



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**



**INOCULAÇÃO DE DL-METIONINA EM OVOS EMBRIONADOS DE MATRIZES**  
**AVÍCOLAS**

**THAYSA MARINHO FARIAS**

**MANAUS-AMAZONAS**

**Novembro, 2018**

THAYSA MARINHO FARIAS

**INOCULAÇÃO DE DL-METIONINA EM OVOS EMBRIONADOS DE MATRIZES  
AVÍCOLAS**

Orientador: Frank George Guimarães Cruz, Dr.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas-UFAM como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

MANAUS-AMAZONAS

Novembro, 2018

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F224i Farias, Thaysa Marinho  
Inoculação de DL-metionina em ovos embrionados de matrizes  
avícolas / Thaysa Marinho Farias. 2018  
57 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Frank George Guimarães Cruz  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade  
Federal do Amazonas.

1. alimentação in ovo. 2. aminoácido. 3. biotecnologia. 4.  
desenvolvimento embrionário. I. Cruz, Frank George Guimarães II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título



Poder Executivo  
Ministério da Educação  
Universidade Federal do Amazonas  
Faculdade de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

No dia 12 de novembro de 2018, às 09:00 horas, na Sala de Aula do Setor de Avicultura, Faculdade de Ciências Agrárias, Setor Sul do Campus Universitário da UFAM, Manaus/AM, **Thaysa Marinho Farias**, realizou a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Inoculação de DL-Metionina em ovos embrionados de matrizes avícolas".

#### Banca Examinadora:

Membros	Parecer	Assinatura
Dr. Frank George Guimarães Cruz (UFAM) – Presidente	Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Reprovado ( )	
Dra. Roseane Pinto Martins de Oliveira (UFAM) – Membro	Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Reprovado ( )	
Dra. Chayane da Rocha (UFPR) – Membro	Aprovado ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Reprovado ( )	

Manaus, 12 de novembro de 2018

Resultado Final: Aprovado (  )  
Reprovado ( )



Universidade Federal do Amazonas- Faculdade de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal- PPGCAN  
Secretaria dos PPG's FCA- Bloco FCA/ICB- 2º Andar-Setor Sul- Campus Universitário  
Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6.200 Coroado I - CEP: 69.077-000 Manaus- AM  
Fone: (092) 99128-7971/www.ppgcan.ufam.edu.br/e-mail: ppgcan.ufam@gmail.com

## AGRADECIMENTOS

Sem dúvidas, agradeço, sobretudo a Deus por permitir todas as coisas sejam elas boas os ruins, e me permitir sentir o amor, proteção e graça todos os dias.

Ao meu orientador Frank George Guimarães Cruz, por aceitar me orientar mesmo eu sendo um perfil distante dos seus alunos e me transmitir seu grande conhecimento, obrigada pelo apoio, incentivo e por acreditar em mim. Obrigada por tudo professor!

A minha família, sobretudo aos meu pais Ernande e Eunice.

Aos meus amigos da granja Pedro, Lucas Ramon, Julmar, Natalia, Ronner, Valcely, Adriene, André e Gilberto. Queridos, se não fosse vocês esse trabalho não existiria, vocês foram essenciais em todas as etapas, suportando comigo todos os desgastes que uma dissertação traz. Um agradecimento especial ao meu amigo João Paulo, pessoa do coração enorme disposto a ajudar a quem precisar, eu tive o privilégio de conviver e aprender com você tantas coisas, e sem você tudo seria tão mais difícil, eu desejo as melhores coisas pra você amigo, profissional incrível, inteligente e competente.

Aos funcionários e meus amigos queridos da granja Francisco (Chico) e Jadilson, peças fundamentais de todas as pesquisas desenvolvidas na granja, obrigada por me repassarem um pouco da grande bagagem de experiência e conhecimento que vocês têm.

Ao professor e amigo querido Wallice Duncan, na verdade eu nem sei como agradecer tudo que você fez por mim, sua dedicação ao laboratório, pesquisas e seus alunos é notável, todas as vezes que aparecia uma dificuldade você estava lá pra me ajudar a contornar, eu aprendi tanto com você, aprendi a amar a histologia, muito obrigado pelos ensinamentos, pelo material concedido ao meu experimento e principalmente pela amizade que com certeza vamos levar pro resto da vida.

Aos meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, tudo foi mais leve e divertido com vocês, turma maravilhosa e alegre, obrigada pessoal!

À minha amiga de trabalho Fernanda, por ser essa pessoa tão generosa e cuidadosa comigo, é um privilégio ter você todos os dias, obrigada por suprir minhas faltas nos dias em que eu não pude estar no trabalho por conta do mestrado, obrigada pelas palavras de incentivo e conselhos, eu admiro muito você.

Aos meus professores da faculdade responsáveis pelo incentivo e início da minha jornada na área da pesquisa, Gersonval Leandro Monte e Everton Ferreira Lima.

À FAPEAM por conceder a bolsa durante boa parte do mestrado.

*"Nossa tarefa deveria ser nos libertarmos ... aumentando o  
nosso círculo de compaixão para envolver todas as criaturas viventes,  
toda a natureza e sua beleza."*

Albert Einstein (1879 – 1955)

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos e o potencial biológico da DL-metionina para fins de inoculação em ovos embrionados. O estudo foi conduzido no Laboratório de Tecnologia Avícola do Setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal e Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Foi realizado experimento para avaliação da bioeficácia da DL-metionina para fins de inoculação *in ovo*. Foram utilizados 224 ovos férteis oriundos de matrizes Rhode Island Red com 35 semanas de idade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram constituídos por dois controles e cinco soluções experimentais contendo níveis crescentes de DL-metionina, com 32 repetições (ovos) por tratamento. Foram avaliados os rendimentos de incubação, a relação pinto/ovo, os parâmetros bioquímicos séricos e o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos diretamente relacionados e regiões) dos pintos ao nascer. A análise estatística foi realizada através do programa computacional SAS (2008), onde os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as estimativas dos tratamentos foram analisados por regressão polinomial à 0,01 e 0,05 de significância. Os resultados deste estudo indicaram que até 1,0% de DL-metionina pode ser utilizada para fins de alimentação *in ovo* em embriões avícolas, proporcionando maior peso do pintinho ao nascer, maior peso do saco vitelino, aumento no número de células calciformes nas criptas do intestino delgado e nas vilosidades do intestino grosso, assim como estimular o desenvolvimento da camada mucosa do intestino delgado e grosso.

**Palavras-chave:** alimentação *in ovo*, aminoácido, biotecnologia, desenvolvimento embrionário.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the use of DL-methionine to *in ovo* feeding of chick embryos. The study was conducted at the facilities of Poultry Technology Laboratory of Poultry Sector of the Department of Animal and Plant Production, College of Agrarian Sciences, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil. A total of 224 fertile eggs from Rhode Island Red breeders (35 weeks of age) were used. The experimental design was completely randomized with the treatments constituted by two controls and five solutions containing DL-methionine levels with 32 replicates (eggs) each. Data collected were subjected to polynomial regression at 5% of significance. The incubation yields, chick / egg ratio, serum biochemical parameters and development of gastrointestinal tract (directly related organs and regions) of the hatch chicks were evaluated. Statistical analysis was performed using SAS software (2008), where the data collected were submitted to analysis of variance and the estimates of the treatments were analysed by polynomial regression at 0.01 and 0.05 of significance. The results of this study indicate that up to 1.0% of DL-methionine can be used for in egg feeding for chick embryos, providing higher birth weight, greater yolk sac weight, increased goblet cell numbers in crypts of small intestine and the villi of the large intestine, and better development of the mucous layer of the small and large intestine.

**Keywords:** amino acid, biotechnology, embryo mortality, hatchability.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquematizando o fluxo de circulação cardiovascular e o metabolismo respiratório do embrião avícola.....	4
Figura 2. Estrutura química da metionina.....	12
Figura 3. Foto aérea do Setor de Avicultura de FCA/UFAM.....	17
Figura 4. Inoculação <i>in ovo</i> das soluções experimentais.....	18
Figura 5. Análise de mortalidade embrionária (embriodiagnóstico).....	19
Figura 6. Pesagem de pintainho logo após a eclosão.....	20
Figura 7. Análises bioquímicas séricas.....	21
Figura 8. Secções longitudinais representativas do duodeno no intestino delgado dos pintos recém-eclodidos.....	26
Figura 9. Fotomicrografias representativas das células caliciformes intestinais identificadas por meio de técnicas histoquímicas.....	27
Figura 10. Porção do intestino grosso de pinto recém eclodido, inoculado com 1,0% de metionina.....	28

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Composição das soluções experimentais.....	18
Tabela 2. Efeitos da inoculação de DL-metionina sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.....	23
Tabela 3. Análise bioquímica sanguínea de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.....	24
Tabela 4. Efeitos da inoculação de DL-metionina sobre o desenvolvimento do coração + trato intestinal (principais órgãos).....	24
Tabela 5. Biometria de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina (regiões do TGI).....	25
Tabela 6. Densidade de células caliciformes PAS+, AB+ (carboxiladas) e AB+ (sulfatadas) nas vilosidades e nas criptas de Lieberkühn do intestino delgado de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.....	26
Tabela 7. Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) de células caliciformes PAS+, AB+ (carboxiladas) e AB+ (sulfatadas) nas vilosidades e nas criptas de Lieberkühn do intestino grosso de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.....	28
Tabela 8. Densidade (volume fracional ou volume de Delesse, %) das túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa do intestino delgado de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.....	29
Tabela 9. Densidade (volume fracional ou volume de Delesse, %) das túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa do intestino grosso de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.....	30

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Fatores que Influenciam a Incubação Artificial.....	2
2.2. Desenvolvimento Embrionário e Fisiologia do Trato Gastrointestinal de Pintos Durante a Incubação .....	4
2.2.1. Desenvolvimento Embrionário.....	4
2.2.2. Fisiologia e Desenvolvimento do Tratogastrointestinal no Período Pré e Pós Eclosão.....	5
2.3. Alimentação <i>In Ovo</i> .....	8
2.4. Principais Nutrientes Utilizados na Alimentação <i>In Ovo</i> .....	10
2.5. Metionina.....	11
2.5.1. Metabolismo da Metionina.....	13
2.6. Conteúdo Energético e sua Utilização pelo Embrião .....	14
3. Materiais e Métodos .....	17
3.1. Local de Desenvolvimento do Estudo .....	17
3.2. Montagem Experimental.....	17
3.3. Variáveis Analisadas.....	19
3.4. Análise Estatística.....	22
4. Resultados .....	23
5. Discussão.....	30
6. Conclusões .....	35
7. Referências Bibliográficas .....	36

## 1. Introdução

Diante do avanço tecnológico nos setores do agronegócio, todas as cadeias de produção tiveram seu processo melhorado a fim de proporcionar maior rentabilidade num menor espaço de tempo, este fato, bem claro na avicultura industrial e talvez o mais marcante de todos os ramos, ainda é passível de aperfeiçoamento como, por exemplo, o incremento do uso da técnica de alimentação *in ovo*.

Também conhecido como inoculação *in ovo*, este método inicialmente utilizado para vacinação durante o período de incubação de perus, foi aprimorado recentemente com a finalidade fornecer ao embrião maior oferta de nutrientes que possivelmente estimulariam o desenvolvimento do trato gastrointestinal e diminuiria os efeitos deletérios causados pelo jejum pós eclosão, como perda de peso e utilização da via gliconeogênese para obtenção de energia.

Neste sentido, os nutrientes utilizados durante o processo podem estar direcionados a diferentes funções quanto à fisiologia do pintinho, podendo atuar com fontes de energia (sacarose, dextrina, maltose e glicose), sobre o sistema imunológico (vitamina E, cobre e probióticos), metabolismo e anabolismo protéico ( $\beta$ -hidroxi-metilbutirato e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina) e/ou agentes tróficos da mucosa intestinal (zinco e ácido butírico) (UNI& FERKET, 2004).

Outro importante impulsionador deste tipo de pesquisa está relacionado a maior exigência das aves atualmente. Sabe-se que, o ovo contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do pintinho durante a fase embrionária, no entanto, o alto grau das linhagens modernas possui uma exigência metabólica muito maior, pois os seus organismos estão geneticamente preparados para um desenvolvimento rápido, onde aos 45 dias estão aptos para o abate, assim, a inoculação de substâncias nutritivas auxiliam na maior disponibilidades de nutrientes que além de manter as funções basais durante a fase embrionária e no período pós eclosão do animal, estimulariam também seu desenvolvimento zootécnico.

Dentre as classes de nutrientes que podem ser utilizados para inocular ovos os aminoácidos foram pouco estudados. Sabendo disso, o uso de DL-metionina para fins de inoculação *in ovo*, surge como uma alternativa visando atender esta lacuna na comunidade científica e por apresentar características que podem favorecer o melhor desenvolvimento do embrião. Diante do exposto, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar os efeitos e o potencial biológico da DL-metionina para fins de inoculação em ovos embrionados.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Fatores que influenciam a incubação artificial**

Desde o início da utilização da incubação artificial os parâmetros físicos que devem ser rigorosamente respeitados para o sucesso de eclosão e qualidade dos pintinhos continuam os mesmos, ocorrendo apenas alguns ajustes após vários trabalhos de pesquisas que buscaram otimizar esta técnica, sendo eles: a temperatura, umidade relativa, viragem, fluxo de ar, oxigênio e dióxido de carbono, fatores necessários para o desenvolvimento geral do organismo durante 21 dias (ROSA et al., 2002).

Enquanto estão dentro do ovo na máquina incubadora os pintinhos são considerados pecilotérmicos, sendo a temperatura um fator crítico para o desenvolvimento embrionário e o ponto de gatilho de todo processo (CHRISTENSEN, 1995). Segundo Lourens et al. (2004) o fato de manter a temperatura na fase embrionária constante possibilitava o nascimento de pintos mais pesados em comparação aqueles incubados em temperaturas que oscilavam, outra diferença observada era o peso relativo dos órgãos que apresentavam alterações de acordo com a temperatura ofertada, assim como Leksrisompong et al. (2007) estudaram o efeito de altas temperaturas (39,5 °C) na fase final de incubação sobre o desenvolvimento do pinto e observaram que o aumento da temperatura prejudicou o desenvolvimento do coração, intestino delgado, pro-ventrículo e moela.

Atualmente as incubadoras mantêm as temperaturas de incubação entre 37,5 °C e 37,8°C até o momento da transferência após este momento as temperaturas são diminuídas para menos de 36,5°C, pois a partir daí o embrião já está bem desenvolvido ocorrendo o aumento do incremento calórico causado pela rápida e coordenada sequência de eventos de preparação para a vida fora do ovo nos últimos 4 dias de incubação (GROFF et al., 2017).

A temperatura do ovo necessária para o desenvolvimento do embrião depende de temperatura de incubação, produção de calor metabólico do embrião e condutância térmica entre o ovo e o ar circundante (TULLET, 1990).

A umidade relativa é extremamente importante para o sucesso da eclosão e viabilidade dos pintos, para que este evento ocorra é necessário que haja uma perda de 12% a 14% de água em relação ao peso inicial do ovo, caso contrário o efeito aditivo da água metabólica aumentaria o conteúdo de água no ovo (NARUSHIN, 2005).

Para haver essa perda de água é necessário que a umidade na incubadora esteja em torno de 45%, levando em consideração a quantidade de água formada pelo processo

metabólico para obtenção de energia, sendo assim caso o embrião continuasse com a mesma quantidade de água desde o início da incubação ou tivesse uma perda menor que a necessária a transição da respiração corio-alantoideana para pulmonar seria impossível, uma vez que quanto mais água for perdida, maior a câmara de ar no final da incubação e maior aporte de oxigênio estará disponível para insuflar os pulmões após ação dos surfactantes e toda a descarga hormonal que desencadeia esse fenômeno (FRENCH, 2006).

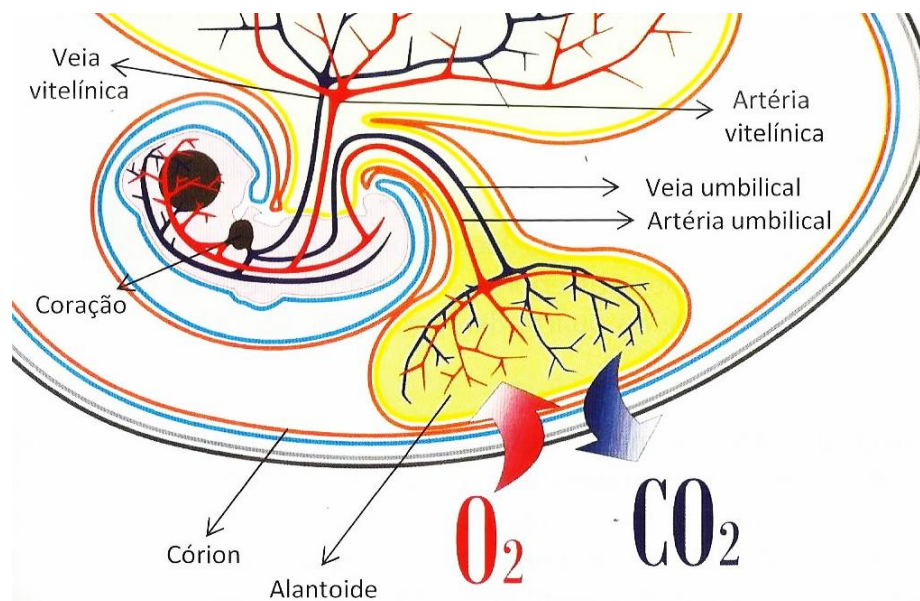
Quanto a viragem dos ovos esta é iniciada ainda no oviduto materno dando origem ao chamado desenvolvimento embrionário espacial-temporal que será de grande relevância para diferenciação celular ordenada durante a incubação. Quando todas as células ainda são iguais a viragem tem o papel fundamental de determinar em qual posição haverá a diferenciação para a formação e desenvolvimento dos sistemas do animal, um exemplo disso é a concentração de ácido retinóico, um precursor da vitamina A, no polo onde há maior quantidade deste composto será estabelecido o sistema nervoso, bem como o sistema circulatório intra-embriônico inicial, responsável pela distribuição de nutrientes para as células em já acelerado processo de diferenciação (BOERJAN, 2006).

A viragem dos ovos também auxilia evitando aderência dos embriões à casca e facilita o fluxo dos fluidos embrionários. Nos momentos iniciais de incubação a movimentação de gema e albúmen provocada pela viragem também auxilia na difusão de gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ) e alterações de pH facilitando as reações químicas do embrião nessa fase (MEIJERHOF, 2007).

O último fator externo mais importante é o fornecimento de oxigênio aos embriões e a consequente retirada de dióxido de carbono dos mesmos. A fonte desse gás provirá do próprio ar ambiente da sala de incubação de forma que, pelo processo de difusão, os ovos trocam gases com o meio ambiente, devido à diferença de concentração das moléculas através dos poros, presentes em toda a superfície da casca, onde há a captura de  $\text{O}_2$  e a liberação de  $\text{CO}_2$ . Esse processo é influenciado pelo comprimento, área e número dos poros (LA SCALA, 2003). Portanto, essa capacidade da casca em realizar trocas de gases (vapor de água, oxigênio e gás carbônico), com o ambiente é chamada de condutância da casca (figura 1).

Ainda segundo La Scala (2003), como os embriões não podem controlar voluntariamente as trocas gasosas que ocorrem por difusão na casca do ovo, a condutância da casca e das membranas necessitam estar perfeitamente ajustadas a

demanda metabólica da ave em desenvolvimento. A teoria da condutância estabelece um estado ou período de platô no consumo de oxigênio do ovo que estimula muitos processos fisiológicos da bicagem e eclosão. No 19º dia (platô) aumenta a necessidade de oxigênio e a difusão não pode suprir essa exigência, apresentando uma hipóxia que estimula o embrião à bicagem interna e à eclosão. Este estímulo pode ser também neurofisiológico ou por mudanças do equilíbrio ácido-básico e/ou pressão de gases ou combinação destes fatores.



**Figura 1.** Representação esquematizando o fluxo de circulação cardiovascular e o metabolismo respiratório do embrião avícola (BARBOSA, 2011).

## 2.2. Desenvolvimento embrionário e fisiologia do trato gastrointestinal de pintos durante a incubação

### 2.2.1. Desenvolvimento Embrionário

Diferente dos mamíferos as aves possuem apenas o conteúdo presente no ovo para a formação e desenvolvimento de todo o organismo nos 21 dias de incubação e ainda garantir reserva energética para o período pós eclosão (GONÇALVES et al., 2013). Após a fecundação, várias reações químicas acontecem e o blastocisto transforma-se em blastoderma e todos os processos embriológicos sucessivos ocorrem apenas estimulados pela temperatura interna da ave, sendo basicamente divididos em dois momentos clivagem e gastrulação.

A clivagem tem início ainda durante a formação da casca no útero da galinha e é nesse local que se forma a blastocele após sucessivas divisões de células denominadas blastômeros e também os precursores dos futuros tecidos embrionários (epiblasto e hipoblasto) e da ave adulta (HYBRO 2007).

A gastrulação também ocorre ainda no organismo da ave e forma o eixo central do embrião a partir daí terá início a linha primitiva e a formação dos somitos, os quais originarão os órgãos da ave até a fase adulta. Durante a gastrulação também são formados as três camadas de células que serão responsáveis pela formação de determinados tecidos do organismo do embrião, conhecidos como: endoderma que dará origem ao sistema respiratório, órgãos secretores e contribuirá para a formação de várias partes do trato gastrointestinal; ectoderma será a base principal para a formação da pele, bico, cloaca, olhos e sistema nervoso e mesoderma a partir dessa o tecido ósseo, o sistema sanguíneo/circulatório, excretório, e os órgãos reprodutores (BOERJAN, 2006; HYBRO 2007).

O desenvolvimento embrionário pode ser dividido então após esses dois processos (clivagem e gastrulação) em quatro fases: organogênese caracterizada pelo início da organização do sistema nervoso; morfogênese que compreende todos os processos pelos quais diferentes partes de um sistema em desenvolvimento adquirem uma forma definitiva ou passam a ocupar determinada posição no organismo e também a diferenciação celular, essas duas fases ocorrerão até o 10º dia de incubação; fase de integração funcional quando os órgãos já formados passam a atuar de forma interligada e não independentes; e a fase final, a partir do 14º dia, quando ocorre a maturação embrionária até os 21 dias quando a ave está pronta para eclodir (WILLIER, 1954; DEEMING, 2002).

### **2.2.2. Fisiologia e desenvolvimento do trato gastrointestinal no período pré e pós eclosão**

O início do desenvolvimento do trato gastrintestinal ocorre nas primeiras 96 horas de incubação (MACARI & GONZALES, 2003), a formação da boca, do pró-ventrículo e da moela ocorre durante o quinto dia de incubação, e em seguida da formação do bico que ocorre geralmente no sexto dia de vida.

O tecido do intestino é derivado de endoderme circundado por mesoderme esplânica e divide-se em intestino anterior, intestino médio, intestino grosso ao terceiro dia incubação (MOORE & PERSAUD, 2008). A endoderme originará o revestimento



epitelial do intestino e aos ductos das glândulas mucosas e a mesoderme dá origem à parede muscular e ao tecido conjuntivo (DIBNER & RICHARDS, 2004; DIBNER et al., 2007). No sexto dia de incubação, observa-se a presença da alça duodenal, do intestino delgado e dos cecos.

O intestino primitivo é aberto e está ligado à gema através do divertículo de Meckel, assim as paredes do saco vitelino e as paredes do intestino são contínuas. O intestino grosso primitivo dará origem à cloaca e à bolsa de Fabricius no quarto dia de incubação. O maior progresso no desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) dos pintos ocorre nos últimos dias de incubação com mudanças drásticas que preparam o animal para receber a alimentação exógena incluindo basicamente a diferenciação dos enterócitos e a definição das criptas, bem como, o grande aumento da superfície absorptiva do intestino (FREEMAN & VINCE, 1974).

As principais estruturas que deverão ser desenvolvidas para garantir a sobrevivência do pintinho são: as células enteroendócrinas e caliciformes, as vilosidades e criptas, a partir daí todo um aparato será criado para garantir a digestão e absorção dos nutrientes (TAKO et al., 2004).

As células enteroendócrinas, podem ser observadas pela primeira vez no 13º dia de incubação apresentando formato piramidal ou oval com grânulos marrons escuros localizados na posição infra-nuclear, estão presentes no epitélio dos vilos. Aos 20-21 dias de incubação apresentam distribuição uniforme no intestino delgado, sendo observado também criptas rudimentares (OZAYDIN & CELIK, 2012).

As células caliciformes correspondem a 13% das células epiteliais e contém em sua maior parte mucina ácida, este fato é observado ao 18º dia de incubação, atuando como lubrificante secretando glicoproteínas e como uma barreira protetora da mucosa intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da ingesta. A partir do 20-21º dia de incubação as células caliciformes produzem mucinas ácidas e neutras (OZAYDIN&CELIK, 2012). Os mesmos autores comentam ainda que o número de células caliciformes aumenta no sentido distal dos segmentos intestinais e após a eclosão assume a função de barreira contra patógenos.

As vilosidades e criptas são rudimentares até o 15º dia de incubação, ocorrendo o ápice de desenvolvimento estrutural nos últimos dias, o desenvolvimento da cripta é crucial na maturação intestinal, com função de secretar diversas enzimas, como sucrase e maltase possuem ainda células especializadas na produção de hormônios. O aumento

no número e tamanho das criptas fornece enterócitos para aumentar a superfície absorptiva intestinal à medida que o vilos cresce (OZAYDIN & CELIK, 2012).

Segundo Sklan (2001) após a eclosão o TGI está totalmente desenvolvido, porém imaturo, neste momento ocorre a preparação do sistema digestório que passará de uma dieta rica em lipídios para uma dieta rica em carboidratos e proteínas. Dentre as mudanças que sucedem o período pós embrionário, o aumento da atividade enzimática na borda em escova como nos órgãos que as secretam, é a de maior relevância. No intestino delgado a máxima atividade da lipase foi observada no 14º dia de idade, da tripsina e da quimiotripsina, no 11º e da amilase no 17º (NITSAN et al., 1991).

Quanto a estrutura no momento da eclosão todos os enterócitos estão em proliferação, passando por um processo de hipertrofia e ganhando a morfologia típica de enterócitos após as primeiras 24 horas (GEYRA et al., 2001). Sendo a estrutura utilizada para avaliação do desenvolvimento da mucosa intestinal, as vilosidades são mensuradas quantificando a sua altura e quantidade de vilos presentes, pois assim é sabido que quanto maior as vilosidades, maior o número de células epiteliais (enterócitos, células caliciformes e enteroendócrinas). Esse processo decorre primariamente de dois eventos citológicos associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), onde as células totipotentes, que ficam localizadas nas vilosidades e criptas sofrem sucessivas divisões mitóticas ao mesmo tempo que outras áreas são moldadas através da perda de células (apoptose) que ocorre normalmente no ápice dos vilos (MAIORKA et al., 2002).

O equilíbrio entre esses dois processos determina o “turnover” (apoptose e renovação) constante, ou seja, a manutenção do tamanho dos vilos e, portanto, a manutenção da capacidade digestiva e de absorção intestinal (MAIORKA et al., 2002; MAIORKA et al., 2003). As criptas começam a se formarem no dia da eclosão e se definem dentro de 2 a 3 dias, aumentando tanto em número de células quanto em tamanho (GEYRA et al., 2001).

O intestino tem seu desenvolvimento moldado por dois processos: hiperplasia e hipertrofia ocorrendo com maior intensidade até o 7º dia após a eclosão e estimulado principalmente pela passagem do alimento. Esse desenvolvimento ocorre de forma diferenciada nas diferentes regiões, sendo mais rápido no duodeno quando comparado com íleo e jejuno. Vários fatores podem influenciar a taxa de maturação intestinal, incluindo estresse, estado de saúde e disponibilidade de nutrientes (MACARI & GONZALES, 2010).

### 2.3. Alimentação *In Ovo*

Aproximadamente a 26 anos atrás a tecnologia *in ovo* foi disponibilizada pela primeira vez para vacinação de frangos contra a doença de Marek, umas das doenças neoplásicas de maior importância nos países com avicultura industrial. A máquina Inovoject®, fabricada pela Embrex, Inc., foi o primeiro sistema automatizado a ser introduzido nos Estados Unidos. Máquinas de injeção *in ovo* agora são fabricadas por 4 empresas diferentes e estão atualmente em uso em mais de 90% dos incubatórios dos EUA, essas máquinas têm a capacidade de administrar vacinas de 25.000 a 62.000 ovos por hora (WILLIAMS & ZEDEK 2010).

Embora ainda não comercialmente utilizada, a aplicação de vacinas, medicamentos, hormônios, probióticos, prebióticos e outros vários nutrientes suplementares tem como objetivo aumentar potencialmente a imunidade e crescimento do pintinho e têm sido continuamente estudado em vários laboratórios nos últimos 20 anos (PEEBLES, 2018). Estudos conduzidos para investigar a potencial eficácia e uso comercial dessas vacinas, culturas e suplementos nutricionais envolveram o uso de aplicações manuais e automatizadas, além das vacinas aplicadas comercialmente, outras vacinas testadas experimentalmente incluem as da gripe aviária (STONE et al., 1997) e *Mycoplasma gallisepticum* (ELLIOTT et al., 2017).

Entre os vários nutrientes testados para avaliação da eficácia em melhorar o desenvolvimento embrionário, eclodibilidade e desempenho pós-eclosão quando administrados *in ovo* incluem, aminoácidos, peptídeos, carboidratos, nucleotídeos, eletrólitos, vitaminas, L-carnitina, creatina e extratos vegetais (KUCHARSKA et al., 2017). Uni e Ferket (2004) afirmaram que a mortalidade vivenciada pelos filhotes durante o período crítico pós-eclosão, quando estão em adaptação aos novos ambientes e a alimentação exógena, pode ser aliviada pela administração *in ovo* de nutrientes no estágio final do período embrionário.

A nutrição *in ovo* consiste na inoculação de substâncias durante o desenvolvimento embrionário com a finalidade de aumentar o estado nutricional do embrião, além de permitir a introdução de nutrientes específicos em contato com as células do intestino, antes mesmo da eclosão, melhorando, assim, a capacidade de digerir alimentos pelo neonato. A inoculação manual (experimental) é realizada por meio da introdução de nutrientes ou outras substâncias no líquido amniótico através do uso de seringas descartáveis (LEITÃO et al., 2010), com o objetivo de melhorar o

estado nutricional do embrião, o que implica em aumento da eficiência digestiva redução da mortalidade e da morbidez pós-eclosão e melhor desenvolvimento do sistema imunológico (UNI et al., 2004).

Outro importante impulsionador deste tipo de pesquisa está relacionado a maior exigência das aves atualmente. Sabe-se que, o ovo contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do pintinho durante a fase embrionária, no entanto, o alto potencial genético das linhagens modernas possui uma exigência metabólica muito maior, pois os seus organismos estão geneticamente preparados para um desenvolvimento rápido, onde aos 45 dias estão aptos para o abate, assim, a inoculação de substâncias nutritivas auxiliam na maior disponibilidades de nutrientes que além de manter as funções basais durante a fase embrionária e no período pós eclosão do animal, estimulariam também seu desenvolvimento zootécnico no pós-eclosão (LEITÃO et al., 2010).

Segundo Foye (2006), a suplementação *in ovo* estimula o desenvolvimento precoce do TGI, pois os nutrientes não respondem apenas ao estímulo físico, mas primeiramente às características químicas dos nutrientes aumentando a capacidade de digestão e de absorção do intestino. Em estudo realizado por Tako et al., (2004) a suplementação em ovo de solução salina contendo maltose, sacarose e dextrina aumentou a atividade de maltase na borda em escova do intestino delgado e promoveu maior desenvolvimento das vilosidades, a partir de 48 horas após a suplementação (com 17,5 dias de incubação).

No manejo técnico de inoculação *in ovo*, os pesquisadores afirmam que, dependendo de vários fatores como a fase de desenvolvimento do embrião e a composição da solução, pode ser determinado o volume ideal a ser aplicada em diferentes locais de ovo, concentrações, osmolaridades e outros parâmetros, podendo ser observado presença de partículas inoculadas no lúmen intestinal 4 horas após o procedimento. No entanto, a falta de informação sobre os efeitos da inoculação de diversas substâncias sobre a fisiologia do embrião, continua impedindo o pleno desenvolvimento de tecnologias voltadas para a industrialização do processo de inoculação (GEYRA et al., 2001; JOCHEMSEN & JEURISSEN, 2002).

Durante o período de incubação e nas primeiras horas após a eclosão, as aves possuem limitadas funções digestivas, o que, conseqüentemente, reduz a disponibilidade de nutrientes para o seu metabolismo de crescimento, e restringe sua

capacidade digestiva, que começa a se desenvolver quando o líquido amniótico é consumido por via oral cerca de 17 dias de incubação (UNI et al., 2005).

Do 15º ao 19º dia de incubação o líquido amniótico é totalmente consumido oralmente e, conseqüentemente, as substâncias presentes também são ingeridas, criando a possibilidade de ingestão de nutrientes exógenos antes do nascimento (UNI et al., 2003; CAMPOS et al., 2010). Além disso, tem-se demonstrado que o embrião possui enzimas digestivas (SKLAN et al., 2001) que tornam possível a nutrição na fase pré-eclosão. Assim, o embrião pode consumir naturalmente nutrientes pela via oral antes de nascer (FERKET & UNI, 2003). A maturidade da mucosa intestinal é representada pelo aumento na produção e na atividade das enzimas digestivas, de transportadores de membrana e pelo desenvolvimento dos enterócitos das criptas podendo ser influenciada por agentes tróficos (CAMPOS et al., 2010).

#### **2.4. Principais nutrientes utilizados na alimentação *in ovo***

Mesmo considerado um alimento completo, o ovo, atualmente supre apenas as necessidades iniciais do embrião, ocorrendo um déficit de nutrientes no período final da incubação podendo ocasionar a utilização de proteínas musculares para produção de energia interferindo diretamente no desempenho do animal futuramente (GONÇALVES et al., 2013).

Os nutrientes utilizados podem estar envolvidos com diferentes funções: fontes de energia (sacarose, dextrina, maltose e glicose), ativação do sistema imunológico (vitamina E, cobre, probióticos e prebióticos), metabolismo e anabolismo protéico (HMB e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina) e/ou agentes tróficos da mucosa intestinal (glutamina, zinco e ácido butírico) (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 2005; CAMPOS et al., 2010; LEITÃO et al., 2014).

Por apresentar uma quantidade mínima no ovo, os carboidratos vêm sendo utilizados amplamente em pesquisas sobre alimentação *in ovo*. Num estudo feito por Tako et al (2004), foi inoculado maltose, sacarose e dextrina no líquido amniótico de ovos de frangos da linhagem Ross aos 17,5 dias de incubação, como resultado obtiveram que o grupo inoculado com 1 ml dessa solução apresentou, maior média das vilosidades intestinais em 33%. Também aumentou a atividade da sacarose-isomaltase jejunal 48h após a inoculação. A capacidade das aves para digerir dissacarídeos foi aumentada, o que subseqüentemente aumentou seu crescimento.

O principal objetivo do uso de carboidratos na nutrição *in ovo* é aumentar os níveis de glicogênio muscular para suprir o déficit energético do embrião no momento da eclosão principalmente por ocorrer a passagem da respiração cório-alantóide à pulmonar. Nesta fase, o suprimento de glicose é alcançado, em um primeiro momento, a partir das reservas de glicogênio e por depleção de proteínas, por glicogenólise e gliconeogênese, respectivamente (LEITÃO et al., 2010).

Quanto aos aminoácidos, sua utilização em pesquisas sobre inoculação *in ovo* ainda é escassa. Apesar de apresentar na gema níveis suficientes para o pleno desenvolvimento embrionário e eclosão do pintinho, após o nascimento, as reservas aminoacídicas do saco vitelino são insuficientes para sustentar o crescimento acelerado das linhagens atuais (OHTA& KIDD, 2001).

Recentemente, os autores Zhang et al (2018), utilizaram solução salina a 0,75% e L-arginina, como resultado obtiveram o aumento das concentrações de glicogênio e glicose do fígado e músculo peitoral dos frangos de corte ao nascimento, bem como níveis plasmáticos de glicose e insulina em comparação com os não inoculados e controles inoculados com diluente. Além disso, a alimentação *in ovo* de L-arginina aumentou a glicose hepática e a atividade da 6-fosfatase e fosfoenolpiruvato-carboxiquinase e expressões de RNAm de frutose-1,6-bisfosfatase na eclosão.

Outros nutrientes que podem ser destacados para uso na alimentação *in ovo* são as vitaminas e os minerais devido sua importância no desenvolvimento embrionário. A deficiência de vitaminas durante a incubação, por exemplo, pode causar anormalidades como bicos pequeno ou alto, protrusões desorganizadas no cérebro, vísceras expostas, membros encurtados e torcidos, corpo curto e degeneração (CAMPOS et al., 2010).

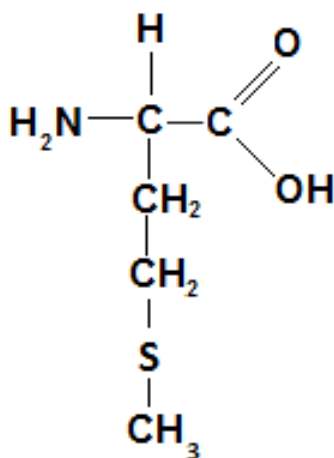
Já as deficiências de minerais específicos também podem ser rapidamente induzidas em embriões em desenvolvimento quando as reprodutoras recebem quantidades insuficientes destes, levando a reduzido crescimento, desenvolvimento anormal de todos os órgãos e em casos extremos à morte do embrião (JOCHENSEN & JEURISSEN, 2002).

## **2.5.Metionina**

Em 1950 foi descoberta a importância da metionina na alimentação animal e a introdução na nutrição foi iniciada em 1977 com o análogo de hidroxila de metionina líquida e posteriormente em 1985 como DL-metionina em pó. A metionina é sintetizada

naturalmente por plantas e microrganismos a partir do aspartato (LEHNINGER et al., 2002). É uma das principais doadoras de grupo metil, na forma de S-adenosilmetionina, necessário à todas as reações biológicas de metilação. (TESSERAUD et al., 2009).

A metionina é um aminoácido sulfurado ( $C_5H_{11}NO_2S$ ) (figura 2) essencial e aparece como primeiro limitante na nutrição das aves. Isso se deve ao fato de as rações para aves serem formuladas com a tradicional mistura milho e farelo de soja, que parece não atender às exigências desse aminoácido, comprometendo características produtivas e reprodutivas (DAENNER & BASSEI, 2002).



**Figura 2.** Estrutura química da metionina (LEHNINGER, 2002).

As fontes deste aminoácido comumente disponíveis no mercado são: ácido DL-2-amino-4 (metiltio) butanóico, apresentada na forma de pó (DL-metionina) ou na forma líquida como sal de sódio (DL-metionina-Na). Os hidroxi-análogos de metionina (MHA) ou o ácido DL-2-hidroxi-4 (metilo) butanóico são comercializados na forma de pó, como sal de cálcio (MHA-Ca) ou na forma líquida, como ácido livre (MHA-AL) é produzida, principalmente, por síntese química a partir de metilmercaptano, acroleína (um aldeído de carbono) derivado de propileno (um derivado do petróleo) e cianeto de hidrogênio (BUTOLO, 2002).

Sua função principal é participar da síntese protéica, sendo ainda uma fonte de enxofre que pode ser doado para a síntese de outros componentes químicos que apresenta o enxofre em sua composição (WU, 2003). Tem grande participação na síntese da cisteína que é também utilizada para a síntese da proteína corporal, formação da pele, penas e pêlos, sendo este aminoácido importante frente ao estresse e ao status inflamatório (TESSERAUD et al. 2009).

Outra importante função da metionina é o seu papel como precursora da sarcosina, que através da via de transmetilação tem função importante na estrutura de várias proteínas incluindo as imunoglobulinas, ligando várias ligações polipeptídicas via pontes dissulfeto. É precursora ainda da glutatona, este aminoácido tem função antioxidante celular, atuando na proteção das células contra o estresse oxidativo e é essencial na regulação da divisão celular, recuperando proteínas oxidadas, prevenindo assim, o acúmulo celular de proteínas danificadas, com implicações potenciais na saúde animal, no desenvolvimento tecidual e na qualidade de produtos (carne). Juntamente com a cisteína, a metionina é fundamental para a síntese de taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico), aminoácido que age como um neuro-inibidor juntamente com a glicina (STADTMAN et al., 2002).

A metionina pode ser utilizada como prevenção da enterite necrótica. Em aves desafiadas com *Clostridium perfringens* e *Streptococcus* houve um menor desenvolvimento bacteriano no íleo e ceco nas aves que tiveram sua dieta suplementada com excesso de metionina. A metionina hidróxi-análoga ácido livre (MHA-FA) é uma fonte altamente eficaz de metionina e, devido à sua natureza orgânica, pode reduzir o pH do trato gastrointestinal, suprimir as bactérias patogênicas sensíveis a ácidos, estimular a absorção de nutrientes e a resposta imune (DAHIYA et al., 2007).

### **2.5.1. Metabolismo da Metionina**

Após todo o processo mecânico e enzimático para redução das proteínas em aminoácidos, os isômeros L-metionina e D-metionina, são transportados ao fígado local em que ocorre parte do metabolismo da metionina, sendo este responsável pela conversão da MHA e D-metionina para L-metionina (forma absorvida). Normalmente, os aminoácidos, incluindo a metionina, são absorvidos principalmente pelo intestino delgado (PILLAI et al., 2006; STUBS et al., 2002; DIBNER et al., 2007).

Após chegar ao fígado a metionina tem seu processo de metabolização dividida em 3 fases: metilação (a metionina é convertida em homocisteína (HCY)), remetilação (a homocisteína é convertida em metionina), e transulfuração (a homocisteína é convertida em cisteína) (STUBS et al., 2002; DIBNER et al., 2007). De acordo com Oliveira (2014) na etapa de metilação a enzima metionina-adenosil-transferase catalisa a transferência da adenosina que provém de uma molécula de ATP para metionina, transformando-a em S-adenosil-metionina (SAM), atuando como co-substrato que fornece no processo de metilação, grupos metil (CH<sub>3</sub>) necessário para vários processos



metabólicos, incluindo a metilação de um produto aceptor (DNA, síntese de RNA, lipídios e proteínas) reação favorecida pela enzima metil-transferase, formando S-adenosil-homocisteína (SAH). Para formar a homocisteína, final do processo, o grupo adenosina deixa a molécula do SAH, o qual reage com uma molécula de água, com apoio da enzima adenosil-homocisteína hidroxilase.

A homocisteína é um aminoácido sulfurado presente no sangue e nos tecidos dos animais, mas não incorporado na proteína, biosintetizado a partir da metionina, que pode ser remetilada ou pode condensar com serina para formar cistationina pelo processo de transulfuração (WALTERLAND, 2006).

A fase de remetilação é o processo em que a homocisteína retorna à metionina através da via vitamina B12 e ácido fólico na presença das enzimas metionina-sintase e metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR) ou via betaína (dependente de colina) na presença da enzima betaína-homocisteína-metiltransferase (BHMT). O grupo metil fornecido pela BHMT é derivado de betaína, um produto resultante da oxidação de colina predominantemente no fígado (GRIMBLE, 2006).

Por último, a transulfuração é o processo em que a homocisteína transformar-se em cisteína envolvendo reação irreversível entre homocisteína e L-serina, catalisada pela enzima cistationa  $\beta$ -sintase, que resulta na formação da cistationa. Posteriormente, a enzima cistationa  $\beta$ -liase promove a transformação da cistationa em cisteína, que é responsável pela formação de vários componentes corporais importantes, em que a metionina é 100% eficiente como precursor de cisteína (PILLAI et al., 2006).

## **2.6. Conteúdo energético e sua utilização pelo embrião**

A obtenção de energia durante o período embrionário deriva do substrato gema para realização de conversões energéticas e sua composição permite que os processos bioquímicos principais se resumam, em condições normais, a transformação de carboidratos e gordura em energia (ATP), para, a partir daí todos os outros processos transformativos serem realizados com eficiência pelo embrião. No período inicial, a energia gasta decorre, em grande parte, por glicólise através de glicose prontamente acessível, ou por um aumento transitório de lactato que ocorre até a corioalantóide se tornar funcional (CIROTTO & ARANGI, 1989).

E à medida que o corioalantóide inicia suas funções respiratórias, o acesso ao oxigênio, via os poros presentes na casca do ovo sustenta plenamente a oxidação de

ácidos graxos da gema, utilizados como fonte primária de energia e como base para o desenvolvimento embrionário (BARBOSA, 2011).

Ainda que os carboidratos sejam uma via fácil para obtenção de energia, sua rentabilidade energética não é suficiente, ao contrário dos lipídios, estes possuem um processo de queima maior, porém o saldo energético final é superior, este evento é incrementado quando há presença de oxigênio. Assim, o embrião utiliza fontes de carboidratos (que estão pouco presentes no ovo) no início de seu desenvolvimento e quando há demanda energética de pronta utilização (como por exemplo no processo de nascimento, a partir da quebra de glicogênio hepático que começa a ser armazenado ainda no primeiro terço de incubação). Caso contrário é vantajoso para o embrião se fartar da energia contida nas gorduras da gema, mantendo um crescimento e desenvolvimento ordenado (LUMEIJ, 1997; BARBOSA, 2011).

O ácido oléico, linoleico, palmítico, araquidônico entre outros são gorduras presentes na gema, sendo degradadas através de reações beta oxidativas em que os ácidos graxos de cadeia longa são transformados em Acetil-CoA, entrando a partir daí no ciclo de Krebs, resultado também em energia, CO<sub>2</sub> e água. A participação de enzimas (variável química) nos processos de transformação desses substratos em energia, e é um dos fatores de maior importância neste processo, levando em consideração que elas catalisam as reações permitindo a formação de tecidos e de outras reações em tempo hábil. Outra variável que deve ser salientada é a temperatura (variável física), com a função também de acelerar as reações (BARBOSA, 2011).

Entre o 10° e 12° dia de incubação a ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucóide são proteínas de destaque evidenciadas no sangue e continuam a ser detectáveis após a eclosão. A ovomucóide, inclusive, é uma das proteínas do albúmen que tem grande quantidade de carboidratos, Como resultado, a glicose no sangue aumenta progressivamente para dar suporte ao fígado e a deposição de glicogênio muscular (MORAN Jr., 2007).

Outrora, no momento que há a bicagem interna da casca, a estratégia metabólica do organismo é modificada. Neste período chamado de parafetal ou peri-natal, a primeira respiração inicia, no momento que o bico penetra a membrana interna da casca, para entrar na câmara de ar do ovo (bicagem interna). Neste período, a hipóxia pode ter influência radical tanto na sobrevivência do embrião como nos processos metabólicos e no desenvolvimento pós-natal (DECUYPERE et al., 1991).

O incremento do fluxo sanguíneo pulmonar no período pré-natal é controlado pelo hormônio ornitocinina, a forma da bradicinina nas aves, cuja síntese é catalisada pela enzima ornitocalicreína (ACE), as quais se incrementam nos dias 18º e 20º da incubação. A atividade de ornitocalicreína é aumentada depois da entrada do embrião na câmara de ar do ovo, a qual pode ser devido à hipóxia neste período, ocasionando um maior fluxo sanguíneo ao pulmão (LUMEIJ, 1997; BARBOSA, 2011).

Hoibyet al. (1987) afirmaram em seus estudos que o aumento transitório de lactato (produto da glicólise anaeróbia) que ocorre após a bicagem interna, desaparece quando a função pulmonar provê concentração de oxigênio adequada para o catabolismo de ácidos graxos continuar como fonte de energia.

Morita et al. (2009) afirmaram ainda que a energia derivada do metabolismo anaeróbico durante os períodos anteriores à eclosão é necessária para sustentar tanto a manutenção fisiológica do embrião quanto o seu crescimento. Entretanto, se esta energia é limitada, o embrião terá que escolher entre crescimento corporal e atividade vital de manutenção (BARBOSA et al., 2011).

A incorporação do saco vitelino na cavidade abdominal se inicia a partir dos 19 dias de incubação e a retração se completa antes que aconteça a eclosão. O pintainho permanece com esta reserva de saco vitelínico residual, suficiente para manter um suprimento adequado de nutrientes como fonte de energia por pelo menos dois dias após o nascimento (NOY & SKLAN, 1998; SPEAKE et al., 1998; BARBOSA et al., 2011).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Local de desenvolvimento do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Tecnologia Avícola do Setor de Avicultura do Departamento de Produção Animal e Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias (figura 3) e no Laboratório de Morfologia Funcional, localizado no Departamento de morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, ambos localizados na Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.



**Figura 3.** Foto aérea do Setor de Avicultura de FCA/UFAM. Arquivo pessoal de Kely Cristina Bastos Teixeira Ramos Brelaz.

Todos os procedimentos experimentais para a avaliação de DL-metionina como um nutriente para alimentação *in ovo*, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo nº 006/2017) da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

#### 3.2. Montagem Experimental

Foram utilizados 224 ovos férteis oriundo de matrizes da linhagem semipesada Rhode Island Red com 35 semanas de idade. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram constituídos por duas soluções controle e cinco soluções experimentais contendo níveis crescentes de DL-metionina (tabela 1). A metionina (MetAMINO®) utilizada foi fabricada pela Evonik Animal Nutrition Ltda., denominada pura e micronizada, com 32 repetições (ovos) por tratamento, sendo cada ovo considerado uma repetição.

**Tabela 1.** Composição das soluções experimentais.

Tratamentos	Soluções	Osmolaridade (mOsm/L)
Ovo íntegro	0,0% de NaCl + 0,0 % de DL-metionina	-
Solução salina	0,5% de NaCl + 0,0 % de DL-metionina	170,94
Solução teste 1	0,5% de NaCl + 0,5 % de DL-metionina	237,96
Solução teste 2	0,5% de NaCl + 1,0 % de DL-metionina	304,98
Solução teste 3	0,5% de NaCl + 1,5 % de DL-metionina	372,01
Solução teste 4	0,5% de NaCl + 2,0 % de DL-metionina	439,03
Solução teste 5	0,5% de NaCl + 2,5 % de DL-metionina	506,06

Os ovos foram coletados, identificados, pesados e distribuídos em máquina incubadora modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 37,6 °C de temperatura e 66% de umidade relativa do ar, onde estas realizavam viragem dos ovos em intervalos de uma hora.

Aos 16 dias de incubação todos os ovos foram retirados da incubadora e submetidos à ovoscopia para seleção dos ovos férteis a serem utilizados. Estes foram higienizados e perfurados na região da câmara de ar evitando-se perfurar a membrana interna da casca do ovo (GONZALES et al., 2013), sendo as soluções formuladas com diferentes concentrações de DL- metionina injetadas à 0,5 ml na região do fluido amniótico utilizando-se seringas com agulha 7 x 2,5 mm e com auxílio de ovoscópio (figura 4) . Em seguida, o orifício da casca do ovo foi lacrado com parafina fundida (PEDROSO et al., 2006). Os ovos não passaram mais de 1 hora fora da incubadora e a sala onde ocorreu o processo de inoculação foi mantida a 37°C.



**Figura 4.** Inoculação *in ovo* das soluções experimentais. Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.

Os ovos após o processo foram transferidos para máquina de eclosão modelo PETERSIME 168 com compartimentos regulados a 36,6 °C de temperatura, e 76% de umidade relativa do ar, onde permaneceram até a retirada dos pintos aos 21 dias de incubação (504±02 horas).

As soluções testadas foram desenvolvidas tendo como base solução salina 0,5%, produzida com água destilada estéril e cloreto de sódio com a inclusão de níveis crescentes de DL-metionina.

### 3.3.Variáveis Analisadas

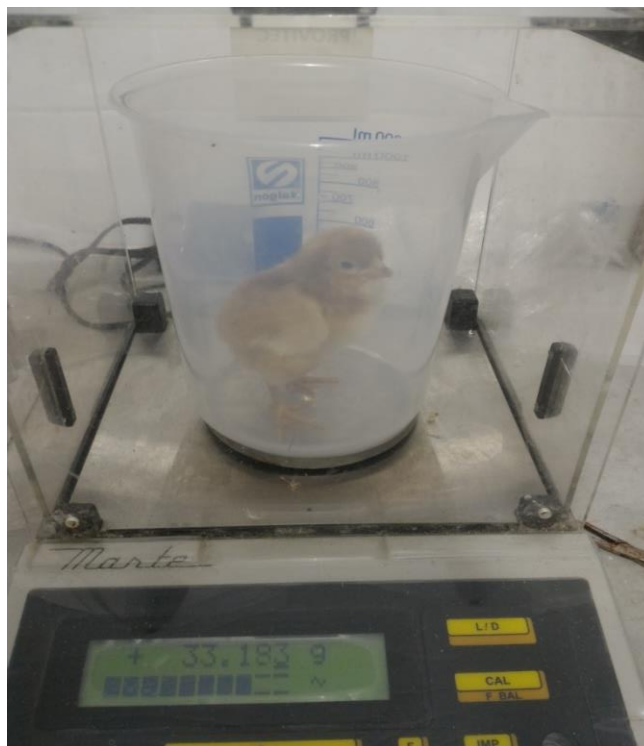
Neste experimento foram avaliados os rendimentos de incubação, a relação pinto/ovo, o desenvolvimento do trato gastrointestinal (órgãos diretamente relacionados e regiões), parâmetros bioquímicos séricos dos pintos ao nascer, densidade de células caliciformes e avaliação da densidade estrutural das túnicas do intestino delgado e grosso entre os tratamentos.

Os rendimentos de incubação foram: eclodibilidade (nº de pintos nascidos/nº de ovos férteis x 100), mortalidade intermediária (percentagem de pintos e/ou embriões mortos entre 16 e 18 dias de incubação), mortalidade tardia (percentual de pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo) e mortalidade pós-bicagem (percentual de pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, com bicagem da casca do ovo) (figura 5).



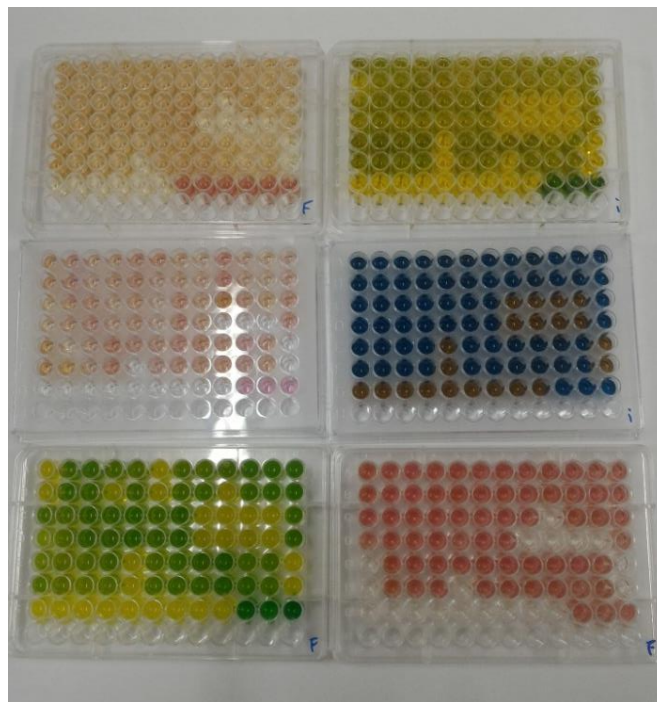
**Figura 5.** Análise de mortalidade embrionária (embriodiagnóstico). Em sequência: a) mortalidade intermediária, b) mortalidade tardia, e c) mortalidade pós-bicagem. Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.

As variáveis da relação pinto/ovo foram: peso do ovo (g), perda de peso do ovo (%), peso do pinto (g) (figura 6) e correlação pinto/ovo (peso do pinto/peso do ovo).



**Figura 6.** Pesagem de pintainho logo após a eclosão. Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.

A partir dos resultados de eclodibilidade, foram selecionados cinco pintos aptos de cada tratamento para coleta de sangue individual. A amostra sanguínea foi retirada por meio de punção cardíaca e armazenada em microtubos contendo EDTA. O sangue foi centrifugado e o plasma utilizado para as análises dos parâmetros bioquímicos: glicose, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol total, albumina e uréia. Todos os ensaios foram realizados por meio de métodos colorimétricos-enzimáticos (glicose, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol total e uréia) ou simplesmente colorimétrico (proteínas totais e albumina). Foram utilizados kits comerciais da marca Labtest Diagnóstico®. As microplacas foram lidas em espectrofotômetro Thermo Multiskan Go® (figura 7).



**Figura 7.** Análises bioquímicas séricas. Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.

Os mesmos pintos foram em seguida eutanasiados pelo método de deslocamento cervical para avaliação do desenvolvimento do trato gastrointestinal através dos seguintes parâmetros: peso do saco vitelino (g), peso do coração (g), peso do fígado (g), peso do pâncreas (g), peso do pró-ventrículo (g), peso da moela (g), comprimento da orofaringe + esôfago (cm), comprimento da alça duodenal (cm), comprimento do jejuno + íleo (cm), comprimento dos cecos (cm) e comprimento do cólon + reto (cm).

As análises histológicas consistiram em: estimar a densidade de células caliciformes nas criptas e nas vilosidades bem como quantificar o volume fracional (proporção relativa) das túnicas (submucosa, mucosa, muscular e serosa) do intestino entre os tratamentos.

As amostras foram coletadas logo após a eutanásia dos animais, uma amostra do intestino delgado do ponto médio entre a porção proximal descendente e a distal ascendente da alça intestinal; e uma amostra do intestino grosso sendo fixadas em formaldeído 10%. As amostras do intestino foram submetidas aos procedimentos histológicos de rotina, sendo desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol, diafanizadas em xilol, imersas em parafina, microtomizadas a  $3,0\mu\text{m}$ , dispostas em lâminas de vidro, secas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  *overnight* (BANCROFT et al.,2008).

Para a fase de coloração das lâminas foram utilizados três tipos de corantes: Hematoxilina-Eosina, Azul de Alcian e Periodic Acid Schiff (PAS). O processo de



desparafinização foi realizado inicialmente em todas as lâminas com dois banhos de xilol e banhos de concentrações decrescente de etanol de 100% a 50% e dois banhos em água destilada. Para a coloração em hematoxilina as lâminas foram mergulhadas no recipiente contendo o corante por 20 segundos e posteriormente para contracoloração em eosina por 25 minutos. Para coloração em Azul de Alcian as lâminas foram mergulhadas em recipiente com corante por 10 minutos e contracoradas com eosina mergulhando-as por 1 segundo. Para coloração em PAS as lâminas foram mergulhadas em ácido periódico 1% por 10 minutos, lavadas e coradas com reagente de Schiff por 10 minutos.

As lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram utilizadas para avaliação do volume de deles ou fracional das túnicas (mucosa, submucosa, muscular e serosa) que tem por objetivo quantificar o percentual de cada uma dessas estruturas. As lâminas coradas com azul de alcian foram utilizadas para quantificação de células caliciformes diferenciando-as entre produtoras de mucinas sulfatadas e carboxiladas. As lâminas coradas com PAS utilizadas para quantificar as células caliciformes produtoras de mucinas neutras.

Posteriormente todas as lâminas foram reidratadas com banhos crescente de etanol e dois banhos em xilol. As lâminas montadas foram fotografadas e a análise morfológica foi realizada no sistema analisador de imagem Stepanizer® através do sistema de pontos estereológicos, após seleção de 3 vilos íntegros para as análises.

### **3.4. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do programa computacional SAS (2008), os dados foram submetidos à análise de variância e as estimativas dos tratamentos foram analisadas por regressão polinomial à 0,01 e 0,05 de significância.

Os dados das densidades de células mucosas e volumes fracionais dos componentes intestinais foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os efeitos dos níveis de DL-metionina sobre cada variável estudadas foram analisados por meio de ajustes de curvas. Modelos de regressão linear e polinomial foram testados. Os níveis de significância aceito foi de 0,01 e 0,05. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa computacional SAS (2008).

#### 4. Resultados

Os resultados de eclodibilidade e mortalidade embrionária encontram-se na tabela 2. Diferenças ( $p < 0,05$ ) foram observadas nos resultados de eclodibilidade ( $y = -0,7445x^2 + 1,86595x + 80,993$   $R^2 = 0,87$ ) com redução a partir da inoculação crescente de DL-metionina, na mortalidade intermediária ( $y = 2,3073x^2 - 3,9499x + 5,8157$   $R^2 = 0,89$ ) e na mortalidade tardia ( $y = 1,0419x^2 + 1,2195x + 16,4514$   $R^2 = 0,82$ ).

**Tabela 2.** Efeitos da inoculação de DL-metionina sobre a eclodibilidade e a mortalidade embrionária.

Tratamentos	Eclodibilidade (%)	Mortalidade Intermediária (%)	Mortalidade Tardia (%)	Mortalidade Pós-Bicagem (%)	Peso do Pinto (g)	Correlação Pinto-Ovo
Controle	93,75	3,13	3,12	0,00	32,78	0,76
Inoc. Controle	71,87	15,63	12,50	0,00	33,68	0,76
0,5% Met.	75,00	9,37	15,63	0,00	34,89	0,76
1,0% Met.	75,00	9,38	9,37	6,25	35,28	0,80
1,5% Met.	28,13	59,37	6,25	6,25	33,46	0,73
2,0% Met.	21,88	71,87	6,25	0,00	33,37	0,73
2,5% Met.	15,62	84,38	0,00	0,00	30,34	0,68
p-valor	0,01	0,01	0,01	0,57	0,01	0,03
Efeito	Q	Q	Q	Ns	Q	Q
CV(%)	15,02	17,89	7,30	16,64	5,67	7,05

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. ns – não significativo.

Embriões oriundos de ovos não inoculados apresentaram melhor eclodibilidade, menor taxa de mortalidade intermediária e tardia. Por outro lado, os pintinhos provenientes de ovos inoculados com 1,0% de DL-metionina apresentaram maior peso ao nascer ( $y = -0,3017x^2 + 0,3783x + 35,52$   $R^2 = 0,83$ ) e melhor correlação pinto-ovo ( $y = -0,0056x^2 + 0,013x + 0,8157$   $R^2 = 0,77$ ).

Nos ovos inoculados com as soluções com aumento gradual de DL-metionina observou-se aumento na mortalidade intermediária (horas após os procedimentos de inoculação). Já a inoculação com 2,5% de DL-metionina apresentou menor taxa de eclodibilidade, maior taxa de mortalidade intermediária, menor peso do pinto ao nascer e correlação pinto-ovo inferior em relação aos demais tratamentos.

Os resultados da análise bioquímica sérica encontram-se na tabela 3. Houve efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) nos valores de triglicerídeos ( $y = 4,6679x^2 - 25,923x + 164,931$   $R^2 = 0,98$ ) onde houve um aumento sanguíneo nos grupos em que as inoculações foram realizadas com teores maiores e a partir de 1,5% de DL-metionina.

**Tabela 3.** Análise bioquímica sanguínea de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.

Tratamentos	Glicose (mg/dl)	Ácido úrico (mg/dl)	Triglicerídeos (mg/dl)	Colesterol (mg/dl)	Proteínas (g/L)	Albumina (g/L)	Uréia (mg/dl)
Controle	80,53	9,30	49,22	139,34	50,5	22,4	49,71
Inoc. Controle	69,35	8,02	49,65	139,02	50,2	25,0	51,72
0,5% Met.	66,36	6,71	38,66	143,94	51,5	23,1	52,51
1,0% Met.	66,28	7,68	44,19	138,52	51,4	20,1	73,96
1,5% Met.	72,61	4,58	58,22	138,92	51,8	17,4	46,41
2,0% Met.	68,05	7,42	89,56	130,97	52,4	16,7	28,56
2,5% Met.	69,86	9,42	122,68	130,58	53,3	16,1	25,44
p-valor	0,11	0,23	0,01	0,03	0,05	0,05	0,01
Efeito	Ns	Ns	Q	Q	LP	LN	Q
CV(%)	11,37	14,39	14,00	7,21	7,02	17,76	16,36

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. LP –Linear Positivo. LN – Linear Negativo. ns – não significativo.

Quanto a mensuração do colesterol ( $y = -0,6317x^2 + 0,6605x + 146,52$   $R^2 = 0,80$ ), o grupo inoculado com a solução contendo 0,5% de DL-metionina apresentou maior nível de colesterol em relação aos grupos controle e o grupo inoculado com a maior quantidade de DL-metionina.

Os valores de concentração de uréia ( $y = -2,5815x^2 + 6,18x + 69,813$   $R^2 = 0,70$ ) no sangue dos pintos recém eclodidos mostraram efeito quadrático ( $p < 0,05$ ), uma vez que o grupo inoculado com 1,0% de DL-metionina apresentou o maior valor de uréia sérica e o grupo inoculado com 2,5% de DL-metionina apresentou o menor valor de uréia sérica.

Os resultados do efeito da inoculação sobre o coração + trato gastrointestinal encontram-se nas tabelas 4 (órgãos) e 5 (regiões). O saco vitelino ( $y = -0,1063x^2 + 0,2244x + 3,6814$   $R^2 = 0,69$ ) apresentou maior peso ( $p < 0,05$ ) em pintos provenientes de ovos inoculados com 1,0% de DL-metionina. O coração ( $y = -0,0029x^2 + 0,0093x + 0,371$   $R^2 = 0,71$ ) dos pintinhos apresentou maior peso ( $p < 0,05$ ) naqueles que foram inoculados com soluções a partir de 1,0% de DL-metionina.

**Tabela 4.** Efeitos da inoculação de DL-metionina sobre o coração + trato intestinal (principais órgãos).

Tratamentos	Saco vitelino (g)	Coração (g)	Fígado (g)	Pâncreas (g)	Pró-ventrículo (g)	Moela (g)
Controle	2,37	0,23	0,98	0,09	0,34	1,97
Inoc. Controle	2,18	0,18	0,81	0,04	0,19	2,03
0,5% Met.	2,67	0,23	0,86	0,04	0,35	2,41
1,0% Met.	3,73	0,28	0,91	0,08	0,31	2,03
1,5% Met.	2,85	0,36	0,84	0,06	0,35	2,12

2,0% Met.	2,21	0,31	0,82	0,07	0,31	2,11
2,5% Met.	2,14	0,30	0,74	0,09	0,37	1,78
p-valor	0,04	0,01	0,24	0,17	0,06	0,02
Efeito	Q	Q	ns	Ns	ns	Q
CV(%)	19,02	13,40	17,12	15,51	11,69	11,94

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. ns – não significativo.

Não foi observado efeito significativo ( $p > 0,05$ ) da inoculação sobre o desenvolvimento do fígado, pâncreas e pró-ventrículo. Todavia, houve um aumento no peso da moela ( $y = -0,0352x^2 + 0,0469x + 2,7414$   $R^2 = 0,76$ ), com melhores resultados ( $p < 0,05$ ) no grupo inoculado com 0,5% de DL-metionina em relação ao grupo controle.

A inoculação de DL-metionina influenciou ( $p < 0,05$ ) no aumento métrico apenas sobre o desenvolvimento de algumas porções intestinais, sendo elas: alça duodenal ( $y = -0,1286x^2 + 0,1486x + 7,9429$   $R^2 = 0,89$ ) e cólon + reto ( $y = -0,0536x^2 + 0,0414x + 5,1143$   $R^2 = 0,95$ ). Não houve efeito significativo ( $p > 0,05$ ) da alimentação *in ovo* sobre o comprimento relativo da orofaringe e esôfago, jejuno e íleo e ceco.

**Tabela 5.** Biometria de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina (regiões do TGI).

Tratamentos	Comprimento do Sistema Digestivo (cm)	Orofaringe + esôfago (cm)	Alça duodenal (cm)	Jejuno + íleo (cm)	Ceco (cm)	Cólon + reto (cm)
Controle	45,40	5,00	6,40	25,90	6,40	4,70
Inoc. Controle	46,00	4,60	7,50	27,20	7,00	5,00
0,5% Met.	43,00	4,50	7,80	23,30	5,60	4,60
1,0% Met.	42,90	5,30	7,10	24,46	5,60	4,50
1,5% Met.	44,90	4,00	7,00	26,80	6,28	3,90
2,0% Met.	41,20	3,90	6,40	25,30	4,98	3,80
2,5% Met.	44,20	5,80	6,00	23,40	5,22	3,10
p-valor	0,48	0,57	0,01	0,11	0,11	0,03
Efeito	ns	ns	Q	ns	ns	Q
CV(%)	8,82	16,19	10,41	7,54	19,73	11,53

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. ns – não significativo.

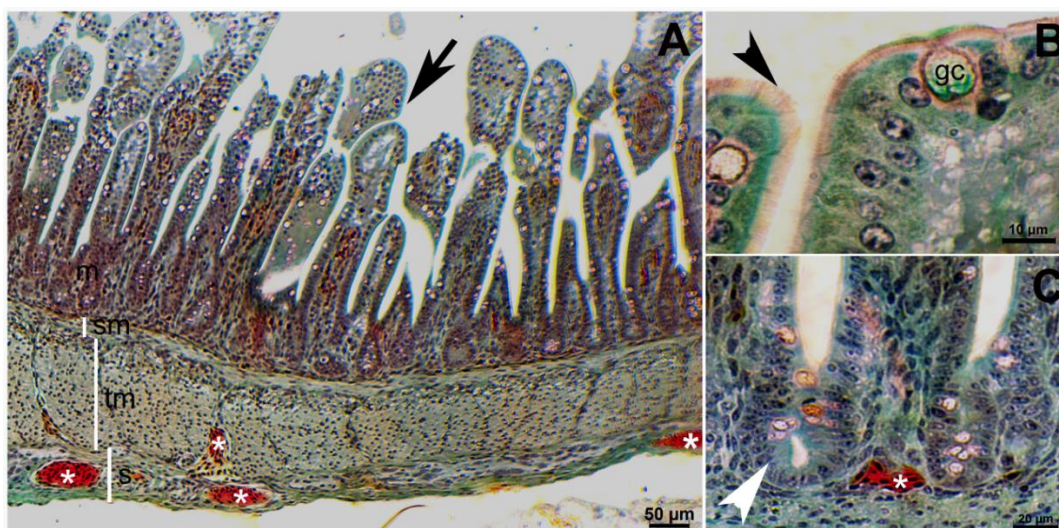
Observou-se que as células caliciformes PAS+ e azul de Alcian+ (carboxiladas e sulfatas) estão presentes tanto nas vilosidades quanto nas criptas de Lieberkühn dos intestinos delgado e grosso (Figuras 8). Os resultados da análise de densidade de células caliciformes em vilosidade e criptas do intestino delgado encontram-se na tabela 6. Não foi observado efeito significativo ( $p > 0,05$ ) da inoculação de DL-metionina sobre o desenvolvimento das células caliciformes PAS+, AB+(carboxiladas) e AB+ (sulfatadas)

das vilosidades do intestino delgado. Nas criptas de Lieberkühn do intestino delgado, houve efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) sobre a densidade das células AB+ do tipo sulfatadas ( $y = 0,8155x^2 - 4,0502x + 20,257$   $R^2 = 0,81$ ), com o maior nível de inoculação (2,5%) de DL-metionina aumentando a presença de células por milímetro.

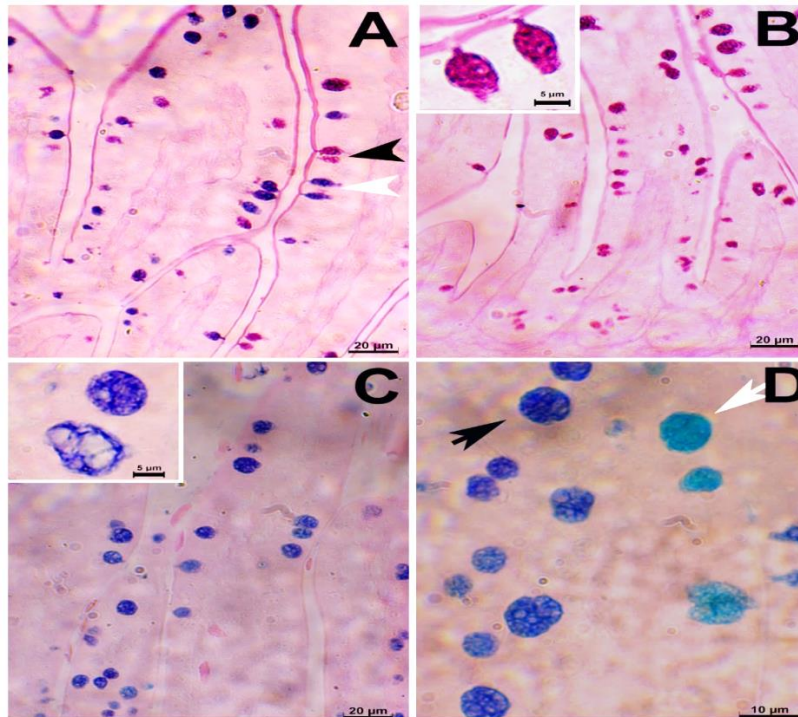
**Tabela 6.** Densidade de células calciformes PAS+, AB+ (carboxiladas) e AB+ (sulfatadas) nas vilosidades e nas criptas de Lieberkühn do intestino delgado de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.

Tratamentos	Vilosidades			Criptas de Lieberkühn		
	PAS+ (mm)	AB+ carboxiladas (mm)	AB+ sulfatadas (mm)	PAS+ (mm)	AB+ carboxiladas (mm)	AB+ sulfatadas (mm)
Controle	30,7±19,5	22,7±12,0	0,6±1,5	32,7±24,7	38,9±10,2	0,5±1,1
Inoc. Controle	42,3±15,4	28,9±9,8	3,3±6,5	55,2±9,0	28,3±6,3	11,0±19,3
0,5% Met.	43,6±18,1	32,8±6,0	0,0	45,3±15,4	47,7±15,1	0,0
1,0% Met.	26,8±7,8	29,7±4,7	2,4±4,3	45,5±20,0	30,8±10,9	0,0
1,5% Met.	28,0±10,9	27,7±8,8	0,5±1,0	54,3±14,4	40,9±13,3	0,0
2,0% Met.	26,9±15,8	31,0±13,0	4,9±3,8	32,4±23,7	30,6±19,0	5,3±6,8
2,5% Met.	35,1±14,0	19,6±3,3	1,1±1,6	26,0±15,5	30,7±4,6	13,2±5,4
p-valor	0,143	0,169	0,853	0,138	0,545	0,012
Efeito	ns	ns	ns	ns	ns	Q

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q – Quadrático. ns – não significativo.



**Figura 8.** Secções longitudinais representativas do duodeno de pintos recém-eclodidos. A) as vilosidades (seta escura) são revestidas por epitélio colunar simples e sustentadas por uma lâmina própria. Legendas: célula calciforme (gc), vasos sanguíneos (\*), túnica mucosa (m), túnica submucosa (sm), túnica muscular (tm) e túnica serosa (s). Coloração tricrômico de Mallory. Fonte: Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.



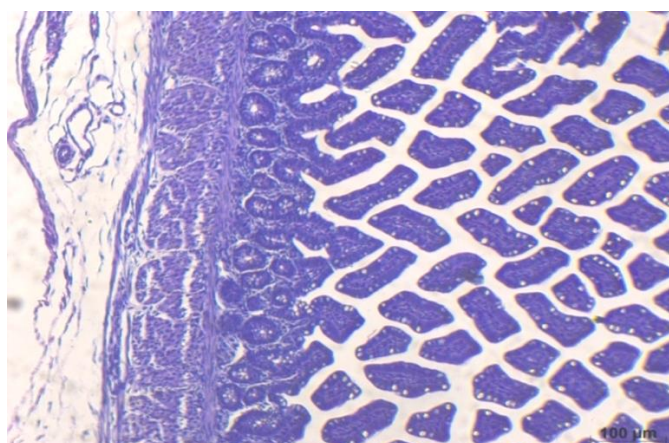
**Figura 9.** Fotomicrografias representativas das células caliciformes intestinais identificadas por meio de técnicas histoquímicas. A) Secções longitudinais das vilosidades duodenais demonstrando a presença de células caliciformes PAS+, AB+ e PAS+/AB+. B) Células caliciformes PAS+ podem ser encontradas tanto nas vilosidades (detalhe da região apical) quanto nas criptas de Lieberkühn. C) Numerosas células caliciformes AB+ (detalhe das vesículas intracelulares) podem encontradas ao longo das vilosidades e nas criptas de Lieberkühn. D) Células caliciformes AB+ contendo mucopolissacarídeos do tipo carboxilados (seta escura) e sulfatados (seta clara). As escalas estão indicadas nas imagens. Fonte: Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.

Os resultados da análise de células caliciformes nas vilosidade e criptas do intestino grosso encontram-se na tabela 7. Não houve efeito quadrático ( $p > 0,05$ ) da inoculação de DL-metionina sobre a densidade das células caliciformes PAS+ e AB+ (carboxiladas) das vilosidades do intestino grosso. A inoculação afetou significativamente ( $p < 0,05$ ) somente as células caliciformes AB+ (sulfatadas) ( $y = 183x + 297,06$   $R^2 = 0,75$ ). Não houve efeito significativo ( $p > 0,05$ ) sobre as células caliciformes das criptas de Lieberkühn do intestino grosso (Figura 10).

**Tabela 7.** Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) de células caliciformes PAS+, AB+ (carboxiladas) e AB+ (sulfatadas) nas vilosidades e nas criptas de Lieberkühn do intestino grosso de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.

Tratamentos	Vilosidades			Criptas de Lieberkühn		
	PAS+ (mm)	AB+ carboxiladas (mm)	AB+ sulfatadas (mm)	PAS+ (mm)	AB+ carboxiladas (mm)	AB+ sulfatadas (mm)
Controle	27,7 $\pm$ 7,7	30,8 $\pm$ 12,4	42,9 $\pm$ 8,6	40,8 $\pm$ 14,9	29,3 $\pm$ 24,5	6,2 $\pm$ 8,2
Inoc. Controle	28,3 $\pm$ 8,0	31,9 $\pm$ 2,8	273,8 $\pm$ 56,2	58,8 $\pm$ 10,5	49,7 $\pm$ 16,2	0,0
0,5% Met.	50,5 $\pm$ 6,2	28,0 $\pm$ 12,8	84,9 $\pm$ 7,9	42,1 $\pm$ 42,1	41,8 $\pm$ 45,2	0,0
1,0% Met.	50,5 $\pm$ 12,9	48,3 $\pm$ 11,8	45,5 $\pm$ 6,4	47,4 $\pm$ 31,0	39,7 $\pm$ 9,4	3,5 $\pm$ 5,1
1,5% Met.	35,7 $\pm$ 9,4	22,4 $\pm$ 7,2	515,4 $\pm$ 35,0	41,9 $\pm$ 10,4	34,8 $\pm$ 12,2	27,7 $\pm$ 7,4
2,0% Met.	40,2 $\pm$ 16,5	28,6 $\pm$ 7,4	876,7 $\pm$ 203,3	49,3 $\pm$ 23,5	26,9 $\pm$ 6,1	12,4 $\pm$ 11,9
2,5% Met.	38,7 $\pm$ 11,4	42,8 $\pm$ 13,4	1205,5 $\pm$ 60,19	41,4 $\pm$ 5,3	40,6 $\pm$ 6,8	0,0
p-valor	0,462	0,784	0,014	0,338	0,130	0,347
Efeito	ns	ns	Q	ns	ns	ns

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. ns – não significativo.



**Figura 10.** Porção do intestino grosso de pinto recém eclodido, inoculado com 1,0% de metionina. Coloração hematoxilina. Fonte: Arquivo pessoal de Thaysa Marinho Farias.

As quatro tûnicas (ou camadas) intestinais tanto no intestino delgado quanto no grosso (Figuras 9 e 10) foram analisadas quantitativamente. Os resultados da análise de densidade fracional das estruturas (tûnicas) do intestino delgado encontram-se na tabela 8. Observou-se efeito quadrático ( $p < 0,05$ ) no desenvolvimento das tûnicas mucosa ( $y = -1,1167x^2 + 2,8048x + 74,471$   $R^2 = 0,82$ ), submucosa ( $y = 0,5988x^2 - 1,4512x + 3,9857$   $R^2 = 0,92$ ) e muscular interna ( $y = -0,444x^2 + 0,1702x + 9,9857$   $R^2 = 0,85$ ) do intestino delgado de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina. Verificou-se que a

inoculação de níveis crescentes de DL-metionina diminuiu o percentual das túnicas mucosa e muscular interna, com aumento da túnica submucosa.

**Tabela 8.** Densidade (volume fracional ou volume de Delesse, %) das túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa do intestino delgado de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.

Tratamentos	Mucosa (%)	Submucosa (%)	Muscular		Serosa (%)
			Interna (%)	Externa (%)	
Controle	72,6±7,4	6,5±3,2	6,8±3,0	7,3±2,8	6,8±4,5
Inoc. Controle	72,8±6,2	4,3±0,6	10,0±7,0	4,0±2,1	8,9±3,1
0,5%Met.	72,2±8,9	5,4±3,1	8,7±1,5	6,6±3,9	7,1±3,7
1,0%Met.	75,5±4,1	3,8±1,8	8,1±6,5	7,2±2,1	8,2±1,8
1,5%Met.	73,9±8,8	4,6±1,7	9,1±3,9	8,1±3,2	8,6±3,6
2,0%Met.	70,2±5,5	8,7±3,0	4,7±4,1	8,5±3,7	8,1±4,9
2,5%Met.	56,7±2,65	12,6±7,7	2,9±2,1	29,6±17,3	6,4±4,6
p-valor	0,03	0,02	0,04	0,09	0,29
Efeito	Q	Q	Q	ns	ns

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. ns – não significativo.

Os resultados da análise de densidade estrutural das túnicas do intestino grosso encontram-se na tabela 9. Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no volume das túnicas mucosa ( $y = 1,4667x^2 - 7,319x + 85,386$   $R^2 = 0,74$ ) e muscular externa ( $y = -1,0167x^2 + 2,0405x + 16,6143$   $R^2 = 0,90$ ) do intestino grosso, com maior desenvolvimento observado em pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.

**Tabela 9.** Densidade (volume fracional ou volume de Delesse, %) das túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa do intestino grosso de pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina.

Tratamentos	Mucosa (%)	Submucosa (%)	Muscular		Serosa (%)
			Interna (%)	Externa (%)	
Controle	56,4±6,4	6,0±3,2	11,4±0,2	9,3±4,7	17,0±5,1
Inoc. Controle	64,3±4,5	8,4±0,1	12,1±0,5	12,5±0,5	3,6±3,1
0,5%Met.	53,1±9,6	8,2±4,5	15,3±5,6	14,9±3,5	9,5±2,5
1,0%Met.	52,9±10,7	4,4±1,3	9,7±0,3	17,2±0,1	18,2±8,5
1,5%Met.	55,8±10,1	4,7±0,4	11,4±8,8	14,8±5,4	6,9±6,1
2,0%Met.	63,3±12,8	4,9±0,5	12,8±5,1	7,6±3,1	10,7±11,7
2,5%Met.	75,9±5,8	6,4±0,8	10,4±4,2	5,2±3,0	5,2±5,0
p-valor	0,02	0,09	0,65	0,04	0,17
Efeito	Q	ns	ns	Q	ns

CV – Coeficiente de variação. p-valor – Coeficiente de probabilidade. Q - Quadrático. ns – não significativo.



## 5. Discussão

Por conceito, a alimentação *in ovo* tem como objetivo primordial aumentar a disponibilidade de nutrientes para o embrião e, conseqüentemente, o desempenho zootécnico do animal, além de possibilitar maior desenvolvimento corporal, principalmente do trato gastrointestinal (PEDROSO et al., 2006; FOYE et al., 2006; DAMASCENO et al., 2017).

Neste contexto, várias questões ainda precisam ser elucidadas para aprimorar esta técnica, reduzindo ao máximo as perdas, como a diminuição da eclodibilidade após determinado nível de inoculação, como foi observado neste estudo e também pelo autores Leitão et al. (2010) e Pedroso et al. (2006), que ao inocularem soluções com diferentes concentrações de carboidratos, associaram este fato ao processo manual de inoculação utilizado, o que pode aumentar as chances de erro do local e contaminação, além da diferença osmótica *intra ovo* que pode ser ocasionada após o aumento substancial dos nutrientes nas soluções a serem inoculadas, levando a uma exacerbada mortalidade intermediária.

Esta mortalidade logo após a inoculação de DL-metionina (mortalidade intermediária) foi observada neste trabalho e também pelos autores Ohta e Kidd (2001), e Jochemsen e Jeurissen (2002), sendo atribuída justamente ao aumento gradual da concentração de nutrientes nas soluções, o que causa desbalanceamento considerável do equilíbrio osmótico na fisiologia do embrião, causando um efeito de “dose letal”.

Quanto ao peso do pintainho ao nascer, que neste estudo obteve resultado abaixo da média apenas no maior nível de DL-metionina inoculada, North e Bell (1990) comentam que existe uma relação direta entre o peso do ovo e o peso do pinto ao nascer, e por conseguinte com o peso do frango ao abate, sendo que o peso do pinto representa cerca de 70% do peso do ovo. E cada grama a mais no peso do pinto representa 13 gramas no peso do frango ao abate. Neste caso, pintos oriundos de ovos inoculados com DL-metionina apresentaram até 2,5g em relação ao controle experimental, o que pode representar um aumento significativo de peso final da ave.

Os mesmos autores comentam ainda que este resultado pode estar relacionado a maior oferta de nutrientes, neste caso do aminoácido DL-metionina, que tem como uma das suas principais funções auxiliar na síntese protéica e ser precursor de outros aminoácidos que compõe as proteínas estruturais, inclusive a proteína muscular.

Durante as fases de crescimento e maturação do desenvolvimento embrionário as membranas embrionárias ou fetais das aves representam adaptações especiais ao

ambiente pelas funções que desempenham, com o embrião das aves tendo quatro diferentes membranas: o saco vitelino (ou membrana vitelina), o alantóide, o âmnio e o córion (DECUYPERE et al., 2003). No momento da eclosão, não são encontrados vestígios das três últimas membranas. O âmnio e córion são completamente eliminados e o alantóide é eliminado na sua grande parte, enquanto que o saco vitelino é incorporado no intestino delgado, com uma reserva nutricional que será utilizada no período pós eclosão. Diante disso o efeito do peso do saco vitelino apresentado no tratamento com 1% de inoculação de DL-metionina, sugere que o pintinho terá um maior e melhor aporte nutricional após a eclosão.

Os resultados obtidos neste experimento indicam ainda que a DL- metionina na alimentação *in ovo* atua diretamente sob o metabolismo sérico, especialmente devido ao desenvolvimento significativo do coração e as alterações nos parâmetros bioquímicos plasmático. Os níveis de glicose obtidos em pintos inoculados não apresentaram resultados plasmáticos significativos em relação a grupo controle, inclusive os níveis apresentaram-se baixos. De acordo com Swenson e O'Reece, (1996) os níveis normais de glicose sérica em uma galinha adulta é de 130 a 270 mg/dL, e o autor David (2008) afirma ainda que para frango de corte jovens (até duas semanas), as concentrações da glicose sanguíneas obtidas em seu trabalho foram menores do que 150 mg/dL, com níveis até 30 mg/dL em algumas aves, caracterizando hipoglicemia.

Este dado mostra a importância da alimentação ainda na fase embrionária e logo após o nascimento, objetivando ajustar a bioquímica sérica do pintainho rapidamente, evitando que durante o jejum, ocorra maior gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol no fígado, ocorrendo o declínio da glicemia e afetando o desenvolvimento da ave nos primeiros dias de vida (GANONG, 1995; CAMPBELL, 2004).

Quanto ao ácido úrico, este caracteriza-se como um produto catabólico de proteínas, de nitrogênio protéico e das purinas em aves. Os valores normais encontrados para aves foram na faixa de 2-15mg/dL (BENEZ, 2004). Em frangos de corte, Ross et al. (1978) obtiveram média de 7,7 mg/dL e em galinhas Brown Leghorn, uma variação de 0,27 a 4,93mg/dL, sendo que este valor sofre alterações apresentando aumento à medida que a ave fica mais velha.

Neste trabalho não foi observada diferença significativa na concentração de ácido úrico, sugerindo que a inoculação não afetou a função renal do animal inoculado, mesmo que tenha havido diferenças significativas nos resultados de uréia sanguínea. Vale ressaltar que este tipo de análise é considerada específica para detectar distúrbios

na função renal das aves, sendo importantíssima para este estudo, tendo em vista que a inoculação de um aminoácido poderia ocasionar um aumento substancial nos níveis do ácido úrico sérico, forçando os rins trabalhem com apenas 30% de sua capacidade (LUMEIJ, 1997; SCHMIDT et al., 2007).

Quanto aos lipídios, os níveis de triglicerídeos e colesterol obtidos neste estudo encontram-se de acordo com os níveis verificados na literatura, estando relacionado ao desenvolvimento embrionário acelerado verificado nas aves, onde a síntese de novas membranas requer uma produção acentuada de fosfolipídeos de membrana. Os carboidratos, as gorduras ou as proteínas ingeridas em excesso são armazenados na forma de triglicerídeos que podem ser mobilizados para o fornecimento de energia, capacitando o organismo a suportar períodos de jejum fato importantíssimo para a logística que os pintos de 1 dia sofrem na indústria avícola (CAMPEBELL, 2004). De acordo com Zelenka (2000), pintos jovens têm menor capacidade de reabsorver sais biliares devido à imaturidade da circulação entero-hepática e uma reduzida atividade a enzima lípase.

Já nos níveis de proteínas total, de acordo com Burke (1996) e Swenson e O'Reece, (1996), o teor médio de proteínas totais no soro das galinhas em postura é de 50 g/L enquanto que o de frangos e galinhas fora da postura é um pouco menor (36 g/L). Nesse contexto, levando em consideração que a aplicação do nutriente foi realizada no âmnio e que esse anexo embrionário tem como função evitar a desidratação do embrião, isolar as oscilações de temperatura, proteger contra choques traumáticos, além de evitar a aderência do embrião na casca (ROMANOFF, 1960), a inoculação do aminoácido pode ter causado uma leve desidratação no pintainho, onde a hemoconcentração secundária à desidratação e à redução do líquido circulante produz um aumento na concentração sérica de proteínas totais. Os níveis de albumina apresentaram-se dentro da normalidade, considerando os níveis normais para aves (16-20 mg/L) (SWENSON & O'REECE, 1996).

Quanto os resultados obtidos na biometria dos órgãos, o aumento do tamanho da alça duodenal e do colón + reto pode ter sido estimulado pelo próprio incremento nutricional derivado da inoculação, fazendo com que o pintainho submetido a alimentação *in ovo* apresente uma maior capacidade de digerir e absorver nutrientes de uma fonte exógena em relação a pintos oriundos de ovos não inoculados (TAKO et al., 2004; CAMPOS et al., 2010; DAMASCENO et al., 2017). E os aminoácidos destinados a esta finalidade podem apresentar efeitos positivos, mostrando uma relação entre a

síntese protéica, a concentração de aminoácidos e a produção de hormônios do crescimento (JEPSON et al., 1988; WELBORNE, 1995; MAIORKA et al., 2000; RAY et al., 2003; SILVA et al., 2007). No entanto somente este dado métrico não informa claramente quais estruturas foram afetadas pela inoculação, para investigação mais minuciosa foram utilizadas técnicas histológicas.

A estrutura e organização morfofuncional do TGI dos frangos, ultimamente tem sido pouco focada pelos pesquisadores. Edentre outros motivos, este fato pode está relacionado ao precoce abate destes animais. No entanto, considerando o acelerado crescimento do frango e as necessidades de digerir e absorver nutrientes, bem como a manutenção de estado sanitário para estes fins, melhor atenção deve ser dada a este sistema funcional da ave responsável por grande parte da sanidade dos plantéis (BJERRUM et al., 2005).

A sobrevivência e o bom desempenho das aves dependem da obtenção adequada de energia e de compostos químicos pelo organismo. Para que isso ocorra é necessário que o trato digestivo apresente características estruturais funcionais desde a ingestão dos alimentos até à sua absorção (ROMER & PARSONS 1981).

Desta forma, considerando os resultados obtidos neste trabalho, o aumento das células caliciformes do tipo AB+ sulfatadas nas vilosidades e criptas de Lieberkühn do intestino delgado e nas vilosidades do intestino grosso, considerando ainda o aumento no número de células nos animais inoculados tanto no intestino delgado como no intestino grosso, porém sem diferença significativa em relação ao grupo controle, ou seja, um acréscimo de células que produzem um tipo de mucina ácida, sugere-se que a inoculação de metionina pode melhorar a capacidade digestiva, absorviva e de proteção da mucosa intestinal do pintinho, uma vez que esse tipo de célula é utilizada para avaliar diversos tipos de dietas e a influência desta sobre a morfometria do TGI, pois a quantidade e a qualidade das células caliciformes podem ser alteradas em razão de dietas influenciando até mesmo no processo de translocação bacteriana (FRANKEL et al., 1995).

A partir da análise histológica foi possível ainda observar que as estruturas denominadas mucosa, submucosa e muscular interna do intestino delgado e também mucosa e muscular externa do intestino grosso, foram afetadas pela alimentação *in ovo*, da mesma forma como foi observado por Tako et al. (2004), que no trabalho utilizando zinco-metionina para inoculação no líquido amniótico de embriões, teve como resultado

o aumento e melhora das características do desenvolvimento intestinal, tais como atividade enzimática e expressão de síntese protéica.

As túnicas (mucosa, submucosa, muscular e serosa) são estruturas que revestem todo o tubo digestório, possuem funções específicas relacionadas à passagem dos alimentos, especialmente na mucosa e submucosa onde são encontradas glândulas e células enteroendócrinas secretoras de enzimas digestivas e onde encontra-se as estruturas que entram em contato direto com o alimento, vilosidades e criptas. Durante o período embrionário sais biliares e fosfolípidos procedentes do saco de vitelo modulam a flora intestinal e influem sobre a integridade da mucosa (MAIORKA et al., 2003).

Logo o desempenho da função do intestino sua capacidade digestiva e absorptiva está relacionada com a densidade das vilosidades e desenvolvimento do epitélio da mucosa, assim como a densidade dos microvilos enterocíticos e densidade de células caliciformes e a produção e secreção de mucinas (CAMPOS et al., 2010).

Deste modo, correlacionando os achados histológicos observados, sendo eles o maior desenvolvimento das túnicas (mucosa e submucosa) de ambos os intestinos e maior presença de células nessas estruturas (vilosidades e criptas), é provável que a inoculação do aminoácido estimule de forma física e química o arranjo estrutural do TGI com maior desenvolvimento dos vilos, além de promover a proteção do epitélio intestinal contra ação das enzimas digestivas, suco gástrico e atritos pela passagem da digesta, também oferece maior proteção contra agente patogênicos, função exercida pela produção de mucinas ácidas das células caliciformes, funcionando como uma barreira contra ação de patógenos (FORSTNER & FORTNER, 1994) e evitando ainda a perda de água através parede intestinal, fato extremamente importante pra essa fase inicial da vida do animal.

## 6. Conclusões

Concluiu-se que até 1,0% de DL-metionina pode ser suplementada *in ovo* de embriões avícolas com influência positiva no peso do pinto, atuando no metabolismo bioquímico sérico, proporcionando melhor desenvolvimento do trato gastrointestinal, estimulando seu arranjo estrutural de forma física e química através do aumento de células caliciformes produtoras de enzimas ácidas nas vilosidades e criptas do intestino delgado e células caliciformes produtoras de enzimas neutras no intestino grosso, assim como melhorando o desenvolvimento da mucosa intestinal.

## 7. Referências bibliográficas

1. BANCROFT, J.D; GAMBLE, M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 4<sup>th</sup> ed. London: Els. Hea. Sci. London - Churchill Livingstone, 2008.
2. BARBOSA, V.M. Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário. Belo Horizonte: **FEPMVZ**, p. 124, 2011.
3. BENEZ, S.M. Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados. 4<sup>a</sup> ed: **Tecmedd**, p.332, 2004.
4. BJERRUM, L., PERDERSEN, A.B., ENGBERG, R.M. The influence of whole wheat feeding on Salmonella infection and gut flora composition in broilers. **Avian Diseases**, 49(1): 9-15, 2005.
5. BOERJAN, M. Early Embryogenesis of the chick., **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 23, n. 10, p. 2666-2944, 2006.
6. BURKE, W.H. Effects of an *in ovo* injection of an anti-androgen on embryonic and post-hatching growth of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 75, p. 648–655, 1996
7. BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: CBNA, 430p, 2002.
8. CAMPBELL, T.W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M.A. et al. **Veterinary hematological and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 479-492, 2004.
9. CAMPOS, E. J. Nutrição da matriz e do embrião. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA. cap. 4, p. 454-470, 2010.

10. CIROTTA, C.; ARANGI, I. How do avian embryos breath? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94, p.607-613, 1989.
11. CHRISTENSEN, V.L. Factors affecting hatchability of turkey embryos. **Poultry and Avian Biology**. v. 6, p.71-82, 1995.
12. DAENNER, E.; BESSEI, W. Effectiveness of liquid DL-methionine hydroxy analogue-free acid (DL-MHA-AL) compared to DL-methionine on performance of laying hens. **Archive Fuer Geflügelkunde**, v. 66, p.97-101, 2002.
13. DAHIYA, J.P.; HOEHLER, D.; VAN KESSEL, A.G.; DREW, M.D. Dietary encapsulated glycine influences *Clostridium perfringens* and *lactobacilli* growth in gastrointestinal tract of broiler chickens. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1408–1414, 2007.
14. DAMASCENO, J.L.; CRUZ, F.G.G.; MELO, R.D.; FEIJO, J.C.; RUFINO, J.P.F.; VALENTIM, F.M.; OLIVEIRA, J.P.C. Inoculação de proteína isolada de soja em ovos embrionados oriundos de matrizes semipesadas com diferentes idades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1259-1266, 2017.
15. DAVID, J. Hypoglycemia – Spiking mortality syndrome of broiler chickens. In: SAIF, Y.; BARNES, H.; GLISSON, J.; FADLY, A.; McDOUGALD, L.; SWAYNE, D. **12<sup>th</sup> Edition of Diseases of Poultry**. Iowa: American Association of Avian Pathologist, p.1269-1272, 2008.
16. DECUYPERE, E.; DEWIL, E.; KÜHN, E.R. The hatching process and the role of hormones. In: TULLETT, S.C. (ed.). **Avian Incubation**. London: Butterworth & Co., p. 239-256, 1991.
17. DEEMING, D.C. Avian incubation: behaviour, environment, and evolution. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 4, p. 425-43, 2002.



18. DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. The Digestive System: Challenges and Opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**. v.13, p.86-93, 2004.
19. DIBNER, J.J.; KNIGHT, C.; YI, G.F.; RICHARDS, J.D. Gut Development and Health in the Absence of Antibiotic Growth Promoters. **Journal of Animal Science**, v. 20, n. 6, p. 1007-1014, 2007
20. ELLIOTT, K.E.C; BRANTON, J.D.; EVANS, P.D; GERARD, M.; PEEBLES, D. Layer chicken embryo survival to hatch when administered an *in ovo* vaccination of strain F *Mycoplasma gallisepticum* and locations of bacteria prevalence in the newly hatched chick. **Poultry Science**, v. 96, p. 3879–3884. 2017.
21. FERKET, P.R; UNI, Z. Pre and posthatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320-327, 2003.
22. FORSTNER, J.F.; FORSTNER, G.G. Gastrointestinal mucus. In: JOHNSON, L. (ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Raven Press, p. 1256-1283, 1994.
23. FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P. Effect of *in ovo* feeding egg white protein,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, p. 1185-1192, 2006.
24. FRANKEL, W.; ZHANG, W.; SINGH, A.; BAIN, A.; SATCHITHANANDAM, S.; KLURFELD, D.; ROMBEAU, J. Fiber: effect on bacterial translocation an intestinal mucin content. **World Journal of Surgery**, v. 19, n. 1, p. 144-148, 1995.
25. FREEMAN, B.M., VINCE, R.L. **Development of the avian embryo. A behavioural and physiological study**. London: Chapman and Hall, 362p, 1974.

26. FRENCH, N. Heat and Water balance during incubation. **Poultry Science**, v.94, p. 607-613, 2006.
27. GANONG, W.F. Balanço energético, metabolismo e nutrição. In: GANONG, W.F. **Fisiologia médica**. 17<sup>a</sup> ed. São Paulo: Prentice Hall do Brasil, p.199-225. 1995.
28. GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v.80, p.776–782, 2001.
29. GONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L.; FARINA, G.; KREUZ, B.S.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F. Nutrição *in ovo*: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, p. 45-55, 2013
30. GONZALES, E.C.P; CRUZ, N.S.M; LEANDRO, J.H. *In ovo* supplementation of 25(OH)D<sub>3</sub> to broiler embryos. **Poultry Science**, v.15, p.199-202, 2013.
31. GRIMBLE, R.F. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. **Journal of Nutrition**, v.136, p.1660-1665, 2006.
32. GROFF, P.M.; TAKAHASHI, S.E.; PADILHA, J.B.; BOCHIO, V.; SCHADECK, M.M.; MAIER, G.S.; GORGES, M.H.; SANTOS, I.L.; MAEDA, E.M. Importância da temperatura e umidade e os efeitos da luminosidade durante a incubação de ovos férteis de galinhas. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, p. 1-10, 2017.
33. HOIBY, M.; AULIE, A.; BJONNES, P. O. Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 1, p. 91-94, 1987.
34. HYBRO, B.V. From Egg to Chicken. **Poultry Science**, v. 84, n.5, p.764-770, 2007.

35. JEPSON, M.M.; BATES, P.C.; BROADBENT, P.; PELL, J.M.; MILLWARD, D.J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 255, n. 2, p. 166-172, 1988.
36. JOCHEMSEN, P; JEURISSEN, S.H.M. The location and uptake of *in ovo* injected soluble and particulate substances in the chicken. **Poultry Science**, v. 81, p. 1811-1817, 2002.
37. KUCHARSKA-GACA, J.; KOWALSKA, E.; EBOWSKA, M.D. *In ovo* feeding-technology of the future-a review. **Animal Science**, v. 17, p. 979-992, 2017.
38. LA SCALA, N. Aspectos físicos da incubação e manejo da incubação. **Ciência e Tecnologia Avícolas**, v. 34, p.97-124. 2003.
39. LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ªEdição. São Paulo: Sarvier Editora Ltda., 2002.
40. LEITÃO, R.A; LEANDRO, N.S.M; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; ANDRADE, M.A. Effect of maltose, sucrose and glucose supplementation in embryonated low-weight eggs. **Acta Scientiarum. Animal Science**, v. 32, n. 1, p. 93-100, 2010.
41. LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; MATOS, M.S.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2014.
42. LEKSRIOMPONG, N.; ROMERO-SANCHEZ, H.; PLUMSTEAD, P.W.; BRANNAN, K.E.; BRAKE, J. Broiler incubation. Effect of temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. **Poultry Science**, v. 86, p. 2685-2691, 2007.

43. LOURENS, A. Embryo Development and Chick Temperature. **Avian Poultry Biology**, v.5, p.226–227, 2004.
44. LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5<sup>th</sup>ed. San Diego: Academic Press, p. 234, 1997.
45. MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA. p. 11, 2010.
46. MAIORKA, A.; SILVA, A.V.F.; SANTIN, E.; BORGES, S.A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Influência da suplementação de glutamina sobre o desempenho e o desenvolvimento de vilos e criptas do intestino delgado de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 487-490, 2000.
47. MAIORKA, A.; BOLELI, I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (ed.). **Fisiologia Aviária: Aplicada a frangos de corte**. 2<sup>a</sup> ed. Jaboticabal: FUNEP. p. 113-123. 2002
48. MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DAHLKE, F.; BOLELI, I. C.; FURLAN, R. L.; MACARI, M. Post hatching water and feed deprivation affect the gastrointestinal tract and intestinal mucosa development of broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v.12, n. 4, p.483-492, 2003.
49. MEIJERHOF, R. Physical parameters in incubation. **AveWorld**, v.18, n.3, p.66-71, 2007.
50. MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia básica**. Rio de Janeiro: Elsvier do Brasil, .365p, 2008.
51. MORAN Jr., E.T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1043-1049, 2007.

52. MORITA, V.S.; BOLELI, I.C.; CARGNELUTTI FILHO, A. Hematological values and body, heart and liver weights of male and female broiler embryos of young and old breeder eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.11, n.1, p.7-15, 2009.
53. NARUSHIN, V. G. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. **Poultry Science**, v. 84, p.482-484, 2005.
54. NITSAN, Z; NOBLE, R. C.; OGUNYEMI, D. Growth and development of digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, v. 32, n. 3, p. 515-523 1991.
55. NORTH, M.O.; BELL,D.D. **Commercial chicken production**. 4.ed. New York: Chapman & Hall, 1990.
56. NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilisation in the newly hatched poult. **British Poultry Science**, v. 39, p. 446-451, 1998.
57. OHTA, Y.; KIDD, M.T. Optimum site for *in ovo* amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p. 1425–142, 2001.
58. OLIVEIRA, A.R. Nutrição de não ruminantes. In: OLIVEIRA NETO, A.R. Metabolismo e exigência de metionina. Jaboticabal: **Funep**, p.218-239, 2014.
59. OZAYDIN, T.; CELIK, I. Histological, histochemical and immunohistochemical investigations on the developing small intestines of broilers embryos. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 16, p. 2936-2944, 2012.
60. PEDROSO, A.A.; BARBOSA, V.T.; CAFÉ, M.B.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; MENTEN, J.F.M. **Mortalidade de embriões de matrizes pesadas submetidos à injeção *in ovo* de glicose**. In: Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, São Paulo, Brasil, p. 44, 2006.

61. PEEBLES, E.D. *In ovo* applications in poultry: A review. **Poultry Science**, v. 0, p. 1–17, 2018.
62. PILLAI, P.B.; FANATICO, A.C.; BEERS, K.W.; BLAIR, M.E.; EMMERT, J.L. Homocysteine remethylation in young broilers fed varying levels of methionine, choline and betaine. **Poultry Science**, v. 85, p.90-95, 2006.
63. RAY, E.C.; AVISSAR, N.E.; VUKCEVIC, D.; TOIA, L.; RYAN, C.K.; BERLANGA-ACOSTA, J.; SAX, H.C. Growth hormone and epidermal growth factor together enhance amino acid transport systems B and A in Remnant small intestine after massive enterectomy. **Journal of Surgical Research**, v. 115, n. 1, p. 164-170, 2003.
64. ROMANOFF, A.L. **The Avian Embryo**. New York: The Macmillan Co., 1960.
65. ROMER A.S.; PARSONS T.S. **Anatomia Comparada**. México: Interamericana, 1981.
66. ROSA, P.S.; GUIDONE, L.A; LIMA, I.L.; BERSCH, F.X.R. Influência da temperatura de incubação em ovos de matrizes de corte em diferentes idades e classificados por peso sobre os resultados de incubação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n. 2, p.1011-1016, 2002.
67. ROSS, J.G.; CHRISTIE, G.; HALLIDAY, W.G.; JONES, R.M. Hematological and blood chemistry comparison values for clinical pathology in poultry. **The Veterinary Record**, v. 102, n. 2, p. 29-31, 1978.
68. SCHMIDT, E.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n.3, p.9-20, 2007.
69. SILVA, A.V.F.; BORGES, S.A.; MAIORKA, A.; GIVIZIEZ, P.E.N.; ROCHA, C.; MACARI, M. Ornithine Decarboxylase expression in the small intestine of

- broilers submitted to feed restriction and glutamine supplementation. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 111-116, 2007.
70. SKLAN, D. Development of the digestive tract of poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, n. 4, p. 415-428, 2001.
71. SPEAKE, B.K.; NOBLE, R.C.; MURRAY, A.M.B. The utilization of yolk lipids by the chick embryo. **World's Poultry Science Journal**, v.54, n. 4, p.319-334, 1998.
72. STADTMAN, E.R.; MOSKOVITZ, J.; BERLETT, B.S.; LEVINE, R.L. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234, p. 3-9, 2002.
73. STONE, H; MITCHELL, B.; BRUGH, M. *In ovo* vaccination of chicken embryos with experimental Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. **Avian Diseases**, v. 41, p.856–863. 1997.
74. STUBBS, A.K; WHEELHOUSE N.M; LOMAX M.A; HAZLERIGG D.G. Nutrient hormone interaction in ovine liver: methionine supply selectively modulates growth hormone induced IGF-1 gene expression. **Journal of Endocrinology**, v.174, n. 2, p.335-341, 2002.
75. SWENSON, M; O'REECE, W. **Fisiologia dos animais domésticos**. Cornell: University Press, 1996.
76. TAKO, P.; FERKET, P.; UNI, Z. Effects of *in ovo* feeding of carbohydrates and  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 2023-2028, 2004.
77. TESSERAUD, S.; COUSTARD, S.M.; COLLIN, A.; SEILIEZ, I. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 8, p. 1132-1139, 2009.

78. TULLETT, S.G. Science and the art of incubation. **Poultry Science**, v. 69, n. 1, p. 1-15, 1990.
79. UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 11, p. 101-111, 2004.
80. UNI Z, GANOT S, SKLAN D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**. Rev.77:75-82, 2005.
81. UNI, Z; TAKO. E; GAL-GARBER, O; SKLAN, D. Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science** Rev. 82, p.1747-1754, 2003.
82. WATERLAND R.A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **Journal of Nutrition**, v. 136, p.1706 -1710, 2006.
83. WELBORNE, T.C. Increased plasma bicarbonate and growth hormone after an oral glutamine load. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 1058-1061, 1995.
84. WILLIAMS, C.J.; ZEDEK, A.S. Comparative field evaluations of *in ovo* applied technology. **Poultry Science**, v. 89, n. 1, p. 189-93, 2010.
85. WILLIER, B.H. Phases in embryonic development. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v.43, p. 307-317, 1954.
86. WU, G. Interrelation ship among methionine, choline and betaine in channel catfish – *Ictalurusunctatus*, **Master of Science**, v. 15, p. 45, 2003.
87. VIEIRA, B.S.; FARIA FILHO, D.E.; TORRES, K.A.A; BORGES, D.M. *In ovo* administration of glutamine and lysine on the development of intestinal mucosa of broiler chickens on the first week after hatching. **ARS Veterinaria**, v.22, p. 242-247, 2006.



88. ZELENKA, J.; FAJMONOVÁ, E.; BLAŽKOV, E. Apparent digestibility of fat and nitrogen retention in young chicks. **Czech Journal of Animal Science**, v. 45, n. 10, p. 457-462, 2000.
89. ZHANG, X.Y; LI, L.P.; MIAO, N.N. Effects of *in ovo* feeding of cationic amino acids on hatchability, hatch weights, and organ developments in domestic pigeon squabs (*Columba livia*). **Poultry Science**, v. 97, p.110–117, 2018.