumento no número de lisossomas.

#### 4.6.5 Lesões no epidídimo

##### 4.6.5.1 Aumento no número de lisossomos no ductos eferentes

Foi encontrada somente uma correlação entre o aumento do número de lisossomos com as outras variáveis ao nível de significância de 5%. Tratou-se uma correlação positiva baixa (0,019) com a destruição epitelial dos túbulos

seminíferos. Células epiteliais dos ductos eferentes apresentando aumento no número de lisossomos estavam relacionadas com aumento na destruição epitelial dos túbulos seminíferos.

##### 4.6.5.2 Dilatação dos ductos eferentes

A dilatação dos ductos eferentes apresentou correlações positivas com lesões testiculares (destruição epitelial dos túbulos seminíferos, túbulos seminíferos obstruídos e dilatação dos túbulos seminíferos). Apresentou também correlação positiva com a idade dos galos. No epidídimo, houve correlação positiva somente com a fibrose (tabela 11). Quanto maior a dilatação dos ductos eferentes, maiores a destruição epitelial dos túbulos seminíferos, a obstrução e dilatação dos túbulos seminíferos, a presença de tecido conjuntivo fibroso no epidídimo e a idade dos galos.

##### 4.6.5.3 Destruição do epitélio dos ductos eferentes (perda de preguçamento)

A destruição do epitélio dos ductos eferentes apresentou correlação com túbulos seminíferos obstruídos, túbulos seminíferos dilatados e descamação epitelial dos túbulos seminíferos. Apresentou correlações positivas com idade e peso testicular. No epidídimo houve correlação positiva com fibrose e acúmulo de espermatozóides (tabela 12).

Tabela 9 – Correlações entre túbulos seminíferos obstruídos e outras lesões testiculares e epididimárias.

Correlações	Fibrose	AE DE <sup>2</sup>	PP DE <sup>3</sup>	DDE <sup>4</sup>
Túb. sem. obst. <sup>1</sup>	0,928	0,389	0,403	0,198

1 – túbulos seminíferos obstruídos; 2 – acúmulo de espermatozoides nos ductulos eferentes; 3 – perda de pregueamento dos ductulos eferentes; 4 – dilatação dos ductulos eferentes.

Tabela 10 – Correlações entre destruição epitelial dos túbulos seminíferos e lesões testiculares, epididimárias, peso testicular e presença de cálculos.

Correlações	Peso testicular	Cálculos	DDE <sup>2</sup>	ALs <sup>3</sup>
DE Túb. sem. <sup>1</sup>	- 0,256	0,235	0,613	0,019

1 – destruição epitelial dos túbulos seminíferos; 2 – dilatação dos ductulos eferentes; 3 – aumento no número de lisossomos.

Tabela 11 – Correlações entre dilatação dos ductulos eferentes e lesões testiculares, epididimárias e idade dos galos.

Correlações	DE TS <sup>2</sup>	TSO <sup>3</sup>	Dil. TS <sup>4</sup>	Idade	Fibrose
DDE <sup>1</sup>	0,613	0,198	0,512	0,230	0,425

1 – dilatação dos ductulos eferentes; 2 – destruição epitelial dos túbulos seminíferos; 3 – túbulos seminíferos obstruídos; 4 – dilatação dos túbulos seminíferos.

Tabela 12 - Correlações entre destruição do epitélio dos ductulos eferentes e lesões testiculares, epididimárias, peso testicular e idade dos galos.

Correlação	TSO <sup>2</sup>	TSD <sup>3</sup>	DE TS <sup>4</sup>	Idade	PT <sup>5</sup>	Fibrose	AEsp. <sup>6</sup>
PP DE <sup>1</sup>	0,403	0,687	0,591	0,286	0,240	0,778	0,143

1 – perda de pregueamento dos ductulos eferentes; 2 – túbulos seminíferos obstruídos; 3 – túbulos seminíferos dilatados; 4 – descamação epitelial dos túbulos seminíferos; 5 – peso testicular; 6 – acúmulo de espermatozoides nos ductulos eferentes.

#### 4.6.5.4 Infiltrado de células mononucleares (plasmócitos e macrófagos)

Infiltrados de plasmócitos e macrófagos apresentaram correlações positivas com presença de fibrose, idade das aves, túbulos seminíferos dilatados e descamação de epitélio dos túbulos seminíferos. As correlações negativas foram com peso testicular e acúmulo de espermatozoides (tabela 13). Quanto maior o infiltrado de células mononucleares, maiores as áreas de fibrose, a idade das aves e a dilatação e descamação do epitélio dos túbulos seminíferos. Em contrapartida, menores o peso testicular e o acúmulo de espermatozoides nos ductulos eferentes.

#### 4.6.5.5 Proliferação de tecido conjuntivo fibroso

A proliferação de tecido conjuntivo fibroso, em substituição ao parênquima epididimário

destruído, apresentou correlações positivas altas com descamação epitelial dos túbulos seminíferos, obstrução dos túbulos seminíferos, destruição epitelial dos ductulos eferentes e infiltrado de células mononucleares. Em relação à dilatação dos ductulos eferentes a correlação encontrada foi positiva e média (tabela 14). Quanto mais extensas as áreas de fibrose, maiores a descamação e obstrução dos túbulos seminíferos, a destruição epitelial e a dilatação dos ductulos eferentes e o infiltrado de células mononucleares.

#### 4.6.5.6 Acúmulo de espermatozoides nos ductulos eferentes

Essa variável apresentou correlação positiva com a presença de cálculos no epidídimo, dilatação dos túbulos seminíferos, obstrução dos túbulos seminíferos e destruição epitelial dos ductulos eferentes. Com relação ao infiltrado de células mononucleares, a



Tabela 13 – Correlações entre infiltrado de células mononucleares e lesões testiculares, epididimárias, idade e peso testicular.

Correlações	Fibrose	Idade	TSD <sup>2</sup>	DE TS <sup>3</sup>	PT <sup>4</sup>	Aesp. <sup>5</sup>
IM <sup>1</sup>	0,695	0,451	0,670	0,695	- 0,263	- 0,648

1 – Infiltrado de células mononucleares; 2 – túbulos seminíferos dilatados; 3 – descamação epitelial dos túbulos seminíferos; 4 – peso testicular; 5 – acúmulo de espermatozóides.

Tabela 14 – correlações entre fibrose e lesões testiculares e epididimárias

Correlações	DE TS <sup>1</sup>	TSO <sup>2</sup>	PP DE <sup>3</sup>	IM <sup>4</sup>	DDE <sup>5</sup>
Fibrose	0,856	0,928	0,778	0,695	0,425

1 – descamação epitelial dos túbulos seminíferos; 2 – túbulos seminíferos obstruídos; 3 – perda de preguçamento dos ductos eferentes; 4 – infiltrado de células mononucleares; 5 – dilatação dos ductos eferentes.

Tabela 15 – correlações entre acúmulo de espermatozóides nos ductos eferentes e presença de cálculos, lesões testiculares e epididimárias.

Correlações	Cálculos	TSD <sup>2</sup>	TSO <sup>3</sup>	PP DE <sup>4</sup>	IM <sup>5</sup>
AE DE <sup>1</sup>	0,253	0,733	0,389	0,143	- 0,648

1 – acúmulo de espermatozóides nos ductos eferentes; 2 – túbulos seminíferos dilatados; 3 – túbulos seminíferos obstruídos; 4 – destruição epitelial dos ductos eferentes; 5 – infiltrado de células mononucleares.

correlação foi negativa (tabela 15). Quanto maior o acúmulo de espermatozóides nos ductos eferentes, menor o infiltrado de células mononucleares e maiores a dilatação e obstrução dos túbulos seminíferos, a destruição epitelial dos ductos eferentes e a presença de cálculos no epidídimo.

## 5. CONCLUSÕES

Ao final das análises feitas neste experimento, pode-se concluir que:

- A litíase epididimária ocorre em vários estados do Brasil, com alto índice em todas as linhagens industriais comerciais e SPF. A litíase pode estar causando enormes prejuízos à indústria avícola brasileira.
- A litíase epididimária ocorre tanto em galos industriais quanto em caipiras. No entanto, as aves caipiras apresentaram um índice menor da doença, o que pode ser um indicativo de que essas aves possuem maior resistência à litíase epididimária que as linhagens industriais ou que as aves caipiras sofrem menor desafio.

- A litíase epididimária parece não ter relação causa e efeito com a infecção por IBV, conforme demonstrado nas aves SPF.

- As lesões testiculares e epididimárias causadas pela litíase encontradas podem causar um quadro de infertilidade e antecipar o descarte dos reprodutores. Pesquisas sobre a etiologia e patogenia devem avançar, para permitir o planejamento de estratégias de controle.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJANOHOON, E. Fertilidade relacionada aos machos. In: **Curso de Fisiologia da Reprodução de Aves**. Campinas: FACTA, 1994. p. 107-116.
- AIRE, T.A. The ductuli efferents of the epididymal region of birds. **J. Anat.**, v. 130, n. 4, p. 707-723, 1980.
- AIRE, T.A. The rete testis of birds. **J. Anat.**, v. 135, n. 1, p. 97-110. 1982.

- AMARO, C. R. P. **Avaliação metabólica em litíase urinária: papel do magnésio e sódio urinário como fatores de risco na litogênese.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista – SP, 2003. 109 p. Dissertação (doutorado).
- AMER, F. I. & SHALIN, M. A. The post-hatching development of the gonads in the fowl, *Gallus domesticus*. **Ann. Zool.**, v. 11, n. 1, p. 01-25, 1975.
- ANIMAL RESEARCH. Body systems of the chicken, 2006. Disponível em: <<http://www.animalresearch.msu.edu/>> Acesso em: 20 abr. 2007).
- BARBIER, Y. & LEROY, P. Cycle annuel du testicule de la pintade. **Bull. Biol. de la France et de la Belgique**, v. 34, n.2, p. 119-147, 1970.
- BILGILI, S. F. & RENDEN, J. A. Fluorometric determination of avian sperm viability and concentration. **Poultry Sci.**, v. 63, n. 1, p. 2275-2277, 1984.
- BOLTZ, D. A., NAKAI, M., BAHR, J. M. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. **Avian Diseases**, v. 48, p. 909-915, 2004.
- BOLTZ, D. A., ZIMMERMAN, C. R., NAKAI, M., BUNICK, D., SHERBA, G., BAHR, J. M. Epididymal stone formation and decreased sperm production in roosters vaccinated with a killed strain of avian infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v. 50, p. 594-598, 2006.
- BRANCO, J. A. D. Gerenciamento de produção. In: **Manejo de Matrizes**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia. P. 185-191. 1994.
- BRILLARD, J. P. & McDANIEL, G. R. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. **Poultry Sci.**, v. 64, n. 1, p. 155-158, 1985.
- BUCKNER, R. E., RENDEN, J. A., SAVAGE, T. F. The effect of feeding programs on reproductive traits and selected blood chemistries of caged broiler breeder males. **Poultry Sci.**, v. 63, n. 1, p. 85-91, 1984.
- BUDRAS, K.D., SAUER, T. Morfology of the epididymis of the cock (*Gallus domesticus*) and its effect upon the steroid sex hormone synthesis: I. genesis, morfology and distribution of the epididymis. **Anat. Embryol.**, v. 148, p. 175-196, 1975.
- CAMARA, B. G. O. **Morfologia do epidídimo de perdiz (*Rhynchotus rufescens* aves, tinamiformes) e suas variações no ciclo reprodutivo.** Belo Horizonte: PUC-MG, 2001. 60 p. Dissertação (mestrado).
- CARDOZO, R. M. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais específicos para o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 1999. 49 p. Dissertação (doutorado).
- CAVANAGH, D., KING, D. T. Infectious Bronchitis. In: **Diseases of Poultry**. 9<sup>o</sup> ed. Iowa: Iowa State University Press. 1994. 929 p.
- CHAMBERS, J. R. Genetics of growth and meat production in chickens. In: **Poultry Breeding and Genetics**, v. 56, n. 3, p. 599-644, 1990.
- ÇİFTÇIOĞLU, M., BJORKLUND, M., KUORIKOSKI, K., BERGSTROM, K., KAJANDER, E. O. Nanobacteria: An infectious cause for kidney stone formation. **Kidney International**, v. 56, p. 1893-1898, 1999.



- CRAIG, J. V., AL-RAWI, B., KRATZER, D. D. Social status and sex ratio effects on mating frequency of cockerels. **Poultry Sci.**, v. 56, n. 3, p. 767-772, 1977.
- CRAWFORD, R. D. Comb dimorphism in Wyandotte domestic fowl. Sperm competition in relation to rose and single comb alleles. **Can. J. Genet. Citol.**, v. 4, n. 7, p. 500-504, 1965.
- DI FABIO, J., ROSSINI, L. I. Bronquite Infecçiosa das Galinhas. In: **Doenças das Aves**. Campinas: Editora FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, p. 293 – 300.
- DORNAS, R. A. P., Vitamin D3 receptor (VDR) is overexpressed in the epididymal region of roosters (*Gallus domesticus*) affected by epididymal lithiasis. **Animal Reprod.**, v. 3, n. 2, p. 230, 2006.
- DUNNINGTON, E. A., SIEGEL, P. B., HILL, W. G., MANSON, J. M., HEWITT, D. Poultry genetics and breeding. **Brith. Poultry Sci.**, v. 18, n. 9, p. 200-207, 1985.
- DYCE, K. M., SACK, W. O., WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1990. 567 p.
- ETCHES, R. J. The male. In: **Reproduction in Poultry**. Wallingford – UK: Ed. CAB International. 1996. p. 208-233.
- FONTANA, E. A., WEAVER JR., W. D., VAN KREY, H. P. Effects of various feeding regimens on reproduction in broiler-breeder males. **Poultry Sci.**, v. 69, n. 2, p. 209-216, 1990.
- FREDRICKSON, T. N. & HELMBOLDT, C. F. **Diseases of Poultry**. Ames: Ed. Iowa State University, 1991. p. 459-470.
- GERALDO, I. **Alterações estruturais dos ductos eferentes de galos domésticos (*Gallus domesticus*) acometidos pela litíase epididimária**. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 2005. 51 p. Dissertação (mestrado).
- GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana. 1981. 910 p.
- GOWE, R. S. A. A strategy for maintaining high fertility and hatchability in a multiple-trait egg stock selection program. **Poultry Sci.**, v. 52, n. 3, p. 500-507, 1983.
- HALL, W. C., DAMJANOV, I., NIELSEN, S. W., HEIDER, L., EATON, H. D. Testicular changes of acute vitamin A deficiency. **Am. J. Vet. Res.**, v. 41, n. 4, p. 586-590, 1983.
- HARLOW, E. & LANE, D. **Antibodies. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. 726 p.
- HOCKING, P. M. Effects of dietary crude protein concentration on semen yield and quality in male broiler breeder fowls. **British Poultry Science**, v. 30, n. 4, p. 935-945, 1989.
- HOFSTAD, M. S., CALNEK, B. W., HELMBOLDT, C. F., REID, W. M., YODER, H. W. **Diseases of Poultry**. Ames: Ed. Iowa State University, 1978. 949 p.
- HUDSON, L. & HAY, F. C. **Practical Immunology**. 3ª ed. Blackwell Scientific Publications. 1989. 507 p.
- JAENISH, F. R. F. **Estudo anatomopatológico dos testículos e epidídimos e características físicas e morfológicas do sêmen de *Gallus domesticus* com diferentes pesos corporais**. Belo Horizonte: UFMG –

- Escola de Veterinária, 1989. 69 p. Dissertação (mestrado).
- JAENISH, F. R. F. & LAMAS DA SILVA, J. M. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Avicultura**. 14 - 16 agosto, 1991. Brasília - DF. 189 p.
- JACKSON, U. H., BOLTZ, D. A., NAKAI, M., SHERBA, G. BUNICK, D., BAHR, J. M. Prepubertal exposure to the live attenuated avian infectious bronchitis virus induces epididymal stones in the rooster after puberty. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 280- 285, 2006.
- JANSSEN, S. J., KIRBY, J. D., HESS, R. A., RHOADS, M., BUNICK, D., BAILEY, K. L., PARSONS, C. M., WANG, H., BAHR, J. M. Identification of the epididymal stones in diverse rooster populations. **Poultry Sci.**, v. 79, p. 568-574, 2000.
- JONES, J. E., WILSON, N. R., HARMS, R. H., SIMPSON, C. F., WALDROUP, P. W. Reproductive performances in male chickens fed protein deficient diets during the growing period. **Poultry Sci.**, v. 46, n. 6, p. 1569-1577, 1967.
- JUBB, K. V. F., KENNEY, P. C., PALMER, N. The male genital system. In: **Pathology of domestic animals**, v. 3, n. 1, p. 409-459, 1985.
- KRATZER, D. D. & CRAIG, J. V. Mating behavior of cockerels: effects of social status, group size and group density. **Appl. Animal Ethol.**, v. 6, n. 9, p. 49-62. 1980.
- LAKE, P. E., STEWART, J. M. ed. Male reproductive physiology and the collection of semen. In: **Artificial insemination in poultry**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1978, p. 5-13.
- LAKE, P. E. & FREEMAN, B. M. The male reproduction. In: **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. London: Academic Press, 1984. v. 5, p. 381-401.
- LAKE, P. E. Recent progress in poultry reproduction. **World's Poultry Science Journal**, v. 45, n. 1, p. 53-59, 1989.
- MAHECHA, G. A. B., OLIVEIRA, C. A., BALZUWEIT, K., HESS, C. A. Epididymal lithiasis in roosters and efferent ductule and testicular damage. **Reproduction**, v. 124, p. 821-834, 2002.
- MAULDIN, J. M. Applications of behavior to poultry management. **Poultry Sci.**, v. 71, n. 8, p. 634-642, 1992.
- McENTEE, K. In: **International Post-Graduated Course on Animal Reproduction**. Stockholm. Ed. 13, 1979. v. 3, p. 26-55.
- McLELLAND, J. A **Colour Atlas of Avian Anatomy**. Aylesbury: BPCC Hazell Books Ltda. 1990. 127 p.
- MICROSOL. Mapa do Brasil, 2007. Disponível em: <[http://www.microsol.com.br/imgs/mapa\\_brasil.gif](http://www.microsol.com.br/imgs/mapa_brasil.gif)>. Acesso em: 02 maio 2007.
- MUNCHER, Y., SOD-MORIAH, U. A., WEIL, S., ROSENSTRAUCH, A. W., FRIEDLANDER, M. Intratesticular retention of sperm and premature decline in fertility in the domestic rooster, *Gallus domesticus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 273, p. 76-81, 1995.
- NILIPOUR, A. Reproductores machos: la mitad olvidada. **Industria Avícola**, v. 41, n. 3, p. 22- 24, 1994.
- NORTH, M. O. Commercial chickens production. **The AVI Publishing Company**. 1984. 710 p.



- PALOTTA, M. T. Manejo de machos. In: **Manejo de Matrizes**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia. p. 83-92, 1994.
- PYM, R. A. E., HILL, W. G., MANSON, J. M., HEWITT, D. Poultry genetics and breeding. **Brith. Poultry Sci.**, v. 18, n. 10, p. 123-135, 1985.
- RENDEN, J. A., PIERSON, M. L. Long term reproductive performance of broiler breeder males selected for semen production. **Poultry Sci.**, v. 61, n. 6, p. 1214-1217, 1982.
- ROCHA JR., J. M. **Características físicas do sêmen e histológicas dos testículos de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade**. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 2000. Dissertação (mestrado).
- ROSENSTRAUCH, A., EGEN, A. A., FRIEDLANDER, M. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. **Biol. Rep.**, v. 50, n. 1, p. 129-136, 1994.
- RUTZ, F., SAUL, I., DIONELLO, N. J. L., ROLL, V. F. B., XAVIER, E. G. Desempenho reprodutivo de galos Leghorn submetidos a diferentes níveis de cálcio dietético. **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 5, n. 2, p. 120-123, 1999.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998. 221 p.
- SILLER, W. G., DEWAR, W. A., WHITEHEAD, C. C. Morphological changes seen at sexual maturity in experimentally induced cystic testes of broiler fowls. **Avian Pathology**, v. 7, n. 1, p. 105-121, 1978.
- SEXTON, K. J., RENDEN, J. A., MARPLE, D. N., KEMPPAINEN, R. J. Effects of *ad libitum* and restricted feeding on semen quantity and quality, body composition, and food chemistry of caged broiler breeder males. **Poultry Sci.**, v. 68, n. 4, p. 569-576, 1989.
- SOUZA, C. M. **Produção de anticorpos monoclonais contra os componentes conservados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas**. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 2000. Dissertação (mestrado).
- STABENFELDT, G. H. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A. 1993. 454 p.
- THOMSON, R. G. **Patologia Geral Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1983. 412 p.
- TINGARI, M.D. On the structure of the epididymal region and ducts deferens of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **J. Anat.**, v. 109, n. 3, p. 423-435, 1971.
- TOIVANEN, A., TOIVANEN, P. **Avian Immunology: basis and practice**. Boca Raton: CRC. 1987.
- UBA. Dados da avicultura brasileira em 2006, 2007. Disponível em: <<http://www.uba.org.br/>>. (Acesso em: 18 março 2007).
- VAN KREY, H. P. Reproductive biology in relation to breeding and genetics. In: Crawford, R. D., ed. **Poultry Breeding and Genetics**. 2ª ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1993, p. 61- 90.

WILSON, H. R., PIESCO, N. P., MILLER, E. R. Prediction of the fertility potential of broiler breeder males. **World's Poultry Sci. J.**, v. 35, n. 2, p. 95-118, 1979.

WISHART, G. J. & PALMER, F. H. Correlation of the fertilizing ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. **Brith. Poultry Sci.**, v. 27, n. 1, p. 97-102, 1986.

ZUIN, A. H. L., **Aspectos reprodutivos de matrizes pesadas em diferentes relações machos e fêmeas.** Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 1998. 120 p. Dissertação (mestrado).