UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM POEDEIRAS COMERCIAIS NAS FASES DE CRIA E RECRIA

Aline Guedes Veras
Zootecnista

2020

LOMBADA DA VERSÃO FINAL

T
E
S
E
/
V
E
R
A
S
A.
G.
2
0
2
0

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM POEDEIRAS COMERCIAIS NAS FASES DE CRIA E RECRIA

Discente: Aline Guedes Veras
Orientadora: Profª. Drª. Silvana Martinez Baraldi Artoni
Coorientadora: Profª. Drª. Lizandra Amoroso

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

V476d

Veras, Aline Guedes

Desenvolvimento ósseo em poedeiras comerciais nas fases de cria e recria / Aline Guedes Veras. -- Jaboticabal, 2020

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Silvana Martinez Baraldi Artoni

Coorientadora: Lizandra Amoroso

1. Desenvolvimento ósseo. 2. Poedeiras Comerciais. 3. Tibiotarso direito. 4. Densitometria óssea. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM POEDEIRAS COMERCIAIS NAS FASES DE CRIA E RECRIA

AUTORA: ALINE GUEDES VERAS
ORIENTADORA: SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI
COORIENTADORA: LIZANDRA AMOROSO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. SILVANA MARTINEZ BARALDI ARTONI (Participaçao Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. DANIELA OLIVEIRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Morfologia/UFAPE / Garanhuns/PE

Profa. Dra. CRISTIANE SOARES DA SILVA ARAÚJO (Participaçao Virtual)
Nutrição e Produção Animal / Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Pós-doutorando MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pós-doutorando DANIEL FARIAS MARINHO DO MONTE (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV - UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 21 de dezembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE GUEDES VERAS – zootecnista, filha de Maria Salomé Guedes Leite Veras e Geová Veras da Silva, nasceu em Afogados da Ingazeira, Pernambuco, no dia 09 de setembro de 1987. Em 2009, iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Unidade Acadêmica de Serra Talhada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAST/UFRPE), onde foi bolsista de iniciação científica PIBIC durante o período de agosto de 2012 a julho de 2013, sob a orientação do Prof. Dr. Marco Aurélio Carneiro de Holanda. Foi membro integrante no Grupo de Estudo em Suíno e Aves da Unidade Acadêmica de Serra Talhada, de março de 2014 a março de 2017 tendo como professora responsável à Dra Mônica Calixto Ribeiro de Holanda. Obteve o título de Bacharelado em Zootecnia em 10 de outubro de 2014. Em março de 2015, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal com ênfase na área de Sistema de Produção Sustentável no Semi-Árido com linha de pesquisa em Avaliação de Alimentos para Produção Animal, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) onde foi bolsista CAPES, com orientação da Profa. Dra. Elisanie Neiva Magalhães Teixeira, obtendo seu título de Mestra em Produção Animal em 10 de julho de 2017. Em 07 de Agosto de 2017, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal com linha de pesquisa em Morfologia e Densitometria óssea em Animais Domésticos, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV), Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista CAPES, sob a orientação da Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni. Durante o doutorado participou de pesquisas desenvolvidas no laboratório de densitometria óssea, a qual foi aluna responsável pelo mesmo, pertencente ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, além do desenvolvimento e estudo de sua pesquisa “Desenvolvimento Ósseo em poedeiras Comerciais nas Fases de Cria e Recria”.

EPÍGRAFE

A POESIA
Explicar a poesia
Ninguém consegue explicar.
É mais pesada que o chumbo,
É leve igualmente o ar,
É fina como cabelo,
É bela como o luar!
Toca na alma da gente
Fazendo rir ou chorar,
Faz a tristeza morrer,
E o sonho ressuscitar.
A poesia é tão santa
que, quando um poeta canta,
Deus pára pra escutar!
E, pra terminar, meu hino,
A poesia, seu menino,
Como tudo que é divino
Não dá pra gente pegar,
Se eu pegasse a poesia,
Porta em porta sairia,
Igual a um mendigo faz,
Pedindo não, dando esmola,
Tocando a minha viola.
Cantando a canção da paz.

(Poeta Dedé Monteiro)

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, por ter permitido a concretização deste sonho, e por sempre estar ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis, me dando coragem e sabedoria, transformando as dificuldades em aprendizado e maturidade, me tornando assim um ser melhor.

Agradeço muito à minha família por sempre estar presente em minhas decisões, principalmente à minha querida mãe Maria Salomé Guedes (Dicinha) que nunca mediu esforços para que cada filho conquiste seus objetivos e, por ser meu porto seguro, pessoa essa que admiro muito, pela sua coragem e perseverança. Aos meus irmãos George, Diorges e Geová José por sempre me ajudarem em qualquer situação de minha vida, seja ela boa ou não, e por suas amizades. Ao meu pai Geová Veras (Vavá) por fazer parte de tudo, pois sem sua ajuda nada seria possível, meu muito obrigada a todos.

À minha amada sobrinha Maria Elizabeth por sempre fazer meus dias mais felizes, pois a cada telefonema a esperança se renova, e ouvir um “titia vem quando”, “titia tô com saudade”, “titia te amo” não tem preço e, é na certeza de lhe proporcionar uma vida melhor que estou aqui.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) Câmpus de Jaboticabal e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal pela oportunidade profissional.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 001. Que se trata não apenas de um auxilio, mas sim um incentivo a pesquisa nacional.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Silvana Martinez Baraldi Artoni, por todos os ensinamentos acadêmicos, e principalmente por sua amizade, pois desde o primeiro contato que tivemos pude ver o quanto a senhora é especial e um ser de muita luz, e por demostrar que tudo é possível quando temos fé e temor a Deus, minha eterna gratidão.

À minha coorientadora Profa. Dra. Lizandra Amoroso, por toda ajuda, seja auxiliando nas dúvidas, na escrita, na melhor forma de realizar as análises para que assim a pesquisa tomasse forma e corpo. E em especial por sua amizade.

Ao professor Dr. Edney Pereira da Silva pelas oportunidades, amizade e por me auxiliar na compreensão dos meus dados, além do trabalho, a compreender melhor a importância da Zootecnia e como podemos nos tornar a cada dia melhores profissionais.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros por sua paciência e auxilio durante as análises estatísticas.

À Dra. Michele Bernardino de Lima pela amizade e conselhos para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Francisca (Chica), responsável técnica pelo o laboratório de Morfologia Animal, pela ajuda e paciência durante a execução de minhas análises.

Aos membros do Poultry Study Group pelo acolhimento e parceria durante esses últimos dois anos de doutorado.

Quero deixar aqui um agradecimento em especial à Lízia Carvalho, por sua amizade, pelos conselhos, pela ajuda seja no âmbito acadêmico como no pessoal. Não tenho palavras para lhe agradecer por tudo mesmo. A vida é feita de surpresas, e você uma surpresa muita boa que a FCAV/Jaboticabal me trouxe e que vou levar para o resto da vida. E sempre que precisar pode contar comigo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e como ser humano.

MEU MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

Certificado do CEUA iii
Desenvolvimento ósseo em poedeiras comerciais nas fases de cria e recria iv
Resumo iv
Bone development in commercial layers in the breeding and recreation stages vi
Abstract – vi
Lista de figuras viii
Lista de tabelas ix
Capítulo 1 – Considerações Gerais 1
1. Introdução 1
2.1 Dekalb e Lohmann, os avanços na genética e na criação 4
2.2 Desenvolvimento ósseo das poedeiras 8
2.3 Células constituintes do tecido ósseo 12
2.3.1 Osteoblastos 13
2.3.2 Osteócitos 16
2.3.3 Osteoclastos 18
2.3.3.1 Mecanismo de reabsorção óssea 21
2.4 Desenvolvimento da cartilagem 23
2.4.1Cartilagem hialina 24
2.4.2 Cartilagem elástica 27
2.4.3 Fibrocartilagem 27
2.5 Minerais e outros fatores que podem vir a influenciar a integridade óssea das poedeiras 28
2.6 Importância do cálcio nos programas de alimentação para poedeiras 30
2.7 Hormônios e metabolismo do cálcio no desenvolvimento ósseo 32
2.8 Avaliação do desenvolvimento ósseo pela absortometria de raios-x de dupla energia 37
2.9 Curva de crescimento: modelo logístico 42
3. Referências Bibliográficas 46
Capítulo 2 – Avaliação do crescimento ósseo em três linhagens de poedeiras comerciais em fase de crescimento 57
Introdução 57
Material e Métodos 59
Resultados 63
Discussão 69
Conclusão 75

Referencias 75
Capítulo 3 – Desempenho e qualidade óssea de frangas poedeiras em crescimento 79
Introdução 79
Material e Métodos 81
Resultados 85
Discussão 90
Conclusão 94
Referencias 94

CERTIFICADO DO CEUA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento ósseo de poedeiras nas fases cria e recria"**, protocolo nº 006425/18, sob a responsabilidade da Prof.ª Dr.ª Silvana Martinez Baraldi Artoni, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de maio de 2018.

Vigência do Projeto	23/05/2018 a 20/12/2018
Espécie / Linhagem	Dekalb e Lohman
Nº de animais	Neste caso serão utilizados 144 ossos
Peso / Idade	Diferentes idades (1, 14, 28, 56, 70, 77, 84, 98, 112 e 126) e com variação de peso
Sexo	Fêmeas
Origem	Aves mantidas congeladas para coleta de ossos do trabalho realizado anteriormente com o protocolo de n° 009999/14 (CEUA)

Jaboticabal, 10 de maio de 2018.

Fabiana Pilarski

Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

DESENVOLVIMENTO ÓSSEO EM POEDEIRAS COMERCIAIS NAS FASES DE CRIA E RECRIA

RESUMO – A estrutura esquelética de poedeiras tem desenvolvimento completo na fase de cria e recria, sendo esse crescimento baseado no crescimento longitudinal e em espessura dos ossos longos do esqueleto apendicular. Além disso, auxilia no deposito e fornecimento de cálcio e fósforo no organismo. Desta forma, objetivou-se com o presente estudo avaliar o desenvolvimento ósseo em três linhagens de poedeiras comerciais, Dekalb White, Lohmann White e Lohmann Brown, na fase de crescimento alojadas em gaiolas por meio das avaliações de densitometria óssea, índice de Seedor, medidas do perímetro das epífises proximal e distal e da diáfise, resistência óssea e o conteúdo de cálcio ósseo. Foram utilizadas 270 aves de postura a partir de um a 126 dias de idade, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso com três tratamentos (Dekalb White, Lohmann White e Brown) e seis repetições cada, sendo a repetição representada por uma gaiola contendo 15 aves, totalizando 90 aves de cada linhagem. As aves foram alojadas em galpão experimental dotado de gaiolas em sistema piramidal, controle de temperatura automatizado, comedouro tipo calha e bebedouro *nipple*. O programa alimentar adotado foi composto por cinco dietas de acordo com cada idade, formuladas para atender as exigências nutricionais das linhagens, garantindo que não houvesse nenhum nutriente limitante. Para a descrição do crescimento ósseo foram escaneados os tibiotarsos direito nas idades de 1, 14, 28, 56, 70, 77, 84, 98, 112 e 126 dias para determinar a densidade e conteúdo mineral ósseo e área de superfície, por meio da absortometria de dupla energia de raios-X (DXA) em equipamento Hologic-QDR® devidamente calibrado. Concomitantemente, fez-se um estudo de composição química para determinação do conteúdo do cálcio ósseo em três idades (24, 84 e 126 dias). A função logística foi utilizada para descrever o crescimento ósseo e para o conteúdo do cálcio ósseo os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste de média Tukey à 5%. A área óssea do tibiotarso direito das aves Dekalb White e Lohmann White apresentaram-se menor em relação a Lohmann Brown (3,82; 3,98 e 4,73 cm) respectivamente. Porém, as aves da linhagem Lohmann apresentaram menor taxa de crescimento para área óssea, sendo a Lohmann Brown quatro dias mais precoce que a Dekalb White, refletindo diretamente no desenvolvimento estrutural ósseo. O conteúdo mineral ósseo (BMC) apresentou particularidade quanto a Lohmann Brown com deposição maior em relação a Dekalb White e Lohmann White, 0,607, 0,412 e 0,353 g, respectivamente. O comprimento ósseo apresentou-se de forma similar nas três linhagens estudadas (0,042 / dia) apresentando diferenças quanto ao ponto de inflexão, sendo a Dekalb White aos 29 dias, Lohmann White aos 30 dias e as Lohmann Brown aos 31 dias de idade. Esse constante crescimento quanto ao comprimento ósseo é importante, pois auxilia as aves nas funções mecânicas, principalmente de sustentação ao peso corporal. Quanto ao perímetro das epífises proximal e distal as aves das linhagens Lohmann Brown apresentaram valores superiores em relação as aves Dekalb White e Lohmann White, evidenciando adaptação bioquímica dos ossos a deposição muscular durante o crescimento. No que se refere a análise de variância os resultados para a deposição de cálcio ósseo não foram significativos (p = 0.9204) aos 28 dias de idade entre as três linhagens. No

entanto, foi observado que a deposição do cálcio aumentou proporcionalmente com a idade. O recente trabalho forneceu subsídios para conhecimento da morfofisiologia óssea, demostrando que a seleção contínua para características ósseas em poedeiras comerciais podem gerar linhagens distintas com relação às propriedades mecânicas dos ossos sem alterar os índices zootécnicos.

Palavras-chave: curva de crescimento, conteúdo mineral ósseo, Dekalb, densidade mineral ósseo, Lohmann, modelo logístico

BONE DEVELOPMENT IN COMMERCIAL LAYERS DURING REANING PERIOD

ABSTRACT – The skeletal structure of laying hens is fully developed in the breeding and recreating phase, and this growth is based on the longitudinal growth and thickness of the long bones of the appendicular skeleton. In addition, it helps deposit and supply calcium and phosphorus in the body. Thus, the objective of the present study was to evaluate bone development in three laying strains, Dekalb White, Lohmann White and Lohmann Brown, in the growth phase housed in cages by means of bone densitometry, Seedor index, measurements the perimeter of the proximal and distal epiphyses and the diaphysis, bone resistance and bone calcium content. A total of 270 one-day-old to 126 days of age, distributed in a completely randomized design with three treatments (Dekalb White, Lohmann White and Brown) and six replicates each, the repetition being represented by a cage containing 15 birds, totaling 90 birds of each strain. The birds were housed in an experimental shed equipped with pyramidal system cages, automated temperature control, trough type feeder and nipple waterer. The adopted food program consisted of five diets according to each age, formulated to meet the nutritional requirements of the strains, ensuring that there was no limiting nutrient. For the description of bone growth, the right tibiotarsus were scanned at the ages of 1, 14, 28, 56, 70, 77, 84, 98, 112 and 126 days to determine the density and bone mineral content and surface area, by means of dual energy X-ray absorptometry (DXA) in properly calibrated Hologic-QDR® equipment. Concomitantly, a chemical composition study was carried out to determine bone calcium content at three ages (24, 84 and 126 days). The logistic function was used to describe bone growth and for bone calcium content the data were subjected to analysis of variance (ANOVA) with a Tukey average test at 5%. The bone area of the right tibiotarsus of the birds Dekalb White and Lohmann White was smaller compared to Lohmann Brown (3.82; 3.98 and 4.73 cm) respectively. However, the birds of the Lohmann strain showed a lower growth rate for the bone area, with Lohmann Brown being four days earlier than Dekalb White, directly reflecting on bone structural development. The bone mineral content (BMC) showed particularity regarding Lohmann Brown with greater deposition in relation to Dekalb White and Lohmann White, 0.607, 0.412 and 0.353 g, respectively. Bone length was similar in the three strains studied (0.042 / day) with differences in terms of inflection point, with Dekalb White at 29 days, Lohmann White at 30 days and Lohmann Brown at 31 days of age. This constant growth in bone length is important, as it assists birds in mechanical functions, mainly in support of body weight. As for the perimeter of the proximal and distal epiphyses, the birds of the Lohmann Brown lines showed higher values in relation to the birds Dekalb White and Lohmann White, showing biochemical adaptation of bones to muscle deposition during growth. Regarding the analysis of variance, the results for bone calcium deposition were not significant ($p = 0.9204$) at 28 days of age between the three strains. However, it has been observed that calcium deposition increases proportionally with age. The recent work provided subsidies for knowledge of bone morphophysiology, demonstrating that the continuous selection for bone characteristics in commercial laying hens can

generate different strains regarding the mechanical properties of bones without altering zootechnical indexes.

Keywords: Growth curve, bone mineral contente, Dekalb, bone mineral density, Lohmann, logistic model

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Fenótipos de galinhas poedeiras. Linhagem Dekalb White (A) e Dekalb Brown (B).....5

Figura 2. Fenótipos de galinhas poedeiras. Linhagem (A) e Dekalb Brown (B).....7

Figura 3. Estrutura de um osso longo.....10

Figura 4. Fotomicrografia da epífise proximal do fêmur de poedeira com seus respectivos osteoblastos.....15

Figura 5. Fotomicrografia da epífise proximal do fêmur de poedeira com osteócitos dentro das lacunas.....17

Figura 6. Fotomicrografia de osteoclastos de fêmur de poedeira.....18

Figura 7. Esquema da diferenciação dos osteoclastos. Adaptado de Takahashi et al. (2014) 27

Figura 8. Esquema do processo de reabsorção óssea.....22

Figura 9. Procedimento da densitometria óssea em poedeira. Ave posicionada para captura da imagem de densitometria (A); forma de apresentação dos dados no monitor após a captura das imagens (B); imagem da captura de densitometria de um osso isolado (C).....40

Figura 10. Crescimento em função do tempo com ponto de inflexão.....44

Capítulo 2

Figura 1. Representação gráfica do peso do tibiotarso direito (A), BMC (B), BMD (C), e resistência óssea (D) de frangas poedeiras em crescimento de acordo com o ponto de inflexão de cada linhagem.....69

Capítulo 3

Figura 1. Representação gráfica da epífise proximal (A), diáfise (B) e a epífise distal (C) do tibiotarso direito de três linhagens distintas com diferentes idades.....91

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Desempenho produtivo da Dekalb White, Lohmann White e Lohmann Brown com 95 semanas de idade.....8

Capítulo 2

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional das dietas.....60

Tabela 2. Estimativa dos parâmetros da função logística para peso ósseo de frangas em crescimento com diferentes idades.....63

Tabela 3. Estimativa dos parâmetros da função logística para o crescimento ósseo de frangas em diferentes idades.....67

Tabela 4. Estimativa dos parâmetros da função logística para resistência óssea de frangas em crescimento.....67

Capítulo 3

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional das dietas.....85

Tabela 2. Estimativa dos parâmetros da função logística para comprimento e índice Seedor do tibiotarso direito de frangas poedeiras em diferentes idades.....83

Tabela 3. Perímetro das epífises proximal, distal e a diáfise do tibiotarso direito de frangas poedeiras em diferentes idades de crescimento.....90

Tabela 4. Médias sobre a deposição de cálcio em poedeiras em fase de crescimento.....91

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.INTRODUÇÃO

Avicultura de postura brasileira evoluiu muito ao longo dos anos e, grande parte dessa evolução é devido ao progresso genético das linhagens comerciais, resultando em poedeiras cada vez mais produtivas e longevas, capazes de produzir cerca de 445 ovos por ave alojada, em um ciclo produtivo que pode variar de 90 a 100 semanas de idade de acordo com a linhagem.

Atualmente, o Brasil ocupa o quinto lugar no *ranking* dos maiores produtores mundiais de ovos (2.547) ficando atrás de países como a China, que fica em primeiro lugar no *ranking* com produção de ovos de 30.963, seguido dos Estados Unidos (6.259), Índia (4.848) e México (2.771) mil toneladas por ano (ANUALPEC, 2019). Esse destaque do Brasil na produção de ovos tanto é atribuído ao melhoramento genético como ao aperfeiçoamento do manejo, ambiência, sanidade e nutrição, o que mantém a avicultura de postura como valioso empreendimento econômico na produção de proteína de origem animal para o consumo humano (Silva, 2014; Camelo et al., 2015; Vieira, 2015).

Dados divulgados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) mostram que no ano de 2019 foram alojadas 1.353.096 milhões de galinhas representando um aumento de 10,26% por unidade de ovos produzidos em comparação ao ano de 2018 (ABPA, 2020). Assim, quando há aumento em alojamentos de poedeiras isso corresponde ao crescimento positivo na produção de ovos. De acordo com dados do IBGE, no terceiro trimestre de 2019, foram produzidas 956,62 milhões de dúzias, esse resultado apresenta aumento de 3,4% em relação ao mesmo trimestre em 2018 (928.415 milhões de dúzias) caracterizando o país como destaque. A região Sudeste é a mais expressiva no alojamento de poedeiras, sendo o estado de São Paulo responsável pela maior produção (29,67%) de ovos do Brasil, seguido pelo Espírito Santo (9,60%), Minas Gerais (9,20%) e Paraná (8,79%) (ANUALPEC, 2019; EMBRAPA, 2019).

Segundo Hruby et al. (1996) e Gous et al. (1999) a eficácia do programa nutricional depende do conhecimento da composição corporal e do potencial genético de cada linhagem de poedeira. Com base nesses critérios é possível calcular as exigências nutricionais e predizer o consumo de ração, o ganho de

peso e a conversão alimentar das aves conforme a fase de produção, além de auxiliar no desenvolvimento esquelético dessas aves, o que é de suma importância para o total desempenho zootécnico da linhagem.

Estudos recentes na área de densitometria óssea e composição corporal em aves de interesse zootécnico se tornaram importantes para avicultura moderna, uma vez que esta técnica permite o acompanhamento das variações de massa muscular e conteúdo ósseo aliada à tecnologia moderna devido ao uso de aparelho altamente sofisticados auxiliando na compreensão e avaliação da composição corporal e do processo de mineralização óssea das aves com precisão e acurácia (Almeida Paz et al., 2009).

O método de absortometria por duplo feixe de raios-X (DXA) é uma alternativa utilizada para avaliar a composição corporal do animal e suas variações ao longo do tempo. Por não ser invasivo, permite o estudo no mesmo animal por todo período de desenvolvimento ou ciclo de vida, sem prejuízo à saúde ou ao desempenho zootécnico.

Essa técnica baseia-se na atenuação por todo o corpo através de feixe de luz de radiação gerado por uma fonte de raio X com dois níveis de energia, que atravessa o indivíduo no sentido antero-posterior onde a imagem é capturada. Logo após a varredura o software fornece informações relacionadas ao conteúdo mineral ósseo (BMC; g), densidade mineral óssea (BMD; g/cm^2), massa magra (músculos, vísceras e água corporal, g) e porcentagem de gordura (%) (Salas et al., 2012; Fleury, 2020). Deste modo, esta técnica torna-se cada vez eficiente na precisão de resultados ao longo do tempo assim como colabora no melhoramento da linhagem, uma vez que a estrutura óssea das poedeiras atuais tende a ser mais susceptível as fraturas e doenças ósseas (Whitehead, 2004; Fleming et al., 2006).

Sabe-se que, com o avançar da idade, e o aumento da produtividade das linhagens atuais, a resistência óssea dessas aves tende a reduzir, principalmente em sistemas de criação em que as aves são alojadas em gaiolas, limitando atividade física gerando efeitos diretos na redução da integridade esquelética (Mazzuco e Hester, 2005), diferentemente de aves criadas em sistema *cage-free* e/ou *free-range*, na qual tende aumentar a espessura do osso cortical e a resistência óssea prevenindo osteoporose na poedeira longeva. Segundo os mesmos autores, em pesquisa realizada com o DXA sobre a

integridade óssea em aves da linhagem Leghorns White, observaram que a varredura por DXA para à densidade mineral óssea e o conteúdo mineral ósseo foram positivamente correlacionados com a resistência óssea (r = 0,58 e r= 0,41, respectivamente). Assim como o peso da cinza óssea correlacionou positivamente com a BMD e o BMC (r = 0,65 e r = 0,85, respectivamente), em consequência ao detrimento da massa óssea, tornando o esqueleto das aves fragilizado e mais susceptível a fraturas ósseas, principalmente no final da fase de produção.

Schreiweis et al. (2004) avaliando o efeito do ciclo ovulatório e de postura na densidade mineral óssea e no conteúdo mineral de aves White Leghorns por absorção de raios-X de dupla energia, constataram que as variações da BMD e do BMC para tibiotarso e o úmero foram superiores a 10% entre 25 e 65 semanas de idade, indicando o potencial uso DXA na avalição dá integridade esquelética de poedeiras a qualquer momento do dia, independente do estágio de formação dos ovos, sugerindo que o uso da absortometria é um bom preditor da integridade esquelética ao avançar da idade em poedeiras modernas, além do seu potencial uso na seleção genética para qualidade óssea.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o desenvolvimento ósseo em três linhagens de poedeiras comerciais, Dekalb White, Lohmann White e Lohmann Brown, nas fases de cria e recria alojadas em gaiolas por meio das avaliações de densitometria óssea, índice de Seedor, medidas do perímetro das epífise proximal e distal e da diáfise, resistência óssea e o conteúdo de cálcio ósseo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dekalb e Lohmann, os avanços na genética e na criação

Diante do crescimento constante na avicultura de postura as interações entre manejo, ambiência, genética e nutrição se tornaram imprescindíveis ao desenvolvimento de tecnologias mais confiáveis e adequadas às especificações na criação para poedeiras (Baêta e Souza, 2010; Vieira, 2015) e dentre estes destacamos o melhoramento genético que direciona a seleção de linhagens específicas para obtenção de bons índices de produtividade. Neste segmento de postura e criação de poedeiras três grandes empresas de genética de postura comercial destacam-se mundialmente: a americana Hy-Line, que dispõe de avozeiro e matrizeiro no Brasil, o grupo holandês Hendrix Genetics que detém as linhagens ISA, Shaver, Hisex, Dekalb, Bovans e Azur e o grupo francês Grimaud com a linhagem Novogen (Santos, 2008).

Destaca-se que a criação de poedeiras tem potencial de crescimento no Brasil, uma vez que o consumo de ovos fica em torno de 230 ovos/habitante/ano em comparação com outros países como, Estados Unidos, China e Japão que é de 289, 300 e 320, respectivamente (OVOSITE, 2019; ABPA, 2020). Além disso, a produção média por ave de 435 ovos/ave/ano com peso médio do ovo de 67,0 g e 445 ovos/ave/ano com peso médio do ovo de 64,7 g para poedeiras como a Lohmann Brown e Lohmann White, respectivamente (Manual de manejo Lohmann Brown-LITE e LSL-LITE, 2017).

Dessa forma, tanto em produtividade como em desempenho duas linhagens de poedeiras de maior ocorrência nas criações para produção de ovos comerciais no Brasil, a Dekalb e a Lohmann em suas variedades branca (White) e marrom (Brown). Essas linhagens apresentam altos índices de produção de ovos até o final do ciclo produtivo, uma vez que sua genética proporciona o seu máximo desempenho aliados à nutrição para cada fase de crescimento e produção. A seguir são apresentadas algumas das particularidades de cada uma dessas aves para proporcionar ao leitor conhecimento sobre as poedeiras mais produtivas e rentáveis.

A Dekalb foi desenvolvida pela empresa holandesa Hendrix Genetics que há mais de 60 anos tem consolidação no mercado apresentando bons índices

de desempenho por meio de alta genética para o desenvolvimento de produtos de qualidade (ovos) associado ao bem-estar das aves (Dekalb, 2020).

Desde de 1935 a antiga Dekalb Country Agricultural Association desenvolvia sementes de milho híbridos, e só a partir de 1944 já com nova marca a Dekalb Poultry Research foi fundada e aplicando seus conhecimentos sobre melhoramento genético em aves e colocando poedeiras no mercado pela primeira vez no ano de 1948. Com o passar dos anos e desenvolvendo suas próprias linhagens puras a Dekalb Poultry Research iniciou-se um período de fusões e transferências de gestores, que em 1971 Jim Warren tornou-se o gerente da Dekalb Warren Company, devido à fusão da J. J. Warren com as instalações Warren originando a Dekalb-Warren, e foi diretor de pesquisa avícola de 1974 a 1991. Atualmente a Dekalb é reconhecida mundialmente principalmente na América do Norte, Europa e Japão (Dekalb, 2020)

As poedeiras da linhagem Dekalb, em suas variedades White ou Brown (Figura 1) apresentam maturidade sexual precoce, altos picos de postura e capacidade de persistência pós-pico até o final do ciclo produtivo. Como é adaptável às diversas condições climáticas, apresenta comportamento dócil e é de fácil manejo (Manual de manejo das poedeiras Dekalb White, 2009).

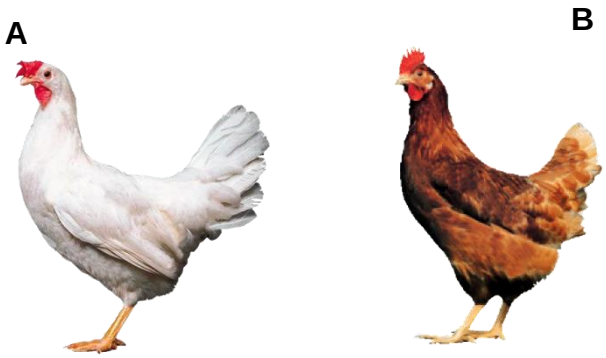


Figura 1. Fenótipo de galinhas poedeiras. Linhagens Dekalb White (A) e Dekalb Brown (B) Fonte: Adaptado do Manual de manejo das poedeiras Dekalb White (2009).

Neste contexto, várias são as pesquisas desenvolvidas para ressaltar o desempenho, a produção e a qualidade dos produtos no segmento de postura comercial do Brasil. Contudo, Molnár et al. (2018) avaliaram o efeito no período de fornecimento (manhã e tarde) da ração contendo diferentes proporções e

tamanho de partícula de calcário (fino ou espesso) sobre a integridade do tibiotarso em poedeiras Dekalb White de 75 a 92 semanas de idade. Os autores observaram que o período de coleta dos tibiotarsos para análise mineral afetou o conteúdo de Ca e P do osso, ou seja, tibiotarsos coletados pela manhã continham menos Ca e P em comparação com as coletadas de aves no período da tarde (P = 0,027 e P = 0,032, respectivamente). A qualidade óssea não foi afetada por diferentes quantidades de calcário fino e grosso nos dois períodos de fornecimento da ração. Poedeiras que receberam calcário fino à tarde (tratamento 3) e as que não receberam nenhuma fonte de calcário pela manhã (tratamento 6) mantiveram teor total de Ca e P ósseos semelhantes aos das poedeiras que receberam calcário fino pela manhã e calcário grosso a tarde (tratamentos 2, 4 e 5), provavelmente porque a proporção entre o osso cortical e medular possa diferir (Dacke te al., 1993), já que o osso medular aumenta rapidamente durante o início de postura e continua a se acumular lentamente ao longo da fase de postura em dependência do osso cortical. Além disso, o tibiotarso, por ser um osso longo, contêm mais conteúdo de tecido medular, ou seja, mais reservas de minerais (Whitehead e Fleming, 2000; Whitehead, 2004).

Seguindo com o padrão genético de poedeiras e instalações de empresas no Brasil, citamos a empresa Lohmann Tierzucht que é líder mundial em genética de aves de postura comercial, em que a linhagem Lohmann está presente em mais de 120 países e, no Brasil como “A Lohmann Brasil” se faz presente em todos os estados produtores de ovos comerciais. Buscando sempre atender cada vez melhor as demandas e necessidades específicas de cada região para que seu produto final, o ovo, chegue à mesa dos consumidores com qualidade (T.I. Lohmann do Brasil, 2016).

As poedeiras da linhagens Lohmann, nas variedades branca ou marrom (Figura 2) são aves com características produtivas bem expressivas como: a melhor conversão alimentar em massa de ovo produzido, persistência de produção como ciclo produtivo mais longo (95 semanas), maior quantidade de ovos vendáveis, boa qualidade de casca e melhor viabilidade econômica. É uma galinha menos agressiva o que facilita o manejo diário e pesagens para o acompanhamento de peso corporal, aptidão para serem criadas em sistemas alternativos *cage-free*, *free-range* e ovos orgânicos sempre respeitando o bem-

estar animal (Manual de manejo Lohmann Brown-LITE e LSL-LITE, 2017; INFOLOHMANN, 2017).

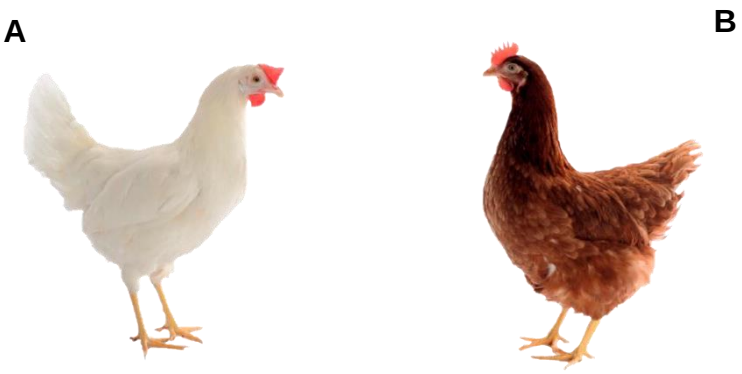


Figura 2. Fenótipo de galinhas poedeiras. Linhagem Lohmann White (A); Lohmann Brown (B). Fonte: Adaptado do Manual de manejo Lohmann Brown-LITE e LSL-LITE, 2017; INFOLOHMANN (2017).

Neijat et al. (2019) trabalharam com o efeito do tipo de alojamento (sistema em piso, gaiola e enriquecido) nas fases de recria e postura sobre a qualidade óssea dos ossos medulares (fêmur e tibiotarso) e pneumáticos (úmero e quilha) em poedeiras Lohmann LSL com 73 semanas de idade. As aves alojadas em sistema de gaiola desde a recria até o período de postura tiveram menor pontuação em todas as variáveis ósseas avaliadas em todos os tipos de ossos. No entanto, aves em fase de recria alojadas em gaiolas e depois transferida para gaiolas enriquecidas em seu período de postura tiveram desempenho tão bom quanto as poedeiras alojadas continuamente em sistema de piso, em particular para o peso ósseo total do fêmur (P=0,044) e força de ruptura óssea para o úmero (P=0,001). As aves alojadas em sistema de piso apresentaram maior peso ósseo para os medulares e pneumáticos, melhor teor de cinzas para o osso da quilha (P=0,048), em comparação como os demais sistemas de alojamento. Mostrando assim, o quanto o tipo de alojamento pode ter interferência na qualidade óssea de galinhas poedeiras desde a recria até à postura.

A Tabela 1 apresenta o desempenho das linhagens Lohmann e Dekalb em suas variedades branca e vermelha.

Tabela 1. Desempenho das linhagens Dekalb White, Lohmann White e Brown com 95 semanas de idade.

Característica	DEKALB WHITE	LOHMANN WHITE	LOHMANN BROWN
Idade com 50% de produção	141 dias	140 – 150 dias	140 – 150 dias
Pico de produção	96%	94 – 96%	93 – 95%
Ovos por ave alojada	427	438	430
Massa dos ovos por ave alojada	26,7 Kg	27,84 Kg	28,02 Kg
Peso médio dos ovos	62,5 g	64,0 g	65,2 g
Cor da casca	Branca	Branca	Marrom
Resistência de quebra da casca	> 40 Newton	> 40 Newton	> 40 Newton
Consumo de ração de 1 – 17 semanas	7,2 Kg	7,0 – 7,5 Kg	5,7 – 5,9 Kg
Consumo para produção de ovos	109 g/dia	105 – 115 g/dia	110 – 120 g/dia
Conversão alimentar	2,02 Kg/Kg massa	1,95 – 2,05 Kg/Kg massa	2,0 – 2,1 Kg/Kg massa
Peso corporal com 17 semanas	1,250 Kg	1,171 – 1,243 Kg	1,321 – 1,417 Kg
Peso ao final de produção	1,725 Kg	1,672 – 1,775 Kg	1,944 – 2,086 Kg
Viabilidade na recria	97%	97 – 98%	97 – 98%
Viabilidade no período de postura	90%	92 – 93%	92 – 94%

Fonte: Adaptado de Manual de Manejo Lohmann Brown-LITE e LSL-LITE (2017); Dekalb White (2020).

2.2 Desenvolvimento ósseo das poedeiras

A estrutura esquelética de uma poedeira comercial apresenta desenvolvimento completo na fase de recria. Esse desenvolvimento é baseado no crescimento longitudinal e em espessura (largura) dos ossos longos do

esqueleto apendicular, que se dá pelo processo de ossificação endocondral e ossificação intramembranosa, respectivamente (Whitehead, 2004).

O crescimento ósseo em diâmetro é realizado basicamente pela formação externa (periósteo) e reabsorção interna (endósteo). Isso ocorre na porção central dos ossos longos cilíndricos. Como a maioria dos ossos são cilíndricos, assimétricos centralmente e expandidos (alargados) de maneira desigual em cada extremidade, o crescimento em diâmetro é mais complexo do que o descrito e varia de acordo com a dinâmica de mudanças ocorridas naquela região de crescimento (Sandy et al., 2002).

Durante o processo de desenvolvimento, o tecido ósseo é constituído de aproximadamente, 69% de minerais, 22% de proteína e 8% de água e elementos traços. O zinco, por exemplo, representa 28% no total do corpo, e a matriz orgânica apresenta como componente principal o colágeno tipo I (90%) que participa no processo de mineralização óssea. Além disso, é um tecido dinâmico influenciado por fatores fisiológicos, nutricionais e mecânicos, sendo sua formação e integridade física de grande importância para desempenho animal (Pizauro Junior et al., 2002; Araújo et al., 2006; Pizauro et al., 2017).

O tecido ósseo é fundamental na produção de aves de postura ou corte ao promover a proteção de órgãos vitais, alojar a medula óssea, além de atuar no depósito e fornecimento de cálcio, fósforo e outros íons regulando a homeostase de minerais no organismo. O sistema esquelético proporciona suporte e fixação aos músculos e é constituinte das alavancas que ampliam as forças geradas na contração muscular além de sofrer contínua remodelação óssea (Junqueira e Carneiro, 1990; Korver et al., 2004). O osso é constituído pelas epífises proximal e distal, diáfise e metáfise, esta última região fica intermediária entre as epífises e a diáfise (Barreiro et al., 2009; Junqueira e Carneiro, 2013), e de um modo geral, apresenta semelhante constituição nas diferentes espécies animais com particularidades no tamanho e sua forma (Figura 3).

Os sais cristalinos depositados na matriz orgânica do osso sob controle celular são principalmente o cálcio e o fósforo na forma de hidroxiapatita, com a seguinte composição química ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados formando uma capa de hidratação, onde facilita a troca de íons entre os cristais de hidroxiapatita e o líquido intersticial (Sandy et al., 2002; Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013). A associação de

hidroxiapatita a fibras colágenas tipo I (parte orgânica da matriz óssea) é responsável pela rigidez e resistência do tecido ósseo.

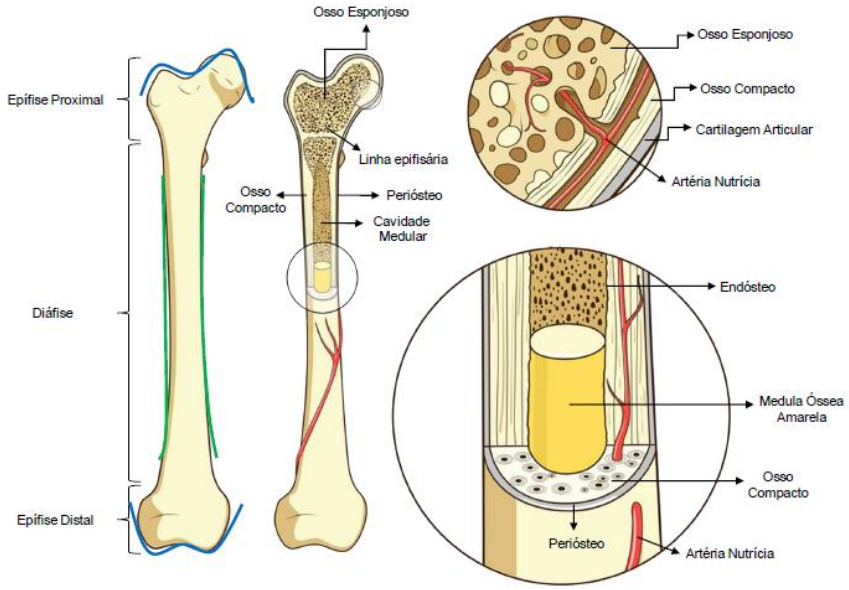


Figura 3. Estrutura de um osso longo, no qual pode ser observada a diáfise com a cavidade medular circundada por um tubo de osso compacto, revestido internamente por uma camada de osso esponjoso. O endósteo reveste todas as superfícies ósseas em contato com a cavidade medular. As duas extremidades das epífises proximal e distal consistem principalmente de osso esponjoso com uma fina camada externa de osso compacto. Exceto para as superfícies articulares que são cobertas pela cartilagem hialina (articular), indicada em azul, a superfície externa do osso é revestida por uma camada fibrosa de tecido conjuntivo denominado periósteo (verde). Fonte: Google Imagens.

Morfologicamente existem duas formas de osso: o cortical (compacto) e o trabecular (esponjoso) (Figura 3). No osso cortical, as fibrilas de colágeno densamente compactadas formam lamelas concêntricas e as fibrilas nas lamelas adjacentes correm em planos perpendiculares aumentando a flexibilidade óssea e, consequentemente, a resistência à ruptura. O osso esponjoso tem matriz porosa, de modo que as trabéculas se organizam em forma de rede tridimensional dispostas de acordo com as linhas das forças mecânicas, conferindo ao osso esponjoso resistência às cargas transmitidas pelas superfícies articulares. Conforme Sandy et al. (2002), as diferenças entre osso cortical e esponjoso são estruturais e funcionais, uma vez que os arranjos dos dois tipos de ossos estão relacionados às suas funções primárias, no qual o osso cortical fornece funções mecânicas e protetoras e o osso esponjoso fornece funções metabólicas.

Gartner e Hiatt, (2007); Reece (2008); Junqueira e Carneiro (2013) o tecido ósseo é um tipo conjuntivo especializado constituído por células associadas ao osso e ao material extracelular calcificado, a matriz óssea. A matriz óssea é composta por fibras (basicamente de colágeno tipo I) e substância fundamental (proteoglicanos de condroitino-sulfato e queratan-sulfato), além de proteínas como a osteonectina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. Enquanto que, a matriz colagênica proporciona suave maleabilidade conferindo-lhe possibilidades de extensão e flexão muscular (Judas et al., 2012)

A formação óssea (ossificação) ocorre por dois tipos de processos, o direto (ossificação intramembranosa) e o processo indireto (ossificação endocondral). Ambas requerem matriz óssea e suprimento vascular bem desenvolvido para a elaboração e mineralização da matriz extracelular, além da mobilidade local favorecer a diferenciação de condrócitos ou fibroblastos em tecido ósseo (Sandy et al., 2002).

A ossificação endocondral se desenvolve a partir da cartilagem hialina, com ocorrência na maioria dos ossos longos, onde a epífise proximal destes ossos aumenta em comprimento e tamanho com o crescimento da cartilagem epifisária, permitindo maior movimentação entre os ossos do esqueleto (Dyce et al., 2010).

A ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento embrionário pela transformação direta de células mesenquimais em osteoblastos. Esse tipo de ossificação ocorre principalmente em ossos achatados do crânio e da face produzindo rede de trabéculas ósseas que se espessam e fundem-se formando uma lâmina óssea que é separada dos ossos adjacentes por tecido fibroso persistente até atingir o seu tamanho definitivo, além de contribuir para o crescimento dos ossos curtos e aumento em espessura dos ossos longos (Reece, 2008; Junqueira e Carneiro, 2013).

Além da formação óssea que constitui um novo osso, também há o altamente complexo processo de remodelação óssea em que o osso velho é substituído por osso novo em um ciclo composto por quatro fases: a primeira é ativação onde osteoclastos são recrutados para a superfície do osso; a segunda ocorre pelo o início da reabsorção óssea por osteoclastos; a terceira pela transição (ou período de reversão) da reabsorção para a nova formação óssea e a quarta fase é a formação óssea por osteoblastos (Sims e Gooi, 2008; Matsuo

e Irie, 2008), constituindo assim o processo de absorção e remodelação óssea que é importante principalmente em caso de fratura.

Vale ressaltar que a formação, remodelagem e alinhamento dos ossos requerem mais tempo que o rápido crescimento permite, pois as deformidades podem estar relacionadas com nutrientes específicos como enzimas, hormônios ou requerimento de oxigênio pelas células especializadas (proliferação dos condrócitos) ou com o metabolismo dos produtos (ácido lático, dióxido de carbono) que são aumentados devido ao rápido crescimento (Oliveira et al., 2000).

Nos animais em desenvolvimento as epífises dos ossos longos são formadas principalmente por osso trabecular e a diáfise apresenta maior quantidade de osso compacto (Fornari, 2012). Ou seja, o crescimento dos ossos ocorre com a formação de novos tecidos, na periferia dos ossos longos, permitindo crescimento em comprimento e largura, juntamente com a reabsorção parcial de tecido existente, pois as epífises aumentam de tamanho com o crescimento da cartilagem epifisária acompanhado por ossificação endocondral e a diáfise cresce em diâmetro e espessura (Reece, 2008).

Assim, o conhecimento sobre a estrutura e funções das células ósseas é de grande importância pois contribui para melhor compreensão da biologia celular, em particular as aves de postura, permitindo explicar algumas afecções ósseas que acometem essas aves como a “fadiga de gaiola” e ou osteoporose. A fragilidade óssea é um dos principais problemas da produção, pois aves com perda significativa na qualidade óssea tendem a permanecer sem movimento devido à dificuldade de locomoção e, isso tem efeito direto no consumo alimentar, e consequentemente, na produção de ovos e no bem-estar animal (Paludo, 2016).

2.3 Células constituintes do tecido ósseo

As células ósseas representam 2% do tecido ósseo, são responsáveis pela formação e manutenção do osso ao longo da vida, essas células são os osteoclastos (células grandes e multinucleadas, cuja a principal função é a remodelação do tecido ósseo); os osteoblastos (sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, com presença de colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas,

além de concentrar fosfato de cálcio e da mineralização da matriz óssea) e os osteócitos, que estão localizados na cavidade da matriz óssea e são essenciais para sua manutenção Gartner e Hiatt, (2007); Reece (2008); Junqueira e Carneiro (2013).

Dois sistemas fisiológicos são envolvidos na produção das células do tecido ósseo, o sistema hematopoiético e o estroma fibroblástico (células-tronco mesenquimais). Ambos sistemas possuem células que se dividem e se diferenciam, além de reter funções da célula precursora (Clarke, 2008; Pizauro et al., 2017).

O tecido ósseo é composto por uma fase extracelular, que é formada, mantida e remodelada por três tipos de células: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (Fernandes, 2012; Judas et al., 2012; Souza, 2014). Desta forma, enquanto as células dos osteoclastos são derivadas do sistema hematopoiético, as demais células como: os osteoblastos, os osteócitos, os condroblastos, as células mesenquimais progenitoras, os condrócitos (células responsáveis pela produção e manutenção da matriz cartilaginosa) são derivados do sistema do estroma fibloblástico (Pizauro Junior et al., 2017).

As funções e as particularidades de cada célula são descritas logo a seguir:

2.3.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são células responsáveis pela formação do tecido ósseo e participam da mineralização da matriz óssea por meio da liberação de fosfato de cálcio, são células que apresentam formato cuboides ou cilíndricas, irregulares, localizadas ao longo da superfície óssea, lado a lado, tem origem nas células mesenquimais e compreendem cerca de 4 a 6% do total de células ósseas residentes (Capulli et al., 2014, Pizauro Junior et al., 2017). Tem como função a síntese e a secreção da matriz orgânica que contém o colágeno tipo I, proteínas como a fosfatase alcalina e a osteocalcina que se associa à hidroxiapatita (Figura 4).

Adicionalmente os osteoblastos localizados na superfície da matriz óssea produzem vários fatores de diferenciação e, dentre estes estão o ligante do receptor ativador do Kappa-β (RANK-L); a osteocalcina, que auxilia na mineralização óssea; a osteopontina que está intimamente ligada a formação

da zona de vedação entre os osteoclastos e o compartimento subosteoclástico; a osteonectina ajuda na mineralização óssea; a sialoproteína óssea I e II que liga os osteoblastos a matriz extracelular e o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) este auxilia na transcrição das células osteoblásticas em células osteoclásticas (Audi e Triffitt, 2002; Gartner e Hiatt, 2007).

Os osteoblastos apresentam características morfológicas de células sintetizadoras de proteínas, incluindo retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi proeminente, bem como várias vesículas secretoras que são ricas em fosfatase alcalina (Marks Jr. e Popoff, 1988; Ross e Pawlina, 2008; Capulli et al., 2014). Além disso os osteoblastos secretam osteóide em direção à matriz óssea, pois quando os osteoblastos são aprisionados pela matriz recém-sintetizada são denominados osteócitos (Damoulis e Hauschka, 1997; Junqueira e Carneiro, 2013). Contudo, Kapinas et al. (2010); Buo e Stains (2014) evidenciaram que outros fatores como o fator de crescimento fibroblasto-23 (FGF-23) e microRNAs e a conexina 43 (Cx43) desempenham papel importante na diferenciação dos osteoblastos. A conexina 43 no osso mostrou-se importante modelador da capacidade do osso e das células ósseas de responder a estímulo mecânicos, estimulação hormonal e do fator de crescimento para facilitar a consolidação óssea após a fratura (Watking et al., 2011; Zang et al., 2011).

Os osteoblastos apresentam em sua estrutura, numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se projetam a matriz óssea e comunicam-se com os osteoblastos vizinhos e osteócitos. Entre essas células formam-se junções comunicantes (*gap junctions*), que são fundamentais para a ligação e comunicação entre células adjacentes. Apesar destes prolongamentos formarem as junções comunicantes entre as células ósseas, o número dessas junções entre os osteoblastos, é menor do que o existente entre os osteócitos (Gartner e Hiatt, 2007; Judas et al., 2012).

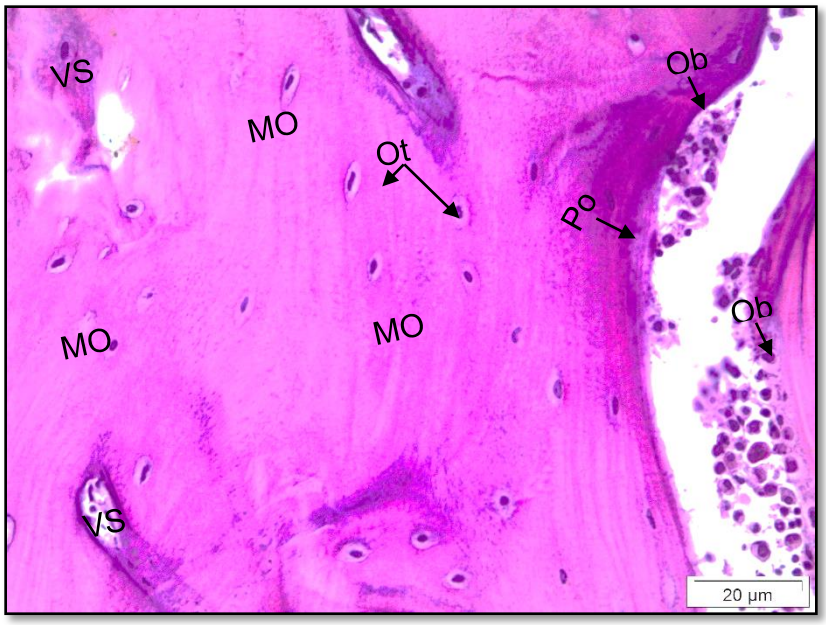


Figura 4. Fotomicrografia da epífise proximal do fêmur de poedeira (40x). Seção corada com Hematoxilina-Eosina (HE), no qual pode ser observado uma porção de matriz óssea (MO); os osteoblastos polarizados (Ob) revestem a espícula óssea e originando osteócito (Ot) sobre o tecido ósseo; vaso sanguíneo (VS); periósteo (Po).
Fonte: Arquivo do Grupo de estudo em Análises Morfométricas Teciduais do Laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP/FCAV, Jaboticabal.

As células osteoblásticas possuem várias moléculas específicas em sua membrana plasmática como as integrinas e os receptores do paratormônio, os quais estimulam os osteoblastos a secretarem o ligante da osteoprotegerina (OPGL). Este ligante por sua vez é um fator que induzirá a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos multinucleados aumentando assim a expressão do ligante do receptor ativador kappa-β (RANK-L). Além disso, os osteoblastos também secretam enzimas que auxiliam na remoção dos osteoides para que os osteoclastos entrem em contato com a superfície óssea mineralizada (Gartner e Hiatt, 2007)

A síntese da matriz óssea realizada pelos osteoblastos ocorre em duas etapas principais: deposição da matriz orgânica e sua subsequente mineralização. Na primeira etapa, os osteoblastos secretam proteína de colágeno (principalmente tipo I), proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina e osteopontina) e proteoglicano incluindo decorina e biglicano, que formam a matriz orgânica.

Depois disso, a mineralização da matriz óssea ocorre em duas fases: a fase vesicular (porções chamadas vesículas da matriz são liberadas do domínio da membrana apical dos osteoblastos para a matriz óssea recém-formada na qual se ligam aos proteoglicanos e outros componentes orgânicos) e a fase fibrilar (ocorre quando a supersaturação dos íons de cálcio e fosfato no interior das vesículas da matriz leva à ruptura dessas estruturas e os cristais de hidroxiapatita se espalham para a matriz circundante) (Boivin e Maunier, 2002; Clarke Anderson, 2003; Yoshiko et al., 2007; Boivin et al., 2008).

2.3.2 Osteócitos

Os osteócitos compreendem 90 a 95% das células ósseas e são osteoblastos maduros dentro da matriz óssea e são responsáveis por sua manutenção (Figura 5).

Diferentes dos osteoblastos e osteoclastos que foram definidos por suas respectivas funções durante a formação e reabsorção óssea, os osteócitos foram previamente definidos por sua morfologia e localização, pois são recobertos por conteúdo mineral e situam-se em cavidades (lacunas) dentro da matriz óssea da qual partem canalículos (que contêm os seus numerosos prolongamentos citoplasmáticos e que permitem a passagem de nutrientes e dentre outras substâncias) estabelecendo contato com as células adjacentes e com células osteogênicas na superfície óssea através de junções comunicantes contendo Cx43 (Rochefort et al., 2010; Dallas et al., 2013; Buo e Stains, 2014; Florencio-Silva et al., 2015, Tavares, 2017).

A forma dos osteócitos incorporados difere de acordo com o tipo de osso, ou seja, osteócitos do osso trabecular são mais arredondados que os osteócitos do osso cortical, que exibem formato alongado (Currey, 2003). Além disso, os osteócitos podem se comunicar com os osteoblastos distantes e outras células ósseas através da expressão de células sinalizadoras, como os transportadores de óxido nítrico e glutamato (Ross e Pawline, 2007).

Por serem as células mais numerosas presentes na matriz óssea, e devido a complexa organização e disposição, pode-se afirmar que os osteócitos estão numa situação privilegiada para captar as alterações que possam ocorrer na matriz óssea e os estímulos mecânicos que atuam sobre o osso, através dos

sensores mecânicos. Essas informações captadas são transmitidas às células da superfície para que possam ativar processos de remodelação ou formação óssea (Ross e Pawline, 2007; Rochefort et al., 2010; Tavares, 2017).

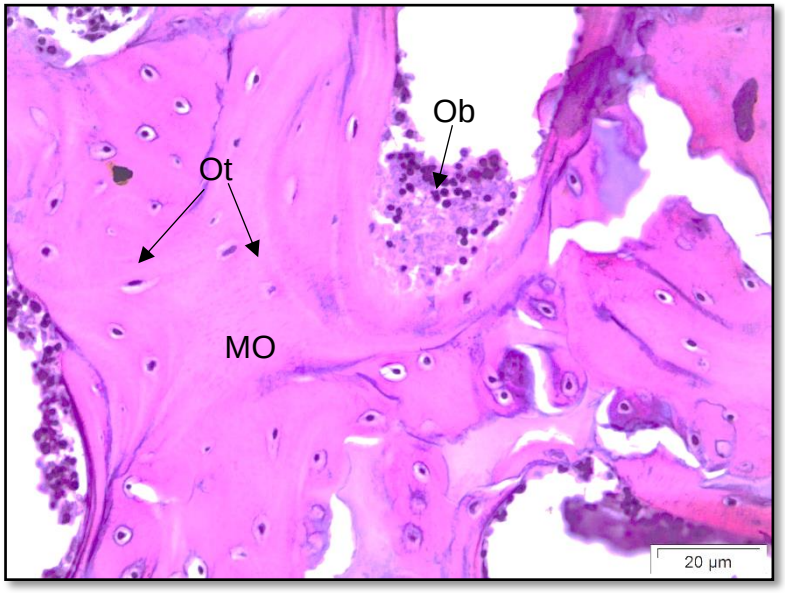


Figura 5. Fotomicrografia da epífise proximal de fêmur de poedeira (40x) corada com Hematoxilina-Eosina (HE). Osteócitos dentro das lacunas circundantes na matriz óssea (Ot); observamos também osteoblastos na superfície óssea (Ob). Fonte: Arquivo do Grupo de estudo em Análises Morfométricas Teciduais do Laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP/FCAV, Jaboticabal.

A função de reabsorção óssea pelos osteócitos não está bem definida e isto só é enfatizado devido ao espaço pericelular ser desprovido de fibrilas de colágeno e conter material viscoso provido de um produto de clivagem. Essa alteração observada pode ser explicada pela degradação enzimática do colágeno pelas metaloproteinases da matriz (MMP) segregadas por osteócitos (Ross e Pawlina, 2008).

As metaloproteinases da matriz são grupos importantes de proteinases neutras por estarem envolvidas no crescimento e remodelação óssea, são ativas em pH neutro onde requerem o íon Ca^{2+} para ativação e contém Zn^{2+} em seu local de ativo, devido as suas características estruturais e funcionais, as MMPs humanas são classificadas em pelo menos seis diferentes subfamílias intimamente relacionados: colagenases, colagenases tipo IV (gelatinases),

estromelisinas, matrilisinas, MMPs do tipo membrana (MTMMPs) e outras MMPs (Vu e Werb, 2000; Nijweide et al., 2002).

Contudo, Florencio-Silva et al. (2015) afirmaram que o recorrente interesse em conhecer os osteócitos é devido ao fato que essas células estão envolvidas na regulação estrutural e biomecânica das massas do tecido ósseo. Além disso, sabe-se que os osteócitos tem função endócrina, principalmente na produção do fator de crescimento fibroblástico-23 (FGF-23) e no controle da concentração de fósforo sérico. O fator de crescimento fibroblástico-23 atua nas principais funções fisiológicas como: promover a excreção do fosfato, inibindo os canais responsáveis pela sua reabsorção, e diminuir os níveis séricos da 1,25-dihidroxivitamina D, inibindo atividade das enzimas, 1α-hidroxilase e 24-hidroxilase (Oliveira e Moysés, 2010).

2.3.3 Osteoclastos

São células grandes e alongadas que se originam da fusão de células mononucleadas das células-tronco hematopoiéticas (monócitos) usando rotas vasculares para migrar para sítios esqueléticos, podendo assim ter mais de uma núcleo em sua estrutura óssea (Figura 6) sob influência de vários fatores como o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, secretado por células mesenquimais) e o ligante RANK-L (secretado por osteoblastos e osteócitos) onde juntos contribuem para a ativação de fatores de transcrição e expressão gênicas em osteoclastos (Sandy et al., 2002; Crockett et al., 2011; Florencio-Silva et al., 2015).

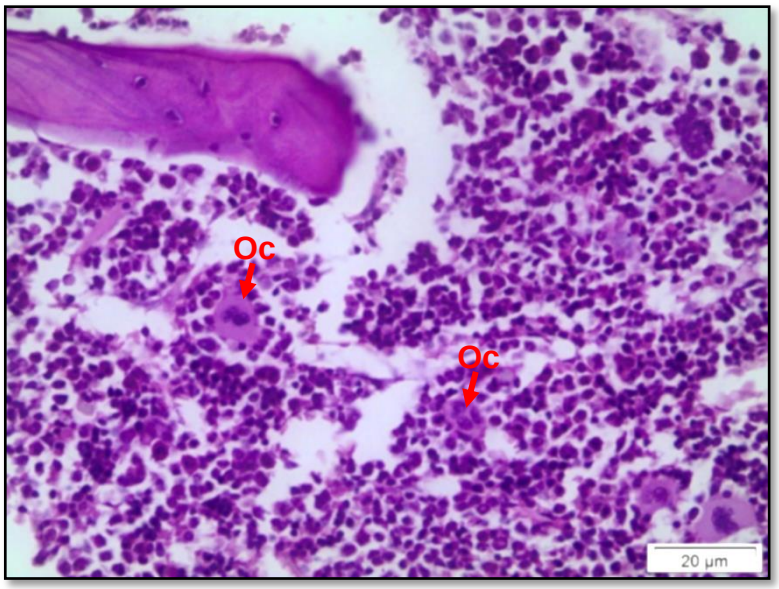


Figura 6. Fotomicrografia da epífise proximal de fêmur de poedeira (40x) corada em Hematoxilina-Eosina (HE). Osteoclastos (Oc) gigantes multinucleados ocupando as lacunas de Howship entre os osteoblastos (Ob).
Fonte: Arquivo do Grupo de estudo em Análises Morfométricas Teciduais do Laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal da UNESP/FCAV, Jaboticabal.

Os fatores de transcrição dos osteoclastos que possuem o ligante RANK-L (presente na superfície dos pré-osteoclastos) o qual é membro da família de receptores de fator de necrose tumoral (TNF) reconhecem o RANK-L através da interação célula-célula (RANK-L-RANK) com osteoblastos e as células estromais que se diferenciam em osteoclastos na presença de M-CSF. A interação que ocorre entre o RANK-L com o receptor ativador do kappa-β (RANK) ocasiona a maturação dos osteoclastos sendo um dos principais estimuladores da osteoclastogênese, ou seja, são essenciais para a maturação e ativação dos osteoclastos (Takahashi et al., 2002).

Além desses dois precursores para a diferenciação das células dos osteoclastos, as células osteoblásticas sintetizam uma proteína solúvel, a osteoprotegerina (OPGL) que tem afinidade com o receptor RANK, impedindo ou bloqueando a ligação entre o RANK-L e o receptor RANK, o que não é desejado, pois pode vir a regular a população de osteoclastos na matriz óssea, tendo consequência direta na reabsorção óssea (Takahashi et al., 2002; Judas et al., 2012).

Piper et al. (1992) afirmaram que os osteoclastos mononucleares e multinucleares podem reabsorver o osso, mas as células maiores parecem ser mais eficazes que as menores, embora não exista relação direta entre a capacidade de reabsorção e o número de núcleos. O número de núcleos nos osteoclastos também varia entre as espécies, sendo maior em aves do que em mamíferos (Väänänen e Zhao, 2002). Nas áreas de reabsorção óssea encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos que se apresentam em forma de cripta ou lacuna recebendo a designação de lacunas de Howship.

Durante o crescimento esquelético, ou seja, no osso jovem, os osteoclastos vão atuar na reabsorção da cartilagem calcificada modelando o osso em crescimento, devido à rápida formação de novos sistemas de Havers. Já no osso adulto, quando os discos epifisários se fecham e o crescimento máximo do osso foi alcançado e, que ao mesmo tempo são responsáveis pela reabsorção e remodelação óssea (Takahashi et al., 2002; Gartner e Hiatter, 2007).

O processo conhecido como reabsorção óssea que é acompanhado por mudanças drásticas na sua polarização é apresentado em quatro fases morfologicamente distintas:

1) Membrana basal – localizada mais distante na lacuna de Howship, contém a maior parte das organelas incluindo aparelho de Golgi, inúmeras mitocôndrias, lisossomos e múltiplos núcleos.
2) Borda pregueada – é parte em contato direto com o osso, ou seja, está envolvida diretamente com a reabsorção óssea. As pregas existentes em sua membrana plasmática formam estruturas do tipo microvilosidade que aumenta área de superfície para exocitose das enzimas hidrolíticas e secreção de prótons pelas bombas de próton ATP-dependentes, bem como pela endocitose dos produtos de degradação e resíduos ósseos. Nesta zona temos o compartimento subosteoclástico.
3) Borda enrugada (zona de vedação) – é a região que se dispõe ao redor da periferia da borda pregueada demarcando a área óssea a ser reabsorvida. Contém muitos filamentos de actina que estão dispostos em uma estrutura anelar (anel de actina) circundado por proteínas de ligação de actina como a vinculina e talina, ajudando os receptores das integrins (receptor de vitronectina - $\alpha_v\beta_3$, receptor

de colágeno - $\alpha_2\beta_1$, receptor - $\alpha_v\beta1$) da membrana plasmática da borda enrugada a manter contato com a periferia óssea da lacuna de Howship. A membrana plasmática está intimamente aplicada ao tecido ósseo formando uma zona de vedação do compartimento subosteoclástico. Para que o osteócito seja capaz de reabsorver o tecido ósseo, o anel de actina deve ser formado e essa formação é facilitada pelo OPG e, em seguida a borda pregueada é formada facilitando o processo de reabsorção.

4) Zona vesicular – é constituída por vesículas de endocitose e de exocitose que transportam enzimas lisossômicas e MMPs do compartimento subosteoclástico e os produtos de degradação óssea para dentro da célula.

2.3.3.1 Mecanismo de reabsorção óssea

A fase de reabsorção óssea ocorre concomitantemente à formação óssea, pois é necessária para que haja a renovação e manutenção tecidual, e este processo envolve ações de enzimas e proteínas específicas para que ocorra de modo adequado. Esta fase ocorre quando os osteoclastos param de funcionar e sofrem apoptose. Isso ocorre devido a diminuição do M-CSF e ao aumento da liberação de interferon-β e da OPG, resultando na diminuição da interação entre RANK-L-RANK, os quais são necessários para a osteoclastogênese (Iñiguez-Ariza e Clarke, 2015) (Figura 7).

Os osteoclastos reabsorvem o tecido ósseo ao liberar prótons e hidrolases lisossomais para dentro do microambiente adequado no espaço extracelular, isso ocorre porque as vesículas nos osteoclastos são compostas por lisossomos e, estes são liberados para o meio extracelular entre os prolongamentos citoplasmáticos da borda pregueada havendo atuação de enzimas lisossomais fora da célula. As enzimas hidrolíticas como a catepsina K (cisteína protease) e as metaloproteínases da matriz quando liberadas degradam o colágeno da matriz óssea (Ross e Pawline, 2007).

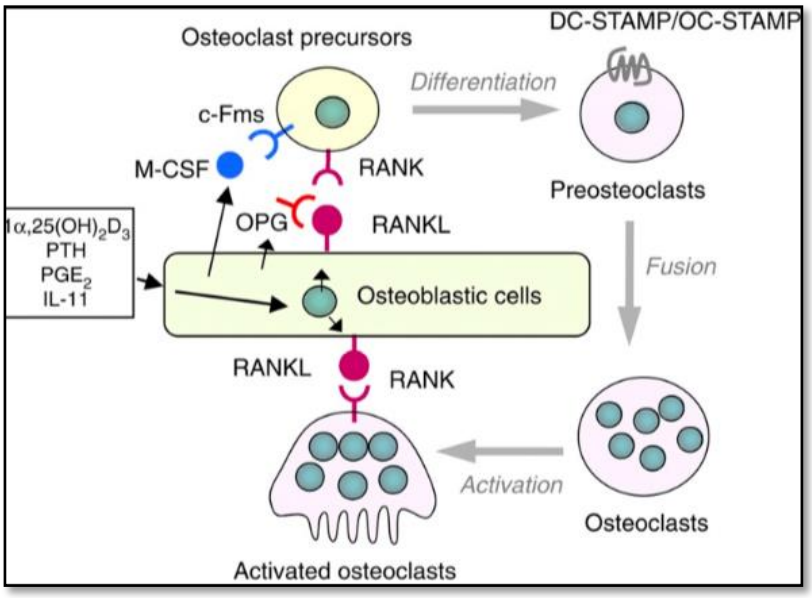


Figura 7. Esquema da diferenciação dos osteoclastos. Atuação dos fatores de crescimento e hormônios induzindo a expressão e interação entre RANK-L-RANK na célula precursora de osteoclasto maduro inicia a reabsorção da matriz com a liberação de catepsina K e íons H^+. As células osteoblásticas secretam OPGL, que inibe a interação RANK-L-RANK entre as células osteoblásticas e os precursores de osteoclastos. Os osteoclastos multinucleados expressam RANK, e RANK-L induzindo a atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos por meio da interação com RANK. Fonte: Takahashi et al. (2014).

Dentro dos osteoclastos a enzima anidrase carbônica II irá catalisa o ácido carbônico (H_2CO_3) a partir do dióxido de carbono e água, que posteriormente dissocia-se em íons de bicarbonato (HCO_3^-) e um próton (H^+). Com o auxílio da bomba de próton ATP-dependente, os prótons (H^+) da membrana plasmática da borda pregueada são transportados ativamente para o compartimento subosteoclástico gerando um pH ácido (4 a 5) no microambiente de reabsorção. O ambiente ácido inicia a degradação dos componentes minerais dos ossos, ou seja, ocorre a dissolução dos cristais de hidroxiapatita em íons de cálcio, fosfatos inorgânicos solúveis e água, quando absorção do tecido ósseo é completa, os osteoclastos sofrem apoptose, e os minerais liberados seguem para os capilares mais próximos (Gartner e Hiatt, 2007; Ross e Pawline, 2008) (Figura 8).

O bicarbonato e os íons Na^+ são transportados através da borda pregueada e penetram nos capilares mais próximos. O excesso de bicarbonato é removido pela troca passiva com íons cloreto através das proteínas permutadoras de

cloreto-carbonato localizadas na membrana basolateral (Gartner e Hiatt, 2007; Ross e Pawline, 2008).

A correlação clínica do mecanismo de reabsorção com uma deformidade óssea é a osteopetrose caracterizada como uma doença genética onde há um aumento da densidade óssea devido à decorrência da deficiência no processo de reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos.

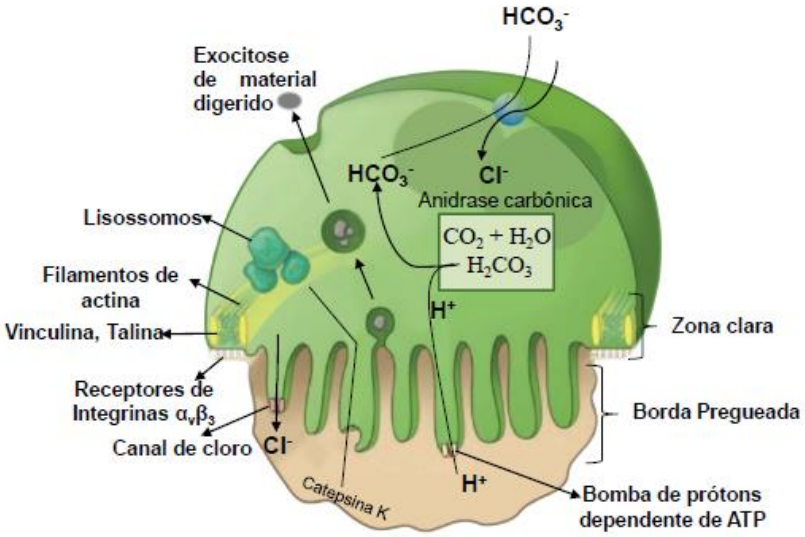


Figura 8. Esquema do processo de reabsorção óssea. Osteoclastos e suas respectivas regiões com presença de filamentos de actina circundada em ambos os lados pelas proteínas de ligação como a vinculina e talina. Na membrana plasmática no sítio da zona clara contém receptores de integrina.
Fonte: Histologia, texto e atlas – Ross e Pawline (2007).

Diante do exposto, fica claro a importância das ações das células ósseas sobre a dinâmica de desenvolvimento ósseo, e que suas alterações são controladas por fatores específicos, incluindo principalmente a idade do animal.

2.4 Desenvolvimento da cartilagem

O tecido cartilaginoso é uma forma de tecido conjuntivo especializado de consistência flexível, desempenhando funções como: suporte de tecidos moles, revestimento das superfícies articulares no intuito de minimizar o atrito entre os ossos e facilitar o deslizamento dos mesmos nas articulações, é essencial ao desenvolvimento do esqueleto fetal e crescimento dos ossos longos (Sandy et

al., 2020; Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013). Além disso, não possui vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, assim suas células cartilaginosas como as condrogênicas, os condroblastos e os condrócitos recebem nutrientes por difusão através da matriz cartilaginosa, a qual é composta por glicosaminoglicanos (GAG) e proteoglicanos intimamente associados às fibras colágenas e elásticas em meio à matriz extracelular (Gartner e Hiatt, 2007).

Assim, 95% do volume da cartilagem é constituído por matriz extracelular sendo este um elemento funcional ao tecido, pois contribui para elasticidade da cartilagem e sobrevivência dos condrócitos, além da grande proporção de glicosaminoglicanos que permite a difusão de substâncias entre os vasos sanguíneos no tecido conjuntivo e nos condrócitos dispersos na matriz mantendo a viabilidade do tecido. Os proteoglicanos são responsáveis por manterem a hidratação da matriz e por torna-la adaptada a suportar o peso, principalmente nos pontos de movimento como nas articulações sinoviais (Ross e Pawline, 2007).

Existem três tipos de cartilagens e cada uma com suas propriedades morfológicas e funções distintas, sendo diferenciadas com base nas características de sua matriz cartilaginosa como discutido mais adiante:

2.4.1 Cartilagem hialina

Essa cartilagem é caracterizada por apresentar matriz amorfa e homogênea que contém predominantemente colágeno fibrilar tipo II associado a agregados de glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico e glicoproteínas de adesão múltipla (Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013). A cartilagem hialina apresenta tonalidade cinza-azulada, semitransparente e flexível por isso é considerada um complexo tecido vivo, além de ser a mais abundante no corpo e a mais estudada, servindo como molde cartilaginoso de muitos ossos durante o desenvolvimento embrionário através da ossificação endocondral. A cartilagem hialina remanescente constitui as placas de crescimento epifisário (discos epifisários) e promove o crescimento dos ossos longos em diâmetro e pode ser dividida em quatro regiões anatômicas distintas: a zona de reserva, zona de proliferação; zona de maturação e zona hipertrófica.

A zona de reserva contem condrócitos dispersos e inativos; A zona de proliferação, é onde ocorre a maior parte da divisão de células precursoras de condrócitos. Novos condrócitos formam colunas de células que permitem a subdivisão da matriz em septo transversal ao longo da zona proliferativa, sendo que a morte de condrócitos ocorre na zona hipertrófica. Em aves de crescimento rápido, o tempo de vida dos condrócitos, desde seu nascimento (zona proliferativa) até sua morte (zona hipertrófica) é de aproximadamente 3 dias.

A zona de maturação é caracterizada por apresentar intensa síntese e secreção de matriz, onde temos a presença da fosfatase alcalina; A zona hipertrófica (superior e inferior) é onde os condrócitos sofrem degeneração, ou seja, ocorre a calcificação do tecido, uma vez que ocorre o depósito de fosfato de cálcio no interior das vesículas extracelulares que posteriormente extravasa e se infiltra nos interstícios do septo longitudinal (Pizauro Junior et al., 2017).

A cartilagem hialina é considerada como unidade esquelética nos anéis da traqueia e dos brônquios, na laringe, nas extremidades anteriores das costelas e nas superfícies articulares das articulações móveis do corpo (Junqueira e Carneiro, 2010; 2013). Desempenha importante papel na lubrificação das articulações sinoviais e distribuição das forças mecânicas aplicadas sobre o osso subjacente, com exceção da cartilagem articular, uma vez que essa não possui pericôndrio, sendo este responsável pelo crescimento e manutenção da cartilagem (Gartner e Hiatt, 2007; Ross e Pawline, 2007), tendo como principal função o revestimento das epífises dos ossos longos permitindo maior movimentação e por isso seu crescimento progressivo ocorre apenas de forma intersticial (Dyce et al., 2010).

A matriz da cartilagem hialina é altamente hidratada com o intuito de proporcionar a difusão de pequenos metabólicos e sua elasticidade, compreende de 60-80% do seu peso total de água intercelular, ligados firmemente a agrecanos de proteoglicanos como o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de queratana, conferindo-lhe elasticidade, cerca de 15% do peso total são atribuídas a moléculas de colágeno do tipo II o maior constituinte fibrilar (80%) e os tipos II, VI, IX, X e XI (5-15%) são encontrados em quantidades significativas apenas na matriz cartilaginosa como moléculas de colágenos cartilagem-específicas e, cerca de 3-5% é composta por células de condrócitos

na massa cartilaginosa total (Ross e Pawline, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013; Garter, 2017).

A constituição biológica da cartilagem hialina é associada a três tipos de células especificas como: as condrogênicas que tem sua origem através das células mesenquimais, apresenta núcleo ovoide, pequeno aparelho de Golgi e poucas mitocôndrias, essas células condrogênicas podem se diferenciar tanto em condroblastos como em células osteoprogenitoras (originando as células ósseas); as células de condroblastos que tem sua origem de duas formas: células mesenquimais e células condrogênicas, essas são arredondadas e basófilas, possuem um aparelho de Golgi bem desenvolvido, uma rica rede de retículo endoplasmático rugoso (REr) e numerosas mitocôndrias. Quando ocorre a transformação dos condroblastos em condrócitos os mesmos perdem organelas passando a conter gotículas lipídicas e agregados de glicogênio, que auxiliam sua fonte de energia (Ovalle e Nahirney, 2014).

Às células de condrócitos são as mais abundantes em meio a matriz da cartilagem hialina, sendo responsáveis por produzir e manter a matriz extracelular ativa e, encontradas na matriz de forma isolado (lacuna) ou em pares de quatro a seis células denominados grupos isogénos. Essas células se originam através de um único condroblasto (Junqueira e Carneiro, 2013; Garter, 2017). Alguns condrócitos são situados à periferia sendo mais achatados, enquanto que os que se localizam em zonas mais profundas observa-se mais arredondados (Ovalle e Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

O citoplasma do condrócito ativo contém muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso (REr) e um aparelho de Golgi bem desenvolvido indicando que a célula está ativa, e em continua síntese de matriz cartilaginosa. A produção de matriz cartilaginosa é mais intensa em jovens devido à alta atividade celular nesses animais. Nas células menos ativas do idoso, acontece o contrário: o número de mitocôndrias é reduzido e o aparelho de Golgi é reduzido de tamanho provocando baixa atividade celular o que ocasiona lento processo de renovação da cartilagem articular e baixa concentração de proteoglicanos sulfatados como a condroitina e rede de fibrilas de colágeno (Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013; Gartner, 2017). Contudo Gerber e Ferrara (2000) afirmaram que o período de vida de um condrócito é sincronizado no tempo e local em que sua atividade celular é requerida.

Estudos experimentais ao longo dos últimos anos, tem demostrado que a hipertrofia dos condrócitos é a etapa essencial para invasão vascular e, subsequente substituição da matriz calcificada por osso, sugerindo que a vascularização da metáfise é a etapa crucial na interação entre os processos de condrogênese (produção de cartilagem) e osteogênese (formação do tecido ósseo) principalmente durante o período de crescimento rápido dos ossos longos ou reparo de fraturas (Gerber e Ferrara, 2000). Mudanças nesse equilíbrio podem acarretar em doenças esqueléticas tais como osteoartrite, osteoporose e discondroplasia tibial (frangos de corte).

2.4.2 Cartilagem elástica

A cartilagem elástica é diferenciada por apresentar abundantes fibras elásticas (delicadas a grosseiras) ramificadas em sua matriz cartilaginosa e interpostas entre feixes de fibrilas de colágeno tipo II, proporcionando maior flexibilidade além de ser mais abundante em condrócitos em comparação com a cartilagem hialina (Gartner e Hiatt, 2007). Como a cartilagem hialina, a elástica apresenta pericôndrio e cresce principalmente por aposição e é menos sujeita a processos degenerativos (Junqueira e Carneiro, 2013).

Diferentemente da cartilagem hialina, que calcifica com o envelhecimento, a cartilagem elástica não se calcifica durante o processo de envelhecimento. É encontrada na orelha externa, nas paredes do meato acústico externo, na tuba auditiva e epiglote da laringe (Ross e Pawlina, 2008).

2.4.3 Fibrocartilagem

A fibrocartilagem é um tecido com características intermediárias entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina. A matriz extracelular contém espessas fibrilas de colágeno tipo I (característico da matriz do tecido conjuntivo) e colágeno tipo II (característico da cartilagem hialina) auxiliando nas respostas quanto alterações no ambiente externo, como as forças mecânicas, alterações nutricionais e níveis mutáveis de hormônios e fatores de crescimento.

Os condrócitos presentes na fibrocartilagem se origina de fibroblastos e estão dispersos entre as fibras de colágeno isolados, em fileiras e nos grupos exógenos (Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013). A fibrocartilagem está presente nos discos intervertebrais, na sínfise púbica, nos meniscos da articulação do joelho e no disco articulares da articulação temporomandibular (ATM) e em determinados locais de inserção de tendões nos ossos. Como a proporção dos tipos de colágenos pode variar, ressalta-se que os meniscos da articulação do joelho contêm pequena quantidade de colágeno tipo II, enquanto os discos intervertebrais contêm teores similares de colágeno tipo I e II. Essa variação de proporção de colágenos é modificada com a idade. Assim indivíduos idosos apresentam mais colágeno tipo II em consequência da atividade metabólica dos condrócitos (Ross e Pawlina, 2008).

2.5 Minerais e outros fatores que podem vir a influenciar a integridade óssea das poedeiras

Vários são os fatores que podem influenciar a integridade óssea das aves como sexo, genética, composição corporal, dieta, status hormonal, atividade física, instalações, manejo assim como a inter-relação dessas variáveis para que a dieta formulada possa garantir a necessidade dietética de elementos essenciais para a integridade óssea como cálcio, fósforo, magnésio e vitamina D (Emmans, 1987; Santos, 2008).

Neste contexto, a nutrição é relevante para manutenção da saúde do esqueleto, pois quando os minerais que constituem essa estrutura óssea não são fornecidos em quantidades adequadas na alimentação, a concentração destes será baixa nos tecidos, podendo ocasionar problemas ósseos, e principalmente na qualidade da casca do ovo durante o período de produção. Além disso, fatores não nutricionais como a genética e atividade física são fundamentais para formação estrutural e qualidade óssea (Lukic et al., 2009).

Os minerais apresentam funções importantes e variadas no organismo animal. Macrominerais, como o cálcio e o fósforo, constituem a base da formação esquelética, enquanto o sódio, cloro e potássio estão distribuídos em maiores concentrações nos tecidos moles, controlando o equilíbrio ácido-básico orgânico (Araújo et al., 2008).

A resistência e a dureza esquelética dependem da concentração adequada no fornecimento de cálcio na dieta. A mineralização óssea ocorre quando as concentrações plasmáticas de cálcio, assim como a sua relação com o fósforo, são ofertadas em concentrações normais para o atendimento das exigências nutricionais das aves. Além da função estrutural, o esqueleto atua como reservatório de cálcio, o qual pode ser utilizado para repor o cálcio extracelular em ocasiões que houver necessidade, como por exemplo, durante a formação da casca do ovo (Silva, 2014).

Aves jovens têm taxa de retenção de aproximadamente 60% do cálcio absorvido enquanto que, as aves mais velhas retêm apenas 40%. Essas aves possuem menor capacidade de absorção e mobilização de cálcio ósseo, ressaltando a importância de aumentar o nível de cálcio e reduzir o nível de fósforo da dieta no terço final do período de postura (Baião e Lúcio, 2005).

O cálcio é um nutriente essencial e um dos principais componentes do esqueleto, a sua quantidade óssea aumenta 30 a 40 vezes durante a maturação óssea. O crescimento e desenvolvimento ótimo do esqueleto requerem ingestão adequada de nutrientes, entre os quais o cálcio é considerado fator determinante para a densidade mineral óssea.

O fósforo atua de maneira antagônica ao cálcio, ou seja, níveis plasmáticos de fósforo acima do normal acarretam uma hipocalcemia, e consequentemente, maior secreção de paratormônio pelas glândulas paratireoides. Por outro lado, níveis plasmáticos de fósforo abaixo do normal provocam hipercalcemia e maior secreção de calcitonina pelas células parafoliculares da tireoide (Case et al., 1998; Santos, 2008).

Assim, ao formular a dieta é importante manter a relação cálcio:fósforo em equilíbrio. Segundo Vellasco et al. (2016) a relação ideal de Ca:P em dieta para poedeira leves de 24 a 40 semanas de idade é de 12,12:1, correspondendo a 3,7g/ave/dia de cálcio e 306mg/ave/dia de fósforo.

Riczu et al. (2004) avaliaram a qualidade óssea de poedeiras de ovos brancos (Shaver 2000) e ovos marrons (Shaver 579) ao final do ciclo de produção e, constataram que as poedeiras marrons apresentaram fêmures com comprimento semelhante ao das poedeiras de ovos brancos, entretanto, o peso e a resistência à quebra foram superiores. Segundo os autores, o motivo do maior peso do fêmur em aves de ovos marrons é devido a espessura total do

osso é maior nestas aves e sugere uma maior quantidade de tecido ósseo no mesmo comprimento, aumentando a sua densidade, consequentemente a sua resistência óssea.

Outro ponto que pode afetar a qualidade óssea das poedeiras é o aumento da densidade de alojamento uma vez que essas aves são alojadas em sistemas de gaiola, em que o espaço de locomoção é reduzido e a fragilidade óssea assim como a densidade mineral óssea tendo correlação negativa com o aumento da densidade de alojamento (Kun et al., 2009; Mendes et al., 2012).

2.6 Importância do cálcio nos programas de alimentação para poedeiras

A indústria avícola brasileira tem buscado programas nutricionais cada vez mais eficazes objetivando a redução dos custos e a minimização dos impactos ambientais advindos de excretas da produção animal (Souza e Vieites, 2014). E para isso é preciso conhecer o comportamento hormonal no organismo e assim saber como aquele nutriente provindo do alimento irá ser totalmente metabolizado, absorvido e utilizado pelo animal para a sua manutenção, crescimento e produção. Porém, para atingir bons índices econômicos relacionados à produção do setor avícola, é importante que haja o atendimento das exigências nutricionais desses animais, a fim de promover o seu máximo biológico com resultados positivos na economia do setor avícola brasileiro. Ou seja, o desempenho das aves depende, diretamente da qualidade dos ingredientes utilizados na dieta, de acordo com sua fase de crescimento e produção (Carvalho et al., 2016).

O crescimento corporal depende do desenvolvimento da muscular e ósseo. Assim os sistemas esqueléticos, muscular e adiposo das aves são constituídos sequencialmente, de tal modo que, o desenvolvimento animal, como um todo, atinja sua maturidade física, por isso é importante o adequado fornecimento de elementos minerais que contribuam com o crescimento e maturidade corporal (Souza e Vieites, 2014).

Os minerais constituem parte importante do organismo animal, com uma representação de 3% a 4% do peso vivo das aves, são considerados elementos essenciais para o desenvolvimento de todos os seres vivos, animais e vegetais. Os mesmos são classificados em macro e microminerais (elementos traços) (Camelo, 2016; Massuquetto et al., 2017).

Segundo Núñez et al. (2012) a importância do cálcio no suprimento energético das poedeiras consiste na sua atividade acerca das funções vitais, estruturais e, dentre demais incumbências, auxilia na formação do ovo, uma vez que compõe boa parte do peso da casca, auxiliando em sua qualidade externa e proteção do seu conteúdo interno. No entanto, a baixa rigidez óssea e disfunções esqueléticas, como a osteoporose, é uma realidade nas poedeiras modernas (Swiatkiewicz et al., 2015). Isso acontece devido o osso medular ser uma fonte lábil de cálcio podendo ser mobilizado durante a calcificação da casca do ovo, comprometendo a qualidade e disponibilidade deste mineral no osso (Whitehead, 2004).

Neste contexto, Butcher e Miles (2003) afirmaram que uma franga com 18 semanas de idade requer aumento do cálcio dietético, ou seja, a troca de ração conforme a fase de produção em que ave se encontra deve ser feita de forma rápida para evitar que haja a alta taxa de mortalidade, menor consumo de ração, menor tamanho de ovos devido à maior taxa de trinca e quebra de ovos devido a fragilidade do mesmo.

De acordo com Vellasco et al. (2016) o incremento na quantidade de cálcio na dieta de poedeiras influi diretamente no aporte de cálcio presente na casca do ovo. As quantidades de cálcio e fósforo requeridas na dieta para poedeiras comerciais tipo Lohmann White LSL na fase de pré-postura (18 semanas de idade) conforme recomendado pelo manual da linhagem, são 2,00% e 0,45% de cálcio e fósforo para um consumo de ração de 79 g/ave/dia, respectivamente. Dietas com níveis de cálcio insuficientes podem comprometer a espessura da casca e a resistência à ruptura, diminuir a produção de ovos e causar depleção de cálcio nos ossos, por consequência, desencadear fragilidade óssea (Manual de manejo Lohmann Brown-LITE e LSL-LITE, 2017).

Segundo Vargas Junior. et al. (2004) quando a concentração de cálcio no sangue reduz, há mobilização desse mineral para normalizar sua concentração sanguínea e manter sua homeostase por meio de ação hormonal. Esse fato ocorre fisiologicamente, pois ao fornecer níveis baixos de cálcio na ração ocasionará em maior síntese da proteína ligadora de cálcio aumentando assim a eficiência de absorção do mesmo, porém, ao contrário, maiores níveis de cálcio na ração reduz absorção do mesmo, comprovando que, sob baixa

disponibilidade, há maior eficiência de utilização desse mineral (Dell'Isola e Baião, 2001).

De acordo com Mazzuco (2006), o mecanismo de reabsorção óssea é particularmente importante para aves de postura devido à elevada exigência de cálcio para formação da casca durante a vida produtiva. O cálcio é obtido via circulação sanguínea, seguida de sua absorção via intestinal ou via reabsorção óssea, particularmente dos ossos medulares (tíbiotarso e úmero) ou sob algumas condições de deficiência de cálcio, também de ossos estruturais como o osso cortical.

Fica evidente com o exposto o quanto é importante a manipulação adequada de cálcio na dieta, além de sua associação com outros minerais, em especial, o fósforo, uma vez que estes constituem o esqueleto desde o início da vida até sua produção e manutenção, e como sua disponibilidade pode influenciar na formação e qualidade da casca do ovo.

2.7 Hormônios e metabolismo do cálcio no desenvolvimento ósseo

Os minerais desempenham importante papel na vida dos seres vivos, atuando como componentes estruturais de órgãos e tecidos do corpo e constituintes dos fluidos corporais na forma de eletrólitos envolvidos na manutenção da homeostase, catalisadores, reguladores de processos enzimáticos e hormonais (Massuquetto et al., 2017).

No organismo das aves o mais abundante é o cálcio, preponderante ao crescimento, uma vez que está relacionado diretamente com o desenvolvimento e mineralização óssea, sendo cerca de 98% presente no esqueleto na forma de hidroxiapatita ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$) e 2% se encontra em sua forma ionizada Ca^{2+} no fluido intra e extracelular desempenhando papéis importantes no metabolismo (Veum, 2010).

A manutenção da homeostase do cálcio é de fundamental importância fisiológica, metabólica e estrutural. Sua participação na cascata da coagulação, reações enzimáticas e na transmissão neuromuscular demostra a necessidade da manutenção de níveis plasmáticos normais (Santos, 2012). Além disso, há atuação de dois processos distintos que auxiliam na regulação da homeostase do Ca^{2+}, em que o primeiro realiza a regulação da troca do cálcio solúvel entre o

osso e o fluido extracelular, regulada pela ação do PTH e a vitamina D_3 sobre as células ósseas. O segundo processo auxilia na integridade mecânica do osso que é mantida por remodelação óssea que envolve a reabsorção do osso pelo os osteoclastos e formação do novo osso pelos osteoblastos (Pizauro Junior et al., 2017).

O osso medular, é responsável pela homeostase do Ca^{2+} no organismo das aves, o qual é caracterizado por sua organização aleatória das fibras colágenas em sua matriz que é mecanicamente mais fraca que os tipos ósseos estruturais. Sua formação é estimulada pela ação sinérgica dos hormônios sexuais (estrógeno e andrógeno responsáveis pela maturação dos folículos ovarianos). Durante o início da postura o osso medular se forma e continua acumulando lentamente durante todo o período da produção em substituição ao osso estrutural. A exemplo de osso medular temos o tibiotarso e o úmero, mas apenas o tibiotarso pode apresentar recuperação da densidade mineral óssea logo após o segundo ciclo de postura (Mazzuco, 2005).

Desta forma, destacamos a interação combinada de três órgãos na regulação da homeostase do cálcio, são: o trato gastrointestinal (TGI), os rins e o osso. De forma que, o TGI é a via primordial de absorção do cálcio dietético. O rim é responsável pela regulação plasmática do cálcio onde age como um regular para excretar via urina do cálcio em excesso no sangue. O osso funciona como o principal reservatório dinâmico de cálcio no organismo (Hoenderop et al., 2005).

O processo de absorção do cálcio é realizado por transporte ativo ao longo da porção distal do intestino delgado, principalmente no duodeno e jejuno, embora a taxa de absorção seja mais expressiva na porção proximal do intestino delgado, o principal local de absorção do cálcio dietético é na porção distal, devido ao seu maior comprimento acarretando em uma maior superfície de contato (Bar et al., 2003; Pizauro Junior et al., 2017). Posteriormente liberado na corrente sanguínea em sua forma ionizada (Ca^{2+}) ou ligado a compostos, entre eles proteínas e na forma de sais como o bicarbonato. Esse processo de absorção ocorre por meio de transportes ativo (entrada através da membrana da célula a favor do seu gradiente de concentração) e passivo (movimentação dos íons de cálcio para a circulação pelos espaços dos enterócitos contra o seu gradiente de concentração) e tudo depende de alguns fatores como: tipo de

ligação, forma no qual o mineral se encontra no alimento, idade e estado de desenvolvimento fisiológico que podem interferir na absorção deste mineral pelo organismo animal (Massuquetto et al., 2017).

No metabolismo do cálcio estão envolvidos três principais hormônios reguladores nas aves: o paratormônio (PTH), o qual encontra-se elevado durante o período da deposição de cálcio na casca do ovo e logo após a seu declínio), a calcitonina (sua secreção é regulada pelo o aumento no plasma dos níveis de cálcio da dieta) e 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-$(OH)_2D_3$). Esses hormônios auxiliam na regulação do cálcio, seja a nível plasmático, intestinal, renal e ósseo (Macari et al., 2005).

O PTH é secretado pelas glândulas paratireoides sendo um dos principais reguladores do metabolismo de cálcio e fósforo. Esse hormônio age diretamente sobre os rins através do processo de excreção renal do cálcio. Não fosse o efeito do PTH sobre os rins, a perda contínua de cálcio na urina provocaria significativa queda nos níveis sanguíneos e, em sequência, também nos ossos.

A calcitonina é um polipeptídio com 32 aminoácidos produzida pelas células parafoliculares ou células C da glândula ultimobranquial nas aves, que é incorporada pela tireoide durante o desenvolvimento *in ovo*. Quando essas glândulas secretam a calcitonina, a mesma tem como função reduzir a concentração de cálcio inibindo a sua reabsorção renal a partir do filtrado glomerular, resultando na excreção aumentada de cálcio (SILVA, 2014).

Além disso, a calcitonina inibe atividade dos osteoclastos e a absorção pelo TGI dos íons cálcio para o sangue (Massuquetto et al., 2017), diminuindo a desmineralização óssea e a reabsorção renal. Desta forma, a calcitonina estimula os osteoblastos a sintetizarem o cálcio extracelular e formar cristais de hidroxioapatita, que é o método de armazenamento desse mineral, do plasma para matriz óssea reduzindo a alta concentração do cálcio no plasma atingindo sua homeostase (Caetano et al., 2013).

Nas aves, a glândula uropigeana secreta a provitamina D_3, e nas penas é então convertida à sua forma ativa 1,25-dihidroxicolecalciferol. O metabólito da 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-$(OH)_2D_3$) é o maior controlador da absorção intestinal de cálcio. Os rins por sua vez sintetizam e secretam o 1,25-$(OH)_2D_3$ (Macari et al., 2005; Silva, 2014). Assim, o 1,25-$(OH)_2D_3$ regula a absorção intestinal de Ca^{2+} pela indução da transcrição de RNA e a síntese de proteínas

especificas, como a calbindina D_{28k}. Essa proteína tem sinergismo com o crescimento e a maturação do oviduto, bem como no transporte de Ca^{2+} no duodeno, no osso a calbindina D_{28k} é encontrada nos discos epifisários (Beck e Hansen, 2004; Macari et al., 2005).

Além desses efeitos, a vitamina D_3 exerce grande ação sobre o metabolismo ósseo além de regular a entrada de cálcio através da membrana celular, sua circulação na célula e saída pela membrana basolateral (Figueiredo Júnior et al., 2018). Poedeiras que recebem baixa concentração de vitamina D_3 na dieta podem apresentar reabsorção medular óssea ocasionando em osteoporose, principalmente em poedeiras mais velhas, enquanto que em aves de corte podem desenvolver osteodistrofia (Macari et al., 2005).

Além da vitamina D_3 que tem influência direta na regulação do cálcio no organismo e atua no metabolismo ósseo, outra vitamina que influencia sobre o desenvolvimento ósseo é a vitamina A. Quando em excesso (15.000 - 45.000 UI/kg) resultará em diminuição do crescimento e enfraquecimento ósseo das aves. Níveis altos de vitamina A na dieta, reduzem a expressão do mRNA da calbindina no tibiotarso, podendo assim haver uma interação antagônica entre a vitamina A e D (Gu et al. (2011).

Contudo, o cálcio que está presente na dieta será deglutido pela ave, passará pelo processo de digestão e posteriormente será absorvido por via intestinal, logo após entrar na corrente sanguínea para ser utilizado pelo organismo animal nos mais diversos fins. Esse processo de absorção intestinal é regulado pela ação de hormônios, onde a passagem do cálcio presente no lúmen do intestino delgado pela membrana do enterócito é facilitada pelo canal TRPV6 mediada pela 1,25-$(OH)_2D_3$, promovendo abertura deste canal na membrana e o aumento da síntese da proteína transportadora de cálcio (PTCa). Deste modo o cálcio é transportado do lúmen intestinal para o citosol. Essa proteína transportadora também é encontrada nos rins, atua na mobilização do cálcio do osso para o fluido extracelular, ocorrendo a partir de uma ação conjunta da 1,25-$(OH)_2D_3$ (forma ativa da vitamina D_3) e do paratormônio e na biossíntese de colágeno, principal componente da matriz extracelular do tecido ósseo (Souza e Vieites, 2014; Massuquetto et al., 2017).

O cálcio se liga à calbidina, proteína transportadora do cálcio do lúmen para o citosol a favor do seu gradiente de concentração. Uma vez dentro do

citoplasma da célula epitelial, o Ca^{2+} é ligado a uma proteína fixadora intracelular, a calmodulina, evitando que se formem sais insolúveis com o cálcio livre e os ânions intracelular. Posteriormente, o cálcio é transportado para fora da célula, através da membrana basolateral contra seu gradiente de concentração por proteínas de transporte ativo primário e pela enzima Ca-ATPase presente na membrana do enterócito (Massuquetto et al., 2017). De acordo com Neijat et al. (2011) e Zhang et al. (2012) o pico de retenção de cálcio ou sua capacidade de absorção máxima pelo intestino é por volta das 30 a 36 semanas de idade, e a máxima expressão do mRNA da proteína calmodulina é por volta das 32 semanas de idade.

Ao formular uma ração utilizam-se fontes para o fornecimento de cálcio como: farinha de ostras, farinha de carne e ossos, sendo o mais utilizado o calcário calcítico. Tendo em vista que sua composição apresenta cerca de 38% de cálcio, devemos nos atentar quanto à solubilidade desta fonte, pois pode vir a interferir na absorção do cálcio, uma vez que, é afetada pelas condições fisiológicas no intestino, especialmente devido ao pH (Hamdi et al., 2015).

A redução do pH aumenta a solubilidade da fonte, já que ela é solúvel em meio ácido e pode precipitar em meio alcalino na forma de hidróxido de cálcio, considerando que o pH do intestino é ácido, a utilização de uma fonte de alta solubilidade pode aumentar a capacidade de formação de complexos com ácido fítico e com os fosfatos que são solúveis e afetam a disponibilidade do cálcio, bem como de outros minerais como fósforo, zinco, cobre e manganês (Massuquetto et al., 2017).

Sabe-se que as aves são capazes de absorver o cálcio de forma mais eficiente quando são suplementadas com fontes que apresentam partículas maiores, isso devido ao maior tempo de retenção na moela, o que provoca liberação mais lenta do mineral, principalmente no período noturno (Massuquetto et al., 2017). Esse tipo de processo tem maior importância para as poedeiras comerciais, pois a retenção das partículas na moela durante a noite é essencial tanto para a formação da casca do ovo como para o preenchimento das reservas ósseas medulares (Whitehead, 2004).

A interferência no ganho de peso e no rendimento de carcaça pode acontecer se os níveis de cálcio e do fósforo estiverem desbalanceados, pois, nesta condição, a vitamina D_3, em sua forma ativa o 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-$(OH)_2$D3), compensaria este desequilíbrio, aumentando a absorção

intestinal e diminuindo a excreção renal, para garantir a homeostase desses minerais no organismo (Oliveira et al., 2015).

Garcia et al. (2013) e Guerra et al. (2014) mencionaram que existe importante relação entre a deficiência da vitamina D_3 e o aumento dos problemas ósseos em frangos de corte, uma vez que, com queda na absorção de cálcio ocasiona a desmineralização dos ossos e, consequente diminuição do teor de cinzas, cálcio, fósforo, queda na resistência óssea e aparecimento de problemas locomotores.

Todavia, devemos ter atenção quanto a relação cálcio:fósforo pois afeta absorção de ambos os minerais, pois altos níveis de cálcio na dieta aumentam o pH da digesta e afeta negativamente absorção do fósforo e de outros elementos minerais (Manangi e Coon, 2008). Desta forma, observa-se a relevância do PTH, calcitonina e a forma ativa da vitamina D_3 no metabolismo do cálcio, para que este mineral seja absorvido pelo organismo animal e utilizado pelas aves para a formação e integridade óssea.

2.8 Avaliação do desenvolvimento ósseo pela absortometria de raios-X de dupla energia

Para mensuração do desenvolvimento ósseo são utilizados dois métodos, o direto e o indireto. O método direto consiste na dissecação e análise química do material em estudo e, que apesar de sua elevada precisão na captação de dados, possui limitações técnico-cientificas, financeiras e éticas relacionadas ao seu uso. Os métodos indiretos são realizados com técnicas de imagem *in vivo,* como ressonância magnética por imagem, ultrassonografia, tomografia computadorizada entre outras. A principal vantagem está na possibilidade da não destruição do material avaliado, contudo, necessitam ser validados para maior acurácia dos resultados (Ribeiro, 2014; Costa e Silva et al., 2016).

Dentre os métodos indiretos pode se destacar o uso da absortometria de raios-X de dupla energia (DXA – Dual Energy X-Ray Absorptiometry) tecnologia essa considerada como método de referência na composição corporal e status do desenvolvimento ósseo (Heyward, 2001). A densitometria óssea é uma modalidade da radiologia que tem por finalidade avaliar a densidade mineral óssea de uma ou mais regiões anatômicas possibilitando dessa maneira, o

diagnóstico de possíveis doenças osteometabólicas, seja, em humanos ou animais, por meio da mensuração de dados fornecidos pelo DXA quanto à área analisada (cm^2), conteúdo mineral ósseo (CMO, g) e densidade mineral óssea (DMO, g/cm^2) com alta precisão e acurácia (Levis e Altman, 1998; Scholz et al., 2012; Lopes et al., 2017).

A avaliação da densitometria óssea utilizando o DXA iniciou-se a partir da década de 80, com pesquisas relacionadas a osteoporose em humanos, sendo útil no diagnóstico e acompanhamento das doenças que afetam a mineralização óssea (Hawker, 1996).

O modo de operação do DXA é devido ao aperfeiçoamento das tecnologias que o procedem, a absortometria de fóton único (Single Photon Absortiometry – SPA) e a absortometria de fóton duplo (Dual Photon Absortiometry – DPA) (Blake e Fogelman, 1997). Ou seja, o modo de ação é dado por meio de um feixe de luz de radiação em dois níveis de energia 70 e 140 mil elétrons-volt (KeV), permitindo estudar a massa óssea de regiões anatômicas de forma isolada ou de corpo inteiro, consequentemente melhorou a resolução da imagem capturada pelo software com o aumento da precisão do método e redução no tempo dos exames de 3 a 20 minutos dependendo do tamanho do animal, além da baixa emissão de radiação (Scholz et al., 2012; Pomar et al., 2017).

O princípio de funcionamento da dupla emissão de energia baseia-se no fato que a espessura do osso é a principal causa de maior atenuação dos feixes de energia em comparação com os outros tecidos do organismo, permitindo a quantificação da composição do osso e dos tecidos moles (carne magra e massa gorda) do material analisado (Levis e Altman, 1998; Szejnfeld e Heymann, 2003; Scholz et al., 2012; Scholz et al., 2015). Neste caso, a análise da composição corporal realizada pelo DXA se baseia na atenuação de raios-X de baixa (38 KeV) e alta (70KeV) energia em gorduras e outros tecidos (Gotfredsen et al., 1986; Mitchell et al., 1997).

Atualmente há três fabricantes comerciais de DXA: Lunar, Hologic, e Norland, que possuem diferenças técnicas em seus sistemas de software. O equipamento da Hologic, como o utilizado na presente pesquisa produz dois feixes de energia (alta e baixa) através de um sistema de impulso de comutação que alterna rapidamente a tensão do gerador de raios-X. Um detector situado no

braço de varrimento acima do paciente mede sequencialmente os raios-X atenuados que tenham passado através do material analisado.

Nos sistemas Lunar e Norland, os raios-X são produzidos por um gerador com potencial constante de raios-X e o feixe é dividido em regiões de alta e de baixa energia por um filtro de borda K. Os raios-X atenuados que passaram pelos tecidos são medidos por um detector discriminatório de energia. Em todos os três sistemas, a atenuação diferencial de dois níveis de energias é utilizada para estimar o teor de matéria mineral do osso e a composição do tecido mole, os feixes de energia de raios-X por um tecido depende da massa e da composição do tecido, para assim expressar a composição corporal do indivíduo em análise (Laskey e Phil,1996).

Independente do fabricante, a dose de radiação do exame varia de 1 a 3 microsievert (µSv) emitida pelo equipamento varia entre os instrumentos e modos de varredura, mas normalmente a exposição a essa radiação é muito baixa tanto para o operador como para o paciente não representado riscos à saúde, mesmo em animais maiores que demandam maior tempo de digitalização, a exposição à radiação emitida pelo equipamento em todo o exame é menor que a dose de radiação de um equipamento normal de raio-X que avalia somente a composição óssea (Lukaski et al., 1999; Scholz et al., 2015). A precisão de 1 a 2% para corpo inteiro e de 4 a 8% para uma região especifica (Szejnfeld e Heymann, 2003).

A densitometria óssea é reconhecidamente como o método não invasivo mais utilizado para avaliação no desenvolvimento ósseo, e tem sido recomendada como meio de triagem mais eficaz, principalmente no diagnóstico e acompanhamento de doenças que afetam a mineralização óssea em humanos (Hawker, 1996; Szejnfeld e Heymann, 2003). Auxiliando cada vez mais nas pesquisas para melhorar a qualidade da vida humana. Segundo Levis e Altman (1998), além do uso humano, o DXA também pode se estender para pequenos animais, se tornando método de referência para análise da composição em ratos Wister, cães e gatos devido à precisão do método.

O interesse da utilização do DXA em animais de produção se tornou tendência por possibilitar mensurar a variação da massa óssea e a relação entre os fatores cronológicos, fisiológicos, nutricionais e ambientais que o animal está exposto. Neste sentido, passou a ser considerado nas pesquisas do setor avícola

por se tratar de um método eficaz na mineralização óssea e composição corporal das aves comerciais, principalmente no que diz respeito à ética na experimentação animal, ao permitir a análise *in vivo,* sem eutanásia. Além disso, o mesmo animal pode ser analisado ao longo de seu crescimento, garantindo repetibilidade e a reprodutibilidade nos dados obtidos (Szejnfeld e Heymann, 2003; Hester et al., 2004; Araújo, 2009).

Para análise de poedeiras comerciais, há posicionamento da ave em decúbito ventral (posição utilizada no caso de aves) com pernas e asas estendidas, para não ocorrer a sobreposição de estrutura óssea, sobre a mesa do aparelho sendo digitalizada em linha reta, da cabeça aos pés (Figura 9-A). A fonte de raios de energia fica situada em um compartimento abaixo da mesa de digitalização com emissão direta sobre o animal. O tempo entre as análises e outra é em torno de 3 a 20 minutos, variação que se deve ao método de varredura selecionado que se enquadre, relacionado ao tamanho do animal avaliado (Laskey e Phil, 1996; Scholz et al., 2015). Dentre eles, há o *small animal* para animais com comprimento de 0 a 40 cm; *Infant Whole Body* animais com variação de 40 a 80 cm. No caso de análises em estruturas ósseas, o modo de varredura utilizado é o *Rat Whole Body*; o *Whole Body* para animais com mais de 80 cm em todo o seu comprimento. O animal é digitalizado e a imagem formada é observada na tela do computador conectado ao equipamento do DXA, para assim serem realizados os ajustes necessários e observações dos valores obtidos (Figura 9).

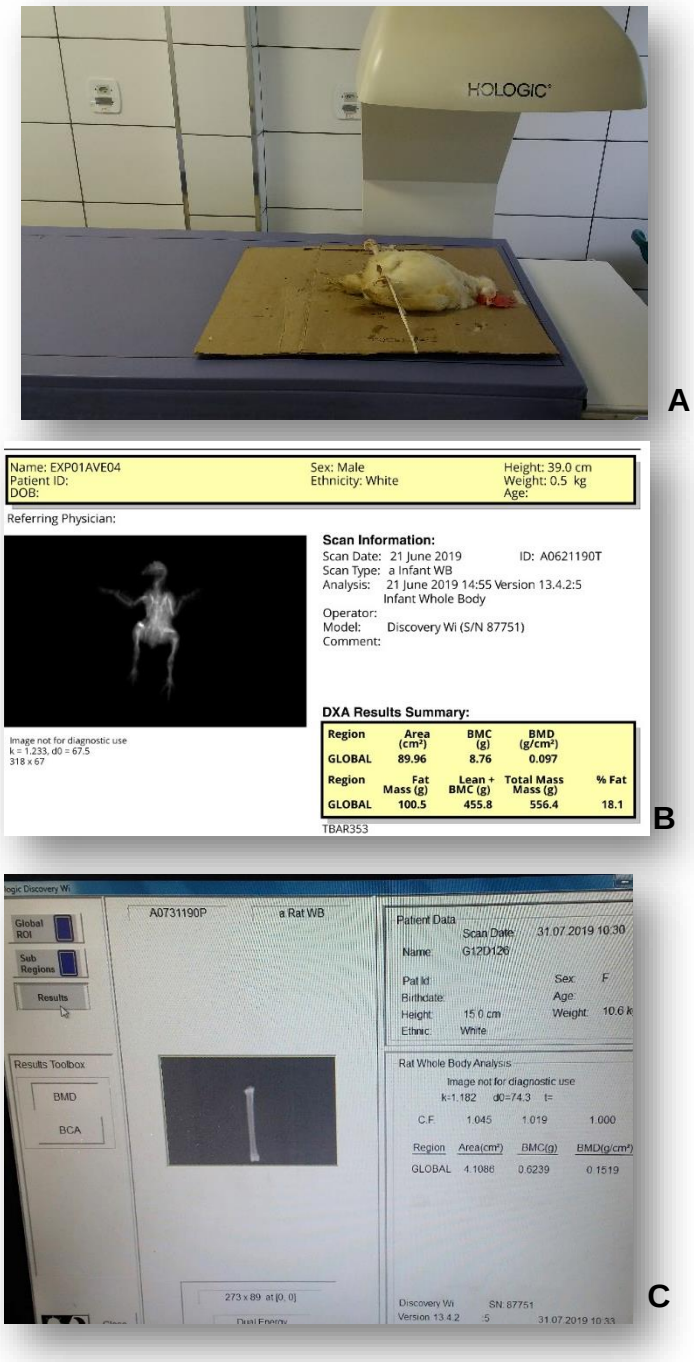


Figura 9. Procedimento de densitometria óssea em poedeira. Ave posicionada para captura da imagem de densitometria (A); Forma de apresentação dos dados no monitor após a captura das imagens (B); Imagem da captura de densitometria de um osso isolado (C).
Fonte: Veras, A. G. (2020).

O primeiro estudo em aves comerciais utilizando o DXA foi realizado por Mitchell et al., (1997) para avaliar a composição corporal de frangos de corte em

crescimento, posteriormente foram realizados mais estudos para mensuração da composição corporal e avalição do desenvolvimento ósseo.

Schreiweis et al. (2005) avaliaram a integridade óssea de poedeiras pelo método da densitometria óssea, observaram correlações positivas entre o BMC obtidos pelo DXA, resistência a quebra e o teor de cinzas ósseas o que indicou que o DXA pode ser ferramenta potencial para análise não invasiva da integridade esquelética das aves.

Além disso, Gonçalves et al. (2018) estudaram a composição corporal em frangos de corte (Cobb 500) de ambos os sexos e alimentados com 70%, 100% e 130% de proteína bruta no concentrado. Ademais, os autores relataram que o DXA subestimou o teor de cinzas ósseas, no qual a diferença entre o BMC e o teor de cinzas podem ser atribuídas ao fato do DXA levar em conta apenas o conteúdo mineral dos ossos, enquanto que, a análise química considera o teor de cinzas dos ossos e tecidos não ósseos, incluindo os órgãos, músculos e fígado, que têm um conteúdo mineral considerável (Speakman et al. 2001; Swennen et al. 2004).

Segundo Scolari (2007) ao verificar a integridade óssea de poedeiras comerciais durante o segundo ciclo de produção pelo uso do DXA, pode-se constatar que a perda da massa óssea tem grande contribuição ao problema da fragilidade óssea e está associada ao período de postura, quando há grande demanda de cálcio para formação dos ovos. O desenvolvimento desse trabalho mostrou que decréscimos na densidade óssea representam maior fragilidade óssea nessas aves. A pesquisa contribuiu para melhor entendimento da fisiologia do esqueleto em poedeiras e forneceu subsídios para melhoria da condição óssea das aves.

2.9 Curva de crescimento: Modelo Logístico

Do nascimento até a maturidade sabe-se que são várias as modificações ocorridas no animal, incluindo poedeiras, principalmente na deposição de tecido e desenvolvimento ósseo. E após cinco semanas de idade há o desenvolvimento dos músculos, e por último, órgãos reprodutivos (Silva et al., 2015). Desta forma, há a necessidade de acompanhar o crescimento corporal em função do tempo desde do nascimento até a maturidade, crescimento este

por meio de representação por curva sigmoide com um ponto de inflexão (Oliveira, 2016).

Neste contexto, faz-se o uso de modelos matemáticos entre outras funções de explicações biológicas para descrever o crescimento e desenvolvimento animal, permitindo uma análise mais precisa na tomada de estratégias que possibilite o melhor desempenho zootécnico (Santos, 2008).

Na produção animal, é comum o uso de modelos matemáticos não lineares (MMNL) para descrever funções biológicas, como por exemplo, o crescimento, pois possibilita relacionar o peso e a idade do animal, agrupando uma série de dados em um pequeno número de parâmetros, mostrando-se bastante útil, principalmente em pesquisa de melhoramento genético. As variáveis quantitativas são tomadas para representar fatores que influenciam o fenômeno, possibilitando melhor entendimento das respostas biológicas (Aggrey, 2002; Rondon et al., 2002; Silva et al., 2010) como as estimativas de taxas de crescimento, grau de maturidade e idade à maturidade (Laird e Howard, 1967).

Dentro dos modelos matemáticos não lineares (MMNL) temos os de modelos mistos, utilizados para dados longitudinais, como crescimento e idade. Seu uso é interessante devido à sua estrutura flexível de covariância e a sua capacidade de lidar com os dados desordenados, além das múltiplas fontes de heterogeneidade que esse modelo possui, uma vez que é possível a inclusão de efeitos aleatórios, ajustando os dados para melhor compreensão do pesquisador (Lindstron e Bates, 1990; Hall e Clutter, 2004).

De acordo com Gous et al. (1999) e Neme et al. (2006), os modelos de ajustes das curvas começaram a ser estudados devido as informações de crescimento e também dados adicionais sobre o desempenho das aves. Segundo os mesmos autores, diferentes curvas de crescimento podem influenciar na composição corporal em toda a fase de criação, tendo importante papel na maturidade fisiológica e sexual das aves de postura, além de possibilitar a inserção destes animais em programas de melhoramento genético.

Contudo Fitzhugh Jr. e Taylon (1971) e Marcato et al. (2010) afirmaram que, a escolha do modelo que melhor se ajuste aos dados em estudo se baseia na análise de, no mínimo, três itens importantes: a possibilidade de intepretação biológica dos parâmetros, qualidade do ajuste e dificuldades computacionais.

Sendo assim, o uso de metodologias que auxiliem na comparação como a variância residual total, função da máxima verossimilhança (log), critério de informação Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC), uma vez que quanto menores são os valores para estas variáveis melhor o ajuste e qualidade dos modelos (El Faro e Albuquerque, 2003).

Para os modelos matemáticos não lineares (MMNL) utilizados para descrição do crescimento animal em função da idade podemos destacar o de Brody (1945), Von Bertanlaffy (1957), Richards (1959) e o de Gompertz (1825), pois estes apresentam parâmetros de interpretação biológica, como taxa de crescimento, taxa de ganho diário e peso adulto, possibilitando um padrão de respostas de tratamentos ao longo do tempo (Marcato et al., 2010; Silveira, 2011).

O modelo logístico foi primeiramente proposto e estudado por Verhulst (1838) em estudos para expressar o crescimento de populações humanas. Logo após, Nelder (1961) foi o pioneiro no uso da função logística em espécies animais descrevendo o crescimento de mamíferos e até mesmo de plantas e células de levedura pelo fato deste modelo apresentar pontos fixos de inflexão. A equação é dada por:

$$Y = \frac{L}{[1 + \exp^{-k\,(X - X*)}]}$$

[Eq. 1]

onde temos: Y é a medição correspondente (de peso) no tempo X (dias); L é o peso à maturidade (kg ou g); exp = 2,71828 (base do logaritmo neperiano); k taxa de crescimento por dia; X é a idade da ave (dia); X^* é idade em que a taxa de crescimento é máxima, ponto de inflexão da curva (dia).

O ponto de inflexão representa o exato momento em que a curva de crescimento é alterada de côncavo para convexo (modo de convexidade) como reportado por Longo (2000) e Kessler et al. (2000).

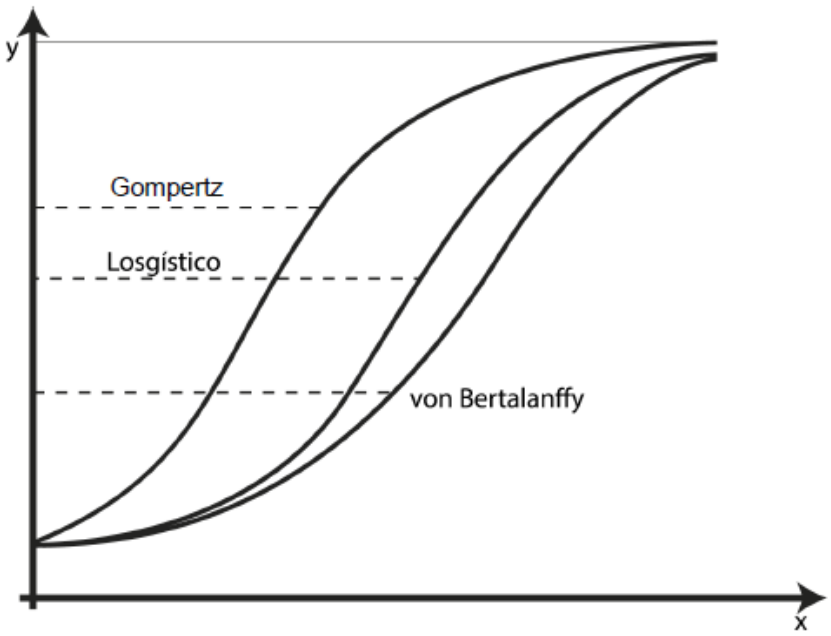


Figura 10. Crescimento em função do tempo com um ponto de inflexão.
Fonte: Veras, A. G. (2020).

Desta forma, podemos predizer a qual idade o animal atinge o máximo crescimento e a taxa diária de crescimento. Neste contexto, qualquer um dos parâmetros da função logístico pode causar uma mudança na trajetória da curva, ou seja, valores diferentes do parâmetro “L” obtêm-se distintos pontos de assíntota do peso ou crescimento ósseo. No entanto, a variação no parâmetro “k” faz com que a curva se arraste ao longo do eixo da idade. Neste caso, valores superiores de k concentram o crescimento em torno do ponto de inflexão, ocasionando um crescimento inicial e final mais lento, do contrário, valor menor de k faz com que o crescimento seja mais distribuído ao longo do tempo.

Drumond et al. (2013) trabalharam com modelos não lineares para descrever o crescimento de codornas de corte de ambos os sexos do nascimento ao 42º dia de idade, observaram que, o menor valor para o índice assintótico (IA) foram correspondentes para os modelos de Gompertz em machos (26,57%) e o Logístico para fêmeas (25,02%). Os valores para o desvio médio absoluto (DMA) tanto para machos (26,77%) como para fêmeas (34,56%) foram menores no modelo logístico, indicando segundo o DMA serem estes modelos os melhores para descrever o padrão de crescimento de codornas de corte.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal (2019) **Relatório Anual.** Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em 03 jan. 2020.

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal (2020) **Relatório Anual.** Disponível em: <http://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em 03 jun. 2020.

Aggrey SE. (2002) Comparison of three nonlinear and spline regression models for describing chicken growth curves. **Poultry Science,** 81:1782-1788.

Almeida Paz ICL, Mendes AA, Balog A, Komiyama CM, Takahashi SE, Almeida ICL, Garcia EA, Vulcano LC, Ballarin AW, Silva MC, Cardoso KFG (2009) Efeito do cálcio na qualidade óssea e ovos de poedeiras. **Archivos de Zootecnia,** 58:173-183.

ANUALPEC, 2019. Anuário da Pecuária Brasileira (2019). São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p. 280.

Araújo CSS, Artoni SMB, Araújo LF, Junqueira OM, Louzada MJQ, Oliveira D (2006) Densidade óssea de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de aminoácidos e cálcio durante a fase final de criação. **Acta Scientiarum Animal Science,** 28:203-208.

Araújo JA (2009) **Fornecimento e granulometria do calcário na alimentação de poedeiras durante a estação quente**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal da Paraíba- UFPB, Areia/PB.

Araújo JA, Silva JHV, Amâncio ALL, Lima CB. Oliveira ERA (2008) Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2:53-60.

Baêta FC, Souza CF (2010) **Ambiência em edificações rurais, conforto animal***.* Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 269.

Baião NC, Lúcio CG (2005) Nutrição de matrizes pesadas. In: Macari M, Gonzáles E. **Manejo de matrizes de corte.** Campinas: Facta, 2005, p. 197-216.

Bar A, Shinder D, Yosefi S, Vax E, Plavnik I (2003) Metabolismo and requirements for calcium and phosphorus in the fast-growing chicken as affected by age. **British Journal of Nutrition,** 89:51-60.

Barreiro FR, Sagula AL, Junqueira OM, Pereira GT, Baraldi-Artoni SM (2009) Densitometric and biochemical values of broiler tibiotarsos at diferente ages. **Poultry Science,** 88:2644–2648.

Beck MM, Hansen KK (2004) Role of entrogen in Avian osteoporosis. **Poultry Science,** 83:200-206.

Blake GM, Fogelman I (1997) Technical principles of dual energy X-ray absorptometry. **Seminars in Nuclear Medicine,** 210-228.

Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, Delmas PD (2008) The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. **Bone,** 43: 532–538.

Boivin G, Meunier PJ (2002) The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. **Calcified Tissue International,** 70:503–511.

Brody S (1945) Bioenergetics and growth, with special reference to the efficiency complex in domestic animals. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine,** 73:377.

Buo AM, Stains JP (2014) Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. **FEBS Letters,** 588:1315–1321.

Caetano AR, Osowski A, Delfino R (2013) **Metabolismo do cálcio, magnésio, manganês e fósforo para animais de produção e companhia.** Disponível em: <http://rosivaldounir.blogspot.com/2013/10/metabolismo-do-calcio-magnesio-manganes.html>. Acesso em: 16 de nov. 2019.

Camelo A (2016) **A importância do cálcio e fósforo na dieta de poedeiras.** Disponível em:<http://www.agroceresmultimix.com.br/blog/calcio-e-fosforo/>. Acesso em: 15 de nov. 2019.

Camelo LCL, Lana GRQ, Santos MJB, Camelo YARP, Marinho AL, Rabello CBV (2015) Inclusão de farelo de goiaba na dieta de codornas européias. **Ciência Animal Brasileira,** 16:343-349.

Capulli M, Paone R, Rucci N (2014) Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** 561:3–12.

Carvalho LSS, Vilela DR, Fagundes NS, Souza YL, Fernades EA (2016) Qualidade de ovos e desempenho produtivo de poedeiras em segundo ciclo de postura alimentadas com microminerais quelatados a aminoácidos. **Ciência Animal Brasileira,** 17:91-500.

Case LP, Carey DP, Hirakama DA (1998) **Nutrição canina e felina: manual para profissionais.** 2ed, Lisboa:Harcount Brace, p. 424.

Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology,** 3:131-139.

Clarke Anderson HMD (2003) Matrix vesicles and calcification. **Current Rheumatology Reports,** 5:222–226.

Costa e Silva LF, Valadares Filho SC, Rotta PP, Marcondes MI, Fonseca e Silva F, Paulino MF, Gionbelli MP, Chizzotti ML (2016) Predição da composição corporal e da carcaça de bovinos de corte. In: Valadares Filho SC, Costa e Silva LF, Gionbelli MP, Rotta PP, Marcondes MI, Chizzotti ML, Prados LF (Eds) **Exigências nutricionais de zabuínos e cruzados de corte.** Viçosa: UFV, p. 327.

Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, HELFRICH MH (2011) New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANK-L axis. **Osteoporosis International,** 22:1–20.

Currey JD (2003) The many adaptations of bone. **Journal of Biomechanics,** 36:1487–1495.

Dacke CG, Arkle S, Cook DJ, Wormstone IM, Jones S, Zaidi M, Bascal ZA (1993) Medullary Bone and Avian Calcium Regulation. **Journal of Experimental Biology** 88:63–88.

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: Na endocrine cell and more. **Endocrine Reviews,** 34:1-34.

Damoulis PD, Hauschka V (1997) Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblastos. **Journal of Bone and Mineral Research,** 12:412–422.

Dekalb. Products. Copyright Institut de Sélection Animale BV (2020) Disponível em:<https://www.dekalb-poultry.com/pt-br/products-pt-br/dekalb-white-pt-br/>. Acesso em: 06 jan. 2020.

Dell'Isola ATP, Baião NC (2001) Cálcio e fósforo para galinhas poedeiras-Avicultura. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, (34):65-92.

Drumond ESC, Gonçalves FM, Veloso RC, Amaral JM, Balotin LV, Pires AV, Moreira J (2013) Curvas de crescimento para codornas de corte. **Ciência Rural,** 43:1872-1877.

Dyce KM, Sack WO, Wensing JG (2010) **Tratado de Anatomia Veterinária.** 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 872.

El Faro L, Albuquerque LG (2003) Utilização de modelos de regressão aleatória para produção de leite no dia do controle, com diferentes estruturas de variâncias residuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, 32:104-1113.

Embrapa Suínos e Aves. **Central de Inteligência de Aves e Suíno, Estatística e Desempenho da Produção** (2019) Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 02 jan. 2020.

Emmaans GC (1987) Growth, body composition and feed inteke. **Word's Poultry Science Journal,** 43:208–227.

Fernandes MNS (2012) Principais problemas locomotores na avicultura industrial. **PUBVET**, 6:1-20, Art. 1369.

Figueiredo Júnior JP, Costa FGP, Givisiez PEN, Santana MHM, Santos EG (2018) Transportadores de cálcio e fósforo em aves de postura. **Ciências Exatas e da terra e Ciências Agrárias,** 13:70-81 (Artigo de Revisão).

Fitzhugh JRHA, Taylon STCS (1971) Genetic analysis of degree of maturity. **Journal of Animal Science**, 33:717- 725.

Fleming RH, McCormack HA, McTeir L, Whitehead CC (2006) Relationships between genetic, environment and nutritional factors influencing osteoporosis in laying hens. **British Poultry Science,** 47:742-755.

Fleury, Doenças osteometabólicas - Densitometria óssea (2020). Disponível em:<https://www.fleury.com.br/medico/manuais-diagnosticos/doenas-osteometablicas/densitometria-osteometabolica>. Acesso em: 20 de jun. 2020.

Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015) Biology of bone tissue: structure, function and factors that inflence bone cells. **BioMed Research International,** 1-17.

Fornari MB (2012) **Investigação de polimorfismos em genes associados ao desenvolvimento ósseo como marcadores moleculares para características de integridade óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte.** 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná.

Garcia AFQM, Murakami AE, Duarte CRA, Ospina-Rojas CO, Picoli KP, Puzotti MM (2013) Use of vitamin D3 and Its metabolites in broiler chicken feed on performance, bone parameters and meat quality. **Journal of Animal Sciences,** 26:408-415.

Gartner L (2017) **Tratado de Histologia.** 4 ed. Brasil: Elsevier Editora Ltda.

Gartner LP, Hiatt JL (2007) **Cartilagem e Tecido ósseo.** In. **Tratado de histologia em cores.** 3Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, p. 133-159.

Gerber HP, Ferrara N (2000) Angiogenesis and bone growth. **Trends in Cardiovascular Medicine,** Kidlington, 10:223-238.

Gonçalves CA, Sakomura NK, Silva EP, Artoni SMB, Suzuki RM, Gous RM (2018) Dual energy X-ray absorptiometry is a valid tool for assessing in vivo body composition of broilers. **Animal Production Science,** 1-8.

Gotfredsen A, Jensen J, Borg J and Christiansen C (1986) Measurement of lean body mass and total body fat using dual photon absorptiometry. **Metabolism** 35:88–93.

Gous RM, Moran JrET, Stilborn HR, Bradford GD, Emmans GC (1999) Evaluation of the parameters needed to describe the overall growth, the chemical growth, and the growth of feathers and breast muscles of broilers. **Poultry Science**, 78:812–821.

Gompertz B (1825) On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencie. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, 115: 513-583.

Guerra GAFQ, Murakami AE, Santos TC, Eyng C, Picoli KP, Ospina-Rojas IC (2014) Utilização da vitamina D3 e seus metabólitos na alimentação de frangos de corte sobre parâmetros imunológicos e morfometria intestinal. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** 34:477–484.

Guo X, Yan S, Shi B, Feng Y (2011) Effect of excessive vitamin A on alkaline phosphatase activity and concentrations of calcium-binding protein and bone Gla-protein in culture medium and CaBP mRNA expression in osteoblasts of broiler chickens. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 24:239-245.

Hall DB, Clutter M (2004) Multivariete multilevel nonlinear mixed effects models for timber yield predictions. **Biometrics,** 60:16-24.

Hamdi M, Sol'a-Oriol R, Davi R, Perez JF (2015) Calcium sources and their interaction with the different levels of non-phytate phosphorus affect performance and bone mineralization in broiler chickens. **Poultry Science,** (94):2136-2143.

Hawker GA (1996) The epidemiology of osteoporosis. **The Jounal of Rheumatology,** (suplem. 45), 2-5.

Hester PY, Schreiweis MA, Orban JI, Mazzuco H, Kopka MN, Ledur MC, Moody DE (2004) Assessing bone mineral density in vivo: dual energy X-ray absorptiometry. **Poultry Science**, 83:215-221.

Heyward V (2001) Methods recommendation: body composition assessment. **Jornal of Exercise Physiology,** 4:1-10.

Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM (2005) Calcium absorption across epithelia. **Physiological Reviews**, 85:373-422.

Hruby M, Hamre ML, Coon CN (1996) Non-linear and linear functions in body protein growth. **Journal of Applied Poultry Research**, 5:09–115.

InfoLomann, Novo Guia de Manejo. Circulação Nacional Gratuita (2017). 6. Ed. 1-12.

Iñguez-Ariza NM, Clarke BL (2015) Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas,** 82:1-11.

Judas F, Palma P, Falacho RI, Figueiredo H (2012) **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo.** (Informativo) Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/235352308 > Acesso em: 25 jan. 2020.

Junqueira LC, Carneiro J (1990) **Tecido Ósseo.** In: Junqueira LC, Carneiro J (1990) **Histologia básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, p. 101-119.

Junqueira LC, Carneiro J (2010) **Histologia básica: texto e atlas.** 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam.

Junqueira LC, Carneiro J (2013) **Tecido Ósseo.** In: Junqueira LC, Carneiro J (2013) **Histologia básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, p. 132-148.

Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM (2010) miR-29 modulatesWnt signaling in human osteoblastos through a positive feedback loop. **The Journal of Biological Chemistry,** 285:25221–25231.

Kessler AM, Snizek PN, Brugalli I (2000) Manipulação da quantidade de gordura na carcaça de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000. 107-133p.

Korver DR, Saunders-Blases JL, Nadeau KL (2004) Assessing bone mineral density in vivo: quantitative computed tomography. **Poultry Science,** 83:222-229.

Kun Z, Uluocak NA, Karaman M (2009) The influence of some factors on carcass defects during fattening period in broilers. **Archivos de Zootecnia,** 58:117-120.

Laird AK, Howard A (1967) Growth curves in inbred mice. **Nature Publishing Group,** p.786-788. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/213786a0> Acesso em: 14 fev. 2020.

Laskey MA, PHIL D (1996) Dual-Energy X-ray absorptiometry and body composition. **Nutrition**., 12:45-51.

Levis S, Altman R (1998) Bone densitometry. **Arthritis Rheumatology,** (41):577-587.

Lindstrom ML, Bates DM (1990) Nonlinear mixed effects models for repeated measure data. **Biometrics,** 46:673-687.

Longo FA (2000) **Estudo do metabolismo energético e do crescimento de frangos de corte**. 76 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - UNESP, Jaboticabal.

Lopes HA, Silva CN, Pinto OC, Marques G, Cartagenes N, Soares WDB (2017) Densitometria Óssea. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. 13:428-433.

Lukic M, Pavlovski Z, Skrbic Z (2009) Mineral nutrition of modern poultry genotypes. **Biotechnology in Animal Husbandry,** 25:399-409.

Macari M, Furlan RL, Malbeiros RD (2005) Endocrinologia de matrizes pesadas. In: Macari M, Mendes AA. **Manejo de Matrizes de corte.** 1ed, Campinas-FACTA, p. 57-73.

Manangi MK, Coon CN (2008) Phytate Phosphorus Hydrolysis in Broilers in Response to Dietary Phytase, Calcium, and Phosphorus Concentrations. **Poultry Science,** (87):1577-1586.

Manual de manejo Lohmann Brawn-LITE (2017) Lohmann do Brasil. Disponível em:<https://ltz.com.br/guia-manejo>. Acesso em: 06 jan. 2020.

Manual de Manejo das Poedeiras Dekalb White (2009) Granja Planalto LTDA. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/zootecnia/NILVAKAZUESAKOMURA/manual_dekalb_white.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2020.

Marcato SM, Sakomura NK, Fernandes JBK, Siqueira JC, Dourado LR, Freitas ER (2010) Cresciemnto e deposição de nutrientes nos órgãos de frangos de corte de duas linhagens coemrciais. **Revista Brasileira de Zootecnia,** 39:1082-1091.

Marks JrSC, Popoff SN (1988) Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. **American Journal of Anatomy,** 183:1–44.

Massuquetto A, Maiorka A, Macari M (2017) **Absorção de minerais.** In: Macari M, Maiorka A. **Fisiologia das aves comerciais.** Jaboticabal:Funep, 322-338p.

Matsuo K, Irie N (2008) Osteoclast-osteoblast communication. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** 473:201– 209.

Mazzuco H, Hester PY (2005) The effect of na induced molt and a second cucle of lay on skeletal integrity of White leghorns. **Poultry Science,** 84:771-781.

Mazzuco H (2005) Osteoporose em poedeiras comerciais: Uma doença metabólica multifatorial. **Circular Técnica 43,** Concórdia-SC, out. ISSN 0102-3713.

Mazzuco H (2006) Integridade óssea em poedeiras comerciais: influência de dietas enriquecidas com ácidos graxos poli saturados e tipo de muda induzida. **Circular Técnica**, 47, Concórdia: EMBRAPA, CNPSA.

Mendes AS, Paixão SJA, Marostega JB, Restelatto RC, Oliveira PAV, Possenti JCA (2012) Mensuração de problemas locomotores e de lesões no coxim plantar em frangos de corte. **Archivos de Zootecnia** 61:217–228.

Mitchell AD, Rosebrough RW and Conway JM (1997) Body composition analysis of chickens by dual energy x-ray absorptiometry. **Poultry Science,** 76:1746-1752.

Molnár A, Maertens L, Ampe B, Buyse J, Zoons J, Delezie E (2018) Effect of different Split-feeding treatments on performance, egg quality, and bone quality of individually housed aged laying hens. **Poultry Science,** 97:88-101.

Neijat M, House JD, Guenter W, Kebreab E (2011) Calcium and phosphorus dynamics in commercial laying hens housed in conventional or enriched systems. **Poultry Science,** 90:2383-2396.

Neijat M, Casey-Trott TM, Robinson S, Widowski TM, Kiarie E (2019) Effects of rearing and adult laying housing systems on medullary, pneumatic and radius boné atributes in 73-wk old Lohmann LSL lite hens. **Poultry Science,** 98:2840-2845.

Nijweide PJ, Burger EH, Klein-Nulend J (2002) **The Osteocyte.** In: Bilezikian JP, raisz LG, Rodan GA (2002) **Principles of bone biology.** 2ed. Academic Press, p. 3-15.

Nelder JA (1961) The fitting of a generalization of the logistic curve. **Biometrics,** 17:89-110.

Neme R, Sakomura NK, Fukayama EH, Freitas ER, Fialho FB, Resende KT, Fernandes JBK (2006) Curvas de cresciemnto e de deposição dos componentes corporais em aves de postura de diferentes linhagens. **Revista Brasileira de Zootecnia,** 35:1091-1100.

Núñez R, Carballada F, Boquete M (2012) Two flushing-like reaction cases from calcium pidolate who tolerated calcium carbonete. **Allegologia et immunopathologia,** 40:318.

Oliveira DR, Del Carlos RJ, Viloria M, Galvão SRMA, Filgueiras R (2000) Matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena no preenchimento de falhas segmentares em rádio de coelhos. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.1, 89p. **Suplemento**

Oliveira RB, Moysés RMA (2010) FGF-23: estado de arte. **Brazilian Journal Nefrology,** 32:323-331.

Oliveira RG, Pinheiro SRF, Castro MR, Abreu LRA, Pires AV, Vieira DJ, Mota LFM, Miranda JA, Rocha GMF, Costa LS (2016) Dietary digestible lysine in free-range broiler chickens during the growth phase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 68:733-738.

Oliveira RP, Santos ET, Sgavioli S, Gracia RG, Baraldi-Artoni SM, Faria DE (2015) Níveis de vitamina D sobre o desempenho e desenvolvimento ósseo de linhagens de frangos de corte. **Ars Veterinaria,** 31:001–006.

Ovalle W, Nahirney PC (2014) **Netter Bases da Histologia.** 2 ed. Brasil: Elsevier Editora Ltda, 33-138 e 140-150p.

Ovosite, Consumo Per Capita de Ovos no Brasil e nos Estados Unidos. Disponível em: <http://www.ovosite.com.br/noticias/index.php?codnoticia=16875> Acesso em: 03 jan. 2020.

Paludo E (2016) **Caracterização do perfil de expressão de genes relacionados à integridade óssea em diferentes grupos genéticos de aves de corte e postura.** 177 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages – SC.

Piper K, Boyde A, Jones SJ (1992) The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. **Anatomy and Embryology** 186:291–229.

Pizauro Junior JM, Santos LFJ, Gonçalves AM (2017) Estrutura e função do tecido ósseo. In: Macari M, Maiorka A (2017) **Fisiologia das aves comerciais,** Jaboticabal: Funep, 492-511p.

Pizauro JJM, Ciancaglini P, Macari M (2002) Discondroplasia tibial: Mecanismo de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola,** 4:169–185.

Pomar C, Kipper M, Marcoux M (2017) Use of dual-energy x-ray absorptiometry in non-ruminant nutrition research. **Revista Brasileira de Zootecnia,** 7:621-629.

Reece WO (2008) **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 468p.

Ribeiro FLA (2014) **Composição corporal e metodologias para a determinação de exigências nutricionais em cordeiros.** 64 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG.

Richards FJA (1959) flexible growth function for empirical use. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 10:290-300.

Riczu CM, Saunders-Blades JL, Yngvesson AK, Robinson FE, Robinson FE, Korvert DR (2004) End-of-Cycle Bone Quality in White- and Brown-Egg Laying Hens. **Poultry Science,** 83:375–383.

Rocherfort GY, Pallu S, Benhamou CL (2010) Osteocyte: the unrecognized side of boné tissue. **Osteoporos Int,** 21:1457-1469.

Rondón EOO, Murakami AE, Sakaguti ES (2002) Modelagem computacional para produção e pesquisa em avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola,** 4:199-207.

Ross MHR, Pawlina W. (2008) **Histologia – Texto e atlas.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 908.

Salas C, Ekmay RD, England J, Cerrate S, Coon CN (2012) Determination of chicken body composition measured by dual energy X-ray absorptiometry. **International Journal of Poultry Science,** 11:62-468.

Sandy C, Marks JR, Odgren PR (2002) **Structure and Development of the skeleton.** In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. **Principles of Bone Biology,** 2 ed, Academic Press, 1:3-15.

Santos AL (2008) **Desempenho, crescimento, qualidade do ovo, composição corporal e característica reprodutivas e ósseas de poedeiras submetidas a diferentes programas nutricionais.** 165 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Santos GS (2012) Metabolismo do Cálcio, Fósforo e Magnésio. Disponível em: http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA2SAAE/metabolismo-calcio-fosforo-magnesio#. Acesso em: 16 de nov. 2019.

Scholz AM, Bünger L, Kongsro J, Baulain U, Mitchell AD (2015) Non- invasive methods for the determination of body and carcass composition in livestock: dual-energy X-ray absorptiometry, computed tomography, magnetic resonance imaging and ultrasound: invited review. **The Animal Consortium,** 7:1250-1264.

Scholz AM, Kremer PV, Wencze R, Pappenber E, Bernau M (2012) Body composition in farm animals by dual energy X-ray absorptiometry. In: Maltin C, Craigie C, Bünger L (Eds) **Farm Animal Imaging,** Ingliston: QMS, 9-14p.

Schreiweis MA, Orbant JI, Ledur MC, Moody DE, Hester PY (2004) Effects of ovulatory and egg laying cycle on boné mineral density and contente of live White Leghorns as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry. **Poultry Science,** 83:1011-1019.

Schreiweis MA, Orbant JI, Ledur MC, Moody DE, Hester PY (2005) Validation pf dual-energy X-ray absorptiometry in live White Leghorns. **Poultry Sicience,** 84: 91-99.

Silva EA (2014). **Níveis de cálcio e relações cálcio:fósforo em rações para poedeiras leves.** 130 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

Silva EP, Malheiros EB, Sakomura NK, Venturini KS, Hauschild L, Dorigam JCP, Fernandes JBK (2015) Lysine requirements of laying hens. **Livestock Science**, 69-77p.

Silva EA (2014) **Níveis de cálcio e relações cálcio:fósforo em rações para galinhas poedeiras leves.** 130 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG.

Silva LP, Silva FG, Bonafé CM, Lehner HG, Schiavetti VL, Caetano GC, Torres RA (2010) Avaliação de curvas de crescimento de machos e fêmeas de codorna de corte. In. **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL**, n.8.

Silveira FG, Silva FF, Carneiro PLS, Malhado CHM, Muniz JÁ (2011) Análise de agrupamento na seleção de modelos de regressão não-lineares para curva de crescimento de ovinos cruzados. **Ciência Rural**, 41:692-698.

Sims NA, Gooi JH (2008) Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental Biology,** 19: 444–451.

Souza CS, Vieites FM (2014) Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. Revisão. **Archivos de Zootecnia,** 63:11–24.

Souza C (2014) **Influência dos níveis de cálcio e vitamina k na dieta de poedeiras na fase de recria e os efeitos sobre a fase postura.** 68 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual de Maringá - Centro de Ciências Agrárias, Maringá – PR.

Speakman JR, Booles D, Butterwick R (2001) Validation of dual energy X-ray absorptiometry (DXA) by comparison with chemical analysis of dogs and cats. **International Journal of Obesity 25**, 439–447p.

Scolari TMG (2007) Osteoporose em poedeiras comerciais: uma doença metabólica multifatorial. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.php?codigo=98>. Acesso em: 16 de out. 2020.

Swennen Q, Jassens GPJ, Geers R, Decuypere E, Buyse J (2004) Validation of Dual-Energy X-Ray Absorptiometry for Determining in vivo Body Composition of Chickens. **Poultry Science,** (83):1348-1357p.

Swiatkiewicz S, Arczewska-Wlosek A, Jozefiak D (2015) Bone quality, selected blood variables and mineral retention in laying hens fed with diferente dietary concentrations and sources of calcium. **Livestock Science,** 181:194–199.

Szejnfeld VL, Heymann RE (2003) Avaliação da massa óssea por DXA. In: Anijar JR (2003) Densitometria Óssea na Prática Média. São Paulo: Sarvier.

Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T (2002) **Cells of bone.** In: Bilezikian JP, raisz LG, Rodan GA (2002) **Principles of bone biology.** 2ed. Academic Press, p. 3-15.

Takahashi N, Udagawa N, Suda T (2014) Vitamin D endocrine sustem and osteclasts. **BoneKEy Reports,** 3:495.

Tavares NM (2017). **Tecido Ósseo.** Disponível em:<https://www.osteoprotecao.com.br/editorial/122/tecido-osseo> Acesso em: 10 jan. 2020.

T.I. Lohmann do Brasil (2016). Disponível em:<https://www.Itz.com.br/>. Acesso em: 15 de nov. 2019.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000) The cell biology of osteoclast function. **Journal of Cell Science,** 113: 37–81.

Vargas JrJG, Albino LFT, Rostagno HS, Gomes PC, Cupertino ES, Carvalho DCE, Silva MA, Pinto R (2004) Níveis nutricionais de cálcio e de fósforo disponível para aves de reposição leves e semipesadas de 13 a 20 semanas de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33:1263-1273.

Vellasco CR, Gomes PC, Donzele JL, Rostagno HS, Calderano AA, Mello HHC, Pastore SM (2016) Níveis de cálcio e relação cálcio: fósforo em rações para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. **Ciência Animal Brasileira,** 17:206-2016.

Veum TL (2010) Phosphorus and calcium nutrition and metabolismo. In: Vitti DMSS, Kebreab E. **Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals,** Ed. CAB International, Oxfordshire, UK, 94-111p.

Vieira MF (2015) **Efeitos de duas condições climáticas, duas linhagens e dois sistemas de ventilação no desempenho produtivo de galinhas poedeiras alojadas em sistemas verticais de criação.** 76 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, MG.

Von Bertalanffy L (1957) Quantitative laws for metabolismo and growth. **Quartely Reviews of Biology,** 32:217-310.

Whitehead CC (2004) Overview of bone biology in egg-laying hen. **Poultry Science**, 83:193–199.

Whitehead CC, Fleming RH (2000) Osteorosis in cage layers. **Poultry Science,** 79:1033-1041.

Yoshiko Y, Candeliere GA, Maeda N, Aubin JE (2007) Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. **Molecular and Cellular Biology,** 27:4465–4474.

Zhang ZC, Xiao LH, Wang Y, Chen SY, Yang ZQ, Zhao XL, Zhu Q, Liu YP (2012) mRNA expression. Profiles of calmodulin and liver receptor homolog-1 genes in cgickens. **Genetics and Molecular Research,** 11:3482-3489.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO ÓSSEO EM TRÊS LINHAGENS DE POEDEIRAS COMERCIAIS EM FASE DE CRESCIMENTO

Este capítulo foi redigido conforme as normas da revista **Journal Bone and Mineral Research**

RESUMO: Objetivou-se com o estudo avaliar o desenvolvimento ósseo por meio das mensurações por absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA), teor de cinzas e resistência óssea do tibiotarso direito em três linhagens de poedeiras comerciais (Dekalb White, Lohmann White, Lohmann Brown) a partir de 1 a 126 dias de idade. Foram utilizadas 270 aves de postura distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso, com três tratamentos (Dekalb White, Lohmann White e Brown) e seis repetições, sendo cada repetição representada por uma gaiola contendo 15 aves, totalizando 90 aves de cada linhagem, que posteriormente foram eutanásiadas de acordo com a idade para coleta dos tibiotarsos direito. Todos os dados foram ajustados para cada parâmetro do modelo logístico por meio do software SAS versão 9.4. O peso ósseo do tibiotarso direito das aves Dekalb White e Lohmann White foi superior à Lohmann Brown (0,060; 0,058/dia) respectivamente, de modo que as aves brancas atingiram o peso ósseo à maturidade mais rapidamente que as aves marrons. Porém, área óssea as aves Lohmann Brown (51 dias) foram quatro dias mais precoce que a Dekalb White (55 dias) diferindo quanto ao ponto de inflexão em relação ao peso ósseo. O conteúdo mineral ósseo (BMC) apresentou particularidade quanto a Lohmann Brown com deposição maior em relação a Dekalb White e Lohmann White, 0,607, 0,412 e 0,353 g, respectivamente. A densidade mineral óssea (BMD) para o tibiotarso direito das aves Lohmann Brown apresentou-se maior em comparação a Dekalb White e Lohmann White (0,131; 0,125 e 0,107 g/cm^2) respectivamente, conferindo as aves bom desenvolvimento da estrutura óssea, pois aves com menor densidade mineral seriam mais susceptíveis a fratura ósseas ao longo do ciclo de produção. Desta forma, as aves da linhagem Lohmann se destacam quanto ao desenvolvimento ósseo, principalmente a Lohmann Brown seguida da Dekalb White, podendo-se inferir que, o aprimoramento de linhagens de poedeiras comerciais através da seleção de variáveis de integridade óssea de um osso em particular poderá melhorar a integridade do esqueleto como um todo.

Palavras-chave: CONTEÚDO MINERAL ÓSSEO; DENSIDADE MINERAL ÓSSEA; DEKALB WHITE; LOHMANN BROWN; LOHMANN WHITE

INTRODUÇÃO

Avicultura de postura brasileira evoluiu muito ao longo dos anos e, grande parte dessa evolução foi devido ao progresso genético das linhagens comerciais, resultando em galinhas poedeiras cada vez mais produtivas e longevas, capazes de produzir cerca de 445 ovos por ave alojada, em ciclo produtivo que pode variar de 90 a 100 semanas de idade de acordo com a linhagem.

Justificando o elevado crescimento, em 2018 o Brasil passou a ser considerado o segundo maior plantel de postura comercial da América Latina, detendo um crescimento de 15% ao ano no setor de avicultura de postura comercial, [1] fazendo deste importante elo na economia nacional. Além disso, em 2019 a produção brasileira de ovos foi de 49.055.709 bilhões de unidades de ovos, um crescimento de 70,02% em relação ao ano de 2010 (28.851.931 bilhões de unidades). [2]

As poedeiras modernas apresentam diminuição na quantidade do osso cortical totalmente mineralizado à medida que o ciclo da postura progride, levando a altas afecções ósseas, em particular a osteoporose, importante avaliador de bem-estar animal. Desta forma, pesquisas mais recentes têm direcionado seus estudos para o período inicial de criação como componente chave na prevenção das afecções ósseas futuras.[3,4]

Em humanos, a osteoporose está associada a uma perda generalizada de minerais ósseos do esqueleto,[5] por isso é importante a prática de atividade física ao longo da vida, principalmente quando criança, pois auxilia na integridade óssea, fator importante para aumentar o pico de massa óssea na idade adulta, especialmente em mulheres.[6,7] Abordagem, correlata para poedeiras, pois aves criadas em sistemas (*cage-free*, *free-range*) que proporcione expressar seus comportamentos naturais como bater as asas, empoleirar-se, caminhar ou correr é importante, pois melhora a densidade e aumento da força óssea, se comparada à aves criadas em sistema de gaiolas convencionais.[4,8-10]

Neste contexto, o uso da absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA) tem sido validada como um método não invasivo para mensuração do desenvolvimento ósseo. A densitometria óssea é uma modalidade da radiologia que tem por finalidade avaliar a densidade mineral óssea de uma ou mais regiões anatômicas possibilitando dessa maneira o diagnóstico de possíveis doenças osteometabólicas em animais, por meio da mensuração de dados fornecidos pelo DXA quanto à área analisada (cm^2), conteúdo

mineral ósseo (BMC, g) e densidade mineral óssea (BMD, g/cm^2) com alta precisão e acurácia.[11,12]

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o desenvolvimento ósseo usando absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA), teor de cinzas e resistência óssea do tibiotarso em três linhagens de poedeiras comerciais, Dekalb White, Lohmann White e Lohmann Brown a partir de 1 a 126 dias de idade alojadas em gaiolas convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Cuidado e uso de animais

Todos os procedimentos adotados neste estudo envolvendo cuidados e o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, sob protocolo nº 006425/18.

Aves, alojamento, desenho experimental e dietas

Foram utilizadas 270 aves de postura Lohmann e Dekalb nas variedades branca e marrom, que permaneceram em estudo do primeiro ao 126 dias de idade, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com três tratamentos (Dekalb White, Lohmann White e Brown) e seis repetições cada, sendo a repetição representada por uma gaiola contendo 15 aves, totalizando 90 aves de cada linhagem.

As aves foram alojadas em galpão experimental dotado de sistema de ventilação por pressão negativa, equipado com sistema de controle de temperatura. O aquecimento na fase inicial foi feito por luz infravermelha de 400W. As pintainhas foram alojadas em gaiolas com 100 cm de comprimento x 80 cm de largura x 30 cm de altura, forrada com papel kraft, e após 6 semanas foram transferidas e alojadas em gaiolas com as seguintes dimensões, 50 cm de comprimento x 50 cm de largura x 30 cm de altura, em galpão

climatizado com temperatura mínima de 19º C e máxima de 24º C. As gaiolas eram de material galvanizado, equipadas com comedouro tipo calha e bebedouro tipo *nipple*, durante as 18 semanas de idade o fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. Nas primeiras seis semanas, a iluminação e o calor foram fornecidos diariamente por 24 horas por lâmpadas infravermelhas. Da sexta à décima semana, o programa de luz adotado foi de 12 h de luz:12 h de escuro e, mantida até as 18 semanas de idade. Foi realizada a primeira debicagem aos 8 dias de idade e a segunda com 10 semanas de idade. O programa de vacinação adotado segue no anexo I.

Foi adotado um programa de alimentação em cinco fases de acordo com cada idade: ração pré-inicial (1 a 21 dias), inicial (22 a 42 dias), crescimento (43 a 84 dias), pré-postura I (85 a 105 dias) e pré-postura II (106 a 126 dias). As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais das linhagens, de acordo com o manual de manejo de cada linhagem, garantindo que não houvesse nenhum tipo de limitante, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional das dietas

Ingredientes g/kg	Age (Days)				
	1-21	22-42	43-84	85-105	106-126
Corn (7,88%)	578.5	580.9	650.0	650.0	644.3
Wheat Bran	50.0	50.0	32.9	50.0	0.0
Soybean Meal (45%)	300.0	300.0	261.0	244.2	246.2
Soybean Oil	28.0	27.8	14.9	16.7	27.9
Dicalcium Phosphate	20.8	20.2	19.8	18.4	21.3
Limestone	9.90	10.2	10.9	11.9	49.9
NaCl	3.50	3.30	3.00	3.00	3.00
$NaHCO_3$	1.00	1.00	1.40	1.80	1.80
Mineral vitamin premix[1]	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
DL-Met (99%)	2.10	2.10	1.80	1.10	2.00
L-Lys (54,6%)	2.90	1.60	1.40	0.00	0.60
L-Thr (98%)	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00
Choline Chloride (60%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Calculated composition					
CP (g/kg)	193 (180)	192 (210)	177 (183)	170 (193)	164(163)
AMEn (kcal/kg)	3000	3000	3000	3000	3000
Ca (g/kg)	10.0	10.0	10.0	10.0	25.0
Fd (g/kg)	5.00	4.90	4.70	4.50	4.80
Na (g/kg)	1.80	1.70	1.70	1.80	1.80
K (g/kg)	7.90	7.90	7.20	7.10	6.60
Cl (g/kg)	2.80	2.70	2.50	2.50	2.50
Lys (g/kg)	10.50	9.80	8.80	7.70	7.80
Met (g/kg)	4.80	5.50	4.70	4.20	4.30
Met + Cys (g/kg)	7.40	7.40	6.70	5.90	6.60
Thr (g/kg)	6.90	6.50	6.00	5.80	5.60
Val (g/kg)	7.90	10.0	8.60	9.10	6.80
Trp (g/kg)	2.20	2.10	1.90	1.90	1.80

[1]Provided per kilogram of diet: manganese = 150 g, iron = 100 g, zinc = 100g, copper = 16 g, iodine = 1.5 g, selenium = 300 mg, folic acid = 1 mg, pantothenic acid = 15 mg, niacina = 40 mg, biotin = 0.060 mg, vitamin B1 = 1.8 mg, vitamin B12 = 0.012 mg, vitamin B2 = 6 mg, vitamin B6 = 2.8 mg, vitamin A = 8250, vitamin D3 = 2.000 UI, vitamin E = 15 mg, vitamin K3 = 1.8 mg. Values between parentheses represented analyzes composition.

Densidade mineral, conteúdo mineral e área de superfície

Objetivando a integridade óssea, as aves foram eutanásiadas por inalação de dióxido de carbono (CO_2), respeitando as normas do CONCEA. Posteriormente foi realizada a retirada dos membros pélvicos de cada ave, seguida da dissecação, retirando a pele, músculos e ligamentos, isolando e identificando os tibiotarsos direitos com base em suas respectivas idades (1, 7, 14, 28, 56, 70, 77, 84, 98, 112 e 126 dias) e armazenados em sacos plásticos em freezer à -20ºC.

A densidade mineral (BMD, g/cm^2), conteúdo mineral ósseo (BMC, g) e área de superfície (cm^2) foram determinados para o tibiotarso direito, usando a absortometria de dupla energia de raios-X (DXA) em equipamento Hologic Discovery Wi^{TM} (Hologic-QDR® modelo 13.4.2 BEDFORD, MA). Antes da varredura da amostra o aparelho foi previamente calibrado por uma coluna de Phantom feita de acrílico e alumínio.[13] Os ossos limpos de tecido muscular foram escaneados de acordo com cada idade pelo software *small animal*. Antes de cada varredura, o software do equipamento era alimentado com informações da amostra escaneada, como identificação (ID), peso ósseo (g) e comprimento do osso (cm).

Para a determinação do conteúdo de cinza óssea foi utilizada uma equação de predição [14] usando as medições do DXA como segue:

$$BMM(g) = e^{[(0.44045x(lnBMC)+(0.33779x(lnLean)]}$$

onde: BMM é a matéria mineral óssea, BMC é o conteúdo mineral ósseo e Lean é a massa magra composta por água + proteína (g) obtidos pelo DXA.

Resistência óssea

Os tibiotarsos direitos foram submetidos aos testes mecânicos de resistência óssea em três pontos, usando o equipamento Instron Lx600 (Marca EMIC, modelo DL 10.000, com célula carga-EMIC de 200 Kgf) os dados coletados por computador diretamente acoplado à máquina são expressos em carga máxima em Newton (N) e depois transformados para quilograma-força por centímetro ao quadrado (kgf / cm^2), seguindo as recomendações da normativa ANSI/ASAE S459 MAR98 para o teste de flexão em três pontos. Foi utilizado neste teste a velocidade de 5 mm / min e pré-carga de 5 N com tempo de acomodação de 30 s com distância entre os pontos de 60 mm. Posteriormente os dados foram passados para uma planilha do programa Microsoft Office Excel.

Para esta análise, os ossos coletados com 14, 28, 56, 70, 77, 84, 98, 112 e 126 dias de idade das linhagens Dekalb White, Lohmann Brown e White, foram posicionados com vista dorsoventral e apoiados na região das epífises, a diáfise média permaneceu livre de apoio para receber a força aplicada nessa região e assim obter o ponto de ruptura óssea de todos os tratamentos e suas respectivas idades, logo após análise de resistência o material analisado foram armazenados em freezer à -20ºC.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC), procedimento PROC NLMIXED utilizado para ajustar o modelo logístico para avaliar o peso ósseo, área cortical óssea, BMC, BMD e resistência óssea em relação a idade da ave, como descrito:

$$Y = \frac{L}{[1 + \exp^{-k\,(X - X*)}]}$$

Onde, Y é o valor observado (de peso ósseo, área cortical óssea, BMC, BMD e resistência óssea) na idade X (dias); L é o peso a maturidade (kg ou g); k taxa de crescimento por dia; X é a idade da ave (dia) e X^* é idade em que a taxa de crescimento é máxima, ponto de inflexão da curva (dia/dia).

RESULTADOS

Com base nos parâmetros estimados pela função logística para o peso ósseo (Tabela 2), observou-se que a taxa de crescimento (k) em relação ao peso do osso para as aves Dekalb White e Lohmann White (0,060 / dia) foram superiores ao peso ósseo da Lohmann Brown (0,058 / dia), de modo que as aves brancas atingiram o peso do osso à maturidade mais rapidamente que as aves marrons. Em consequência, os resultados indicam que a menor taxa de crescimento da linhagem marrom em relação as brancas resultaram em tempo maior para que essas aves atingissem a sua taxa máxima para o peso ósseo, no caso da Lohmann Brown (62 dias) em relação a Dekalb White (60 dias) e Lohmann White (58

dias). Verificou-se também que, a Lohmann White foi intermediária às demais linhagens estudadas, principalmente entre as aves da mesma linhagem (Lohmann), sendo quatro dias mais precoce que as aves Lohmann Brown e, dois dias mais precoce que as Dekalb White. Isso mostra o quanto as aves de linhagem leve (brancas) têm um crescimento mais precoce em relação as aves semipesadas (marrons).

Para todas as linhagens estudadas, o ponto de inflexão (X*) de cada curva apresentou-se anteriormente ao centro da curva de crescimento, ou seja, antes da metade do período avaliado (126 dias ou 18 semanas) Fig 1. Ocorreu aos 26,13% (62 dias) para as aves da Lohmann Brown, aos 24,12% (58 dias) para as Lohmann White e aos 20,71% (60 dias) para as Dekalb White. Esses dados mostram mais uma vez que as aves leves são mais precoces que as semipesadas, pois atingiram as maiores taxas do peso ósseo em menor tempo.

Tabela 2. Estimativas dos parâmetros da função logística para peso ósseo de frangas em crescimento com diferentes idades

Parameter	Bone Weight		
	DW	LB	LW
L (g)	7.31 ± 0.268	9.79 ± 0.229	6.59 ± 0.178
k (/ day)	0.060 ± 0.007	0.058 ± 0.004	0.060 ± 0.005
X* (days)	60 ± 2.24	62 ± 1.38	58 ± 1.71

DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; BMC – Conteúdo Mineral Ósseo; BMD – Densidade Mineral Óssea; ± SE – Erro Padrão.

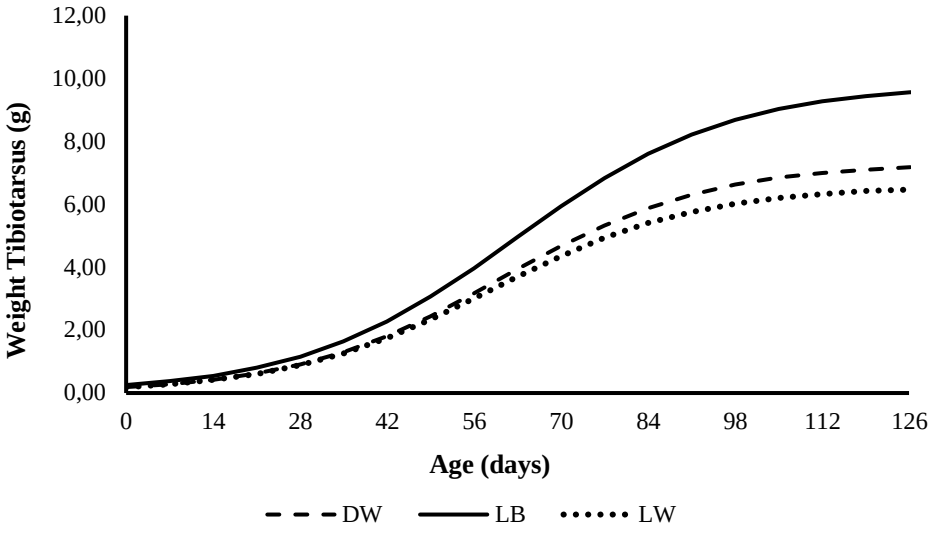


Fig. 1. Representação gráfica do peso do tibiotarso direito nas três linhagens de poedeiras nas diferentes idades de crescimento.

Na avaliação da área óssea do tibiotarso pelo DXA, as aves das linhagens Lohmann White e Dekalb White apresentaram o mesmo comportamento quanto ao peso do osso, tendo as aves marrons maior área cortical óssea (4,73 cm para Lohmann Brown) que as aves brancas (3,82 cm para Dekalb White e 3,98 cm para Lohmann White) (Tabela 3). A variação quanto ao desenvolvimento da área óssea da Lohmann Brown para a Dekalb White foi de 28,57%, e da Lohmann Brown para a Lohmann White foi de 20,49%. As aves da linhagem Lohmann apresentaram menor taxa de crescimento em relação a área cortical do osso (0,078 / dia), e as Lohmann Brown foram quatro dias mais precoce que a Dekalb White (55 dias), esse comportamento diferiu do observado no peso do osso, em que as aves marrons foram mais tardias que as aves brancas, mas refletiu significativamente no desenvolvimento da área óssea, conferindo a ave bom desenvolvimento estrutural ósseo. Esses valores são importantes, pois quanto maior a área óssea, maior são os valores correspondentes ao conteúdo mineral e densidade óssea correlacionando com o peso do osso, favorecendo o crescimento dessas aves, assim como aumento da resistência óssea.

O conteúdo mineral ósseo (BMC) apresentou particularidade quanto a Lohmann Brown, tendo uma deposição de conteúdo mineral maior em relação a Dekalb White e Lohmann White, 0,607, 0,412 e 0,353 g, respectivamente. Além disso, as aves marrons apresentaram taxa de deposição menor (0,067 / dia), com diferença de 0,021 / dia da Dekalb White e 0,053 / dia da Lohmann White. Em relação ao ponto de inflexão (X*) a Lohmann White foi dois dias mais precoce (58 dias) que as demais linhagens, idade igual para o peso ósseo e, correlacionando com o BMC e área cortical óssea, conferiu a ave em suas primeiras semanas de crescimento melhor desenvolvimento da estrutura óssea, assim como a Lohmann Brown (Tabela 3 e Fig. 2A).

Para densidade mineral óssea (BDM, g/cm^2), com o BMC e área óssea, observou-se que a Lohmann Brown apresentou maior densidade para o tibiotarso (0,131 g/cm^2), seguida da Dekalb White (0,125 g/cm^2) e Lohmann White (0,107 g/cm^2), essa variação foi de 28,15% da Lohmann Brown para a Dekalb White e 18,38% entre as aves da linhagem Lohmann. Tanto a taxa de crescimento como o ponto de inflexão para a densidade foram iguais entre as aves da linhagem Lohmann (brancas e marrons), conferindo as aves bom desenvolvimento de sua estrutura óssea (Fig. 2B), pois aves com menor densidade mineral seriam mais susceptíveis a fraturas ósseas ao longo do seu ciclo de produção.

Para o teor de cinzas ósseas, observou-se que o valor máximo para o parâmetro L, onde a curva de crescimento tende a sua assíntota, foi representativo para a Lohmann Brown (1,625 g) com uma variabilidade de 3,4% do parâmetro dentro da linhagem, com taxa de crescimento de 0,065 / dia, atingindo o máximo de deposição de cinzas em 55 dias, equivalendo a oito semanas de crescimento da franga e desenvolvimento da estrutura esquelética. As linhagens Dekalb White e Lohmann White também apresentaram boa deposição quanto ao conteúdo de cinzas, com uma diferença de 0,013

/ dia em sua taxa de teor de cinzas e, variação de 4,41% entre essas duas linhagens, o ponto de inflexão para ambas foi semelhante ao das aves da Lohmann Brown (55 a 56 dias) (Tabela 4). Desta forma, podemos afirmar que os valores obtidos nessa pesquisa para área cortical do osso, BMC e BMD tibial, estão intimamente interligados com a quantidade de cinzas óssea, nos indicando que o desenvolvimento da estrutura esquelética de frangas em fase de crescimento se encontra em constante formação. Deste modo, quanto maior essa relação melhor a qualidade e integridade óssea da ave, proporcionando ao animal uma melhor resposta à resistência óssea.

Neste contexto, a estimativa dos parâmetros da função logística para a resistência óssea foi crescente nas linhagens avaliadas. A Lohmann Brown apresentou uma resistência de 17,153 kfg em relação à Dekalb White (15,661 kgf) e Lohmann White (15,276 kgf) em 28 dias de crescimento, sendo que as linhagens brancas apresentaram uma taxa de crescimento menor em comparação as aves marrons (Tabela 5). Além disso, as aves apresentaram acentuada resistência óssea antes da 18 semana de idade (Fig. 2C), isso é importante, pois a deposição mais acelerada do osso medular ocorre entre a 16 a 20 semana, e pode continuar a se acumular lentamente durante o restante do período de postura, em detrimento do osso estrutural, conferindo a ave deposição de minerais para a formação de casca do ovo e qualidade óssea. Esses resultados sugerem que o DXA pode ser usado para avaliar diferenças na mineralização óssea, fragilidade e suscetibilidade a fraturas de frangas em crescimento com diferentes idades.

Tabela 3. Estimativa dos parâmetros da função logística para crescimento ósseo de frangas poedeiras em diferentes idades

Parameter	Bone Area (cm)			BMC (g)			BMD (g/cm^2)		
	DW	LB	LW	DW	LB	LW	DW	LB	LW
L (cm)	3.82 ± 0.16	4.73 ± 0.16	3.98 ± 0.15	0.412 ± 0.02	0.607 ± 0.02	0.353 ± 0.01	0.125 ± 0.01	0.131 ± 0.01	0.107 ± 0.01
k (/ day)	0.120 ± 0.039	0.078 ± 0.012	0.077 ± 0.013	0.088 ± 0.02	0.067 ± 0.012	0.141 ± 0.035	0.022 ± 0.006	0.074 ± 0.073	0.074 ± 0.094
X* (days)	55 ± 2.60	51 ± 2.65	56 ± 2.52	60 ± 3.69	60 ± 2.89	58 ± 1.75	37 ± 13.3	25 ± 10.8	25 ± 14.5
R^2	0.93	0.97	0.95	0.92	0.97	0.91	0.99	0.97	0.97

DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; BMC – Conteúdo Mineral Ósseo; BMD – Densidade Mineral Óssea; ± SE – Erro Padrão.

Tabela 4. Estimativas com base no conteúdo de cinzas ósseas de poedeiras em diferentes idades

Parameter	Bone Ash Content (g)		
	DW	LB	LW
L (g)	1.26 ± 0.05	1.65 ± 0.04	1.18 ± 0.03
k (/ day)	0.078 ± 0.014	0.065 ± 0.007	0.078 ± 0.010
X* (days)	56 ± 2.67	55 ± 1.99	55 ± 1.94
R^2	0.94	0.96	0.94

DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; BMC – Conteúdo Mineral Ósseo; BMD – Densidade Mineral Óssea; ± SE – Erro Padrão.

Tabela 5. Estimativa dos parâmetros da função logística para resistência óssea de frangas em crescimento

Parameter	Bone Breaking Strength (kgf)		
	DW	LB	LW
L (kgf)	15.661 ± 0.51	17.153 ± 0.37	15.276 ± 0.345
k (/ day)	0.062 ± 0.012	0.141 ± 0.039	0.070 ± 0.010
X* (days)	27 ± 3.01	28 ± 1.64	28.5 ± 2.07
R^2	0.99	0.95	0.98

DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; ± SE – Erro Padrão.

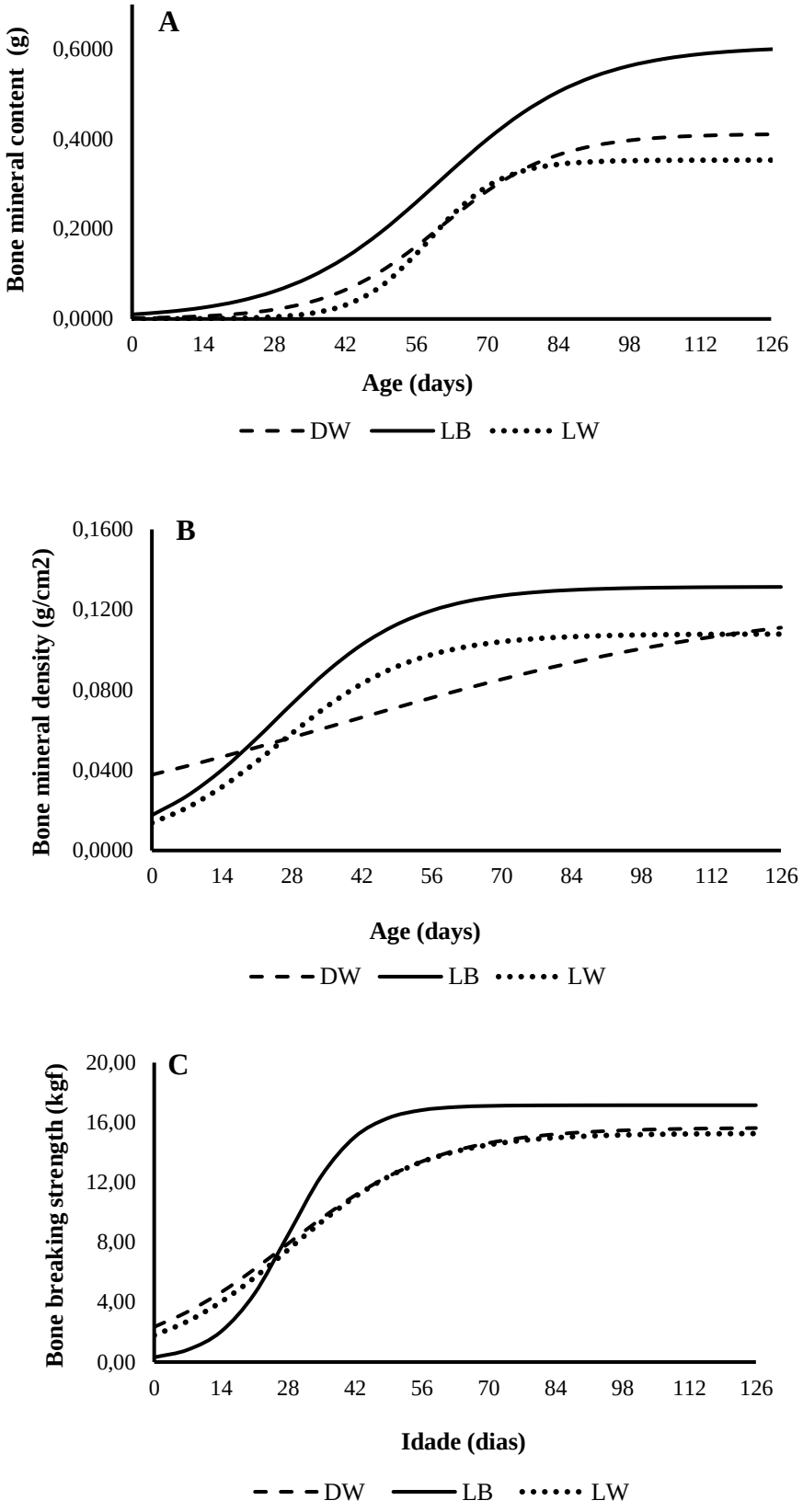


Fig. 2. Representação gráfica do peso do tibiotarso direito: BMC (A), BMD (B) e resistência óssea (C) de frangas poedeiras em crescimento em diferentes idades.

DISCUSSÃO

Para definir as principais características que contribuem para o desenvolvimento ósseo das três linhagens genéticas estudadas, pelos resultados apresentados fica claro que, se as galinhas poedeiras fossem geneticamente selecionadas para melhorar a integridade esquelética, a qualidade da casca e o peso dos ovos não seriam prejudicados. [15]

Desta forma, pesquisas na produção animal vem evoluindo cada vez mais, principalmente quando se refere ao bem-estar animal, e parte desta constante evolução é o uso de equipamentos apropriados como o DXA, que inicialmente foi desenvolvido para estimar a composição química e doenças ósseas em humanos, mas a sua aplicação em pesquisas com animais vem ganhando força no meio científico, por ser um equipamento de acurácia em seus resultados [14,16] e, quando associados a modelos de predição da curva de crescimento, possibilitam uma melhor avaliação da população, permitindo ao pesquisador respostas com embasamento biológico e fisiológico do animal. Desta forma, é possível otimizar as estratégias nutricionais dando prioridade a cada fase de crescimento do animal e atendendo suas necessidades. [17-19]

Os resultados desse estudo foram bastante expressivos, pois sabe-se que aves criadas em sistema de gaiolas tendem a apresentar muitos problemas ósseos em seu ciclo de produção, em detrimento do avançar da idade, devido à falta de mobilidade. [20,21] Porém, foi observado que, o desenvolvimento esquelético na fase de cria e recria nas três linhagens avaliadas em diferentes idades foram bastante positivos, pois cada linhagem respondeu de forma particular aos parâmetros de crescimento ósseo (Tabela 3) em destaque a Lohmann Brown seguida da Dekalb White e Lohmann White, principalmente para a resistência óssea, que é um dos pontos mais relevantes dentro do sistema de criação convencional, pois reflete economicamente para o produtor.

Além disso, as aves apresentaram acentuada resistência óssea antes das 18 semanas de idade (Tabela 5) isso é importante, pois a deposição mais acelerada do osso medular ocorre entre a 16 a 20 semana, e pode continuar a se acumular lentamente durante o restante do período de postura, em detrimento do osso estrutural, e também devido ao tibiotarso apresentar maior componente medular em comparação a outros ossos do esqueleto da ave, [22] conferindo a ave deposição de minerais para a formação da casca do ovo e qualidade óssea, em especial o cálcio. O aumento da densidade mineral óssea (Tabela 3) é consistente para essa ocorrência, ou seja, apreciáveis quantidade do osso medular. [15,22] Mas, um contra ponto deve ser ressaltado quanto ao uso do DXA, que é a sua limitação em distinguir o osso medular do osso cortical assim como do osso trabecular. Isso possivelmente resultou na observação do aumento relacionado à BMD e ao BMC do tibiotarso, uma vez que o componente medular do osso contribui para a resistência óssea, e a seleção genética para melhorar a BMD deve resultar em integridade esquelética melhorada e reduzir fraturas. [22,23]

Vale salientar que nesse estudo as aves encontravam-se em fase de crescimento, o que ressaltando nossos resultados, pois as linhagens apresentaram bom desenvolvimento dos parâmetros ósseos caracterizando a qualidade e integridade óssea, seja devido a dieta balanceada de acordo com cada exigência, manejo adequado na fase de crescimento, o que poderá responder de forma positiva ou não ao longo da vida produtiva e bem-estar dessas aves.

Desta forma, [22] ao avaliarem a variação no BMD e BMC de Leghorns White de 15 a 65 semanas de idade para a melhoria da integridade esquelética durante a formação do ovo no oviduto, observaram que a densidade do tibiotarso aumentou de 15 a 55 semanas de idade, resultando em uma interação osso por idade. Sendo que às 25 semanas de idade a densidade tibial foi altamente correlacionada às 55 semanas de idade ($r = 0,70$). O BMC

do tibiotarso às 25 semanas de idade foi moderadamente correlacionado às 55 semanas de idade (r = 0,63) e as 65 semanas de idade (r = 0,66). Além disso, os mesmos autores relataram que a BMD e o BMC correlacionaram com o peso corporal das aves, afirmando que a integridade óssea pode ser melhorada geneticamente e mesmo assim manter o peso corporal constante, indicando o potencial uso do DXA para seleção genética da integridade esquelética.

Neste contexto, [14] ao avaliarem os parâmetros de crescimento corporal de quatro linhagens de postura comercial (Dekalb White e Brown; Lohmann White e Brown) em diferentes idades, relataram que as diferenças no crescimento das frangas começaram aos 14 dias de idade, sendo mais evidentes a partir dos 70 dias de idade. Independentemente da linhagem avaliada, todas as frangas atingiram o peso corporal recomendado pelo manual de cada linhagem às 18 semanas de idade, quando as frangas atingiram a maturidade sexual. As linhagens comerciais marrons exibiram um peso corporal à maturidade (Wm) mais alto em comparação com as linhagens brancas, com uma diferença de aproximadamente 3% na maturidade (1873 vs, 1809 g), enquanto essa diferença para as linhagens brancas atingiu valores de aproximadamente 15% (1436 vs, 1253 g), corroborando com os resultados deste estudo quanto ao peso do osso que foi mais expressivo para aves da linhagem marrom.

Contudo [15] analisaram o efeito de uma muda induzida e um segundo ciclo de postura na integridade esquelética em galinhas poedeiras Leghorns White de 60 a 126 semanas de idade, e observaram que o peso de cinzas do tibiotarso, o BMC e a BMD *in vivo* apresentaram correlações positivas com a resistência óssea, com idade média de 85 a 125 semanas de idade, e apenas com a BMD às 126 semanas de idade. Essa variação para os valores correlacionados a densidade tibial, ocorreu no final do segundo ciclo de postura, quando a produção de ovos estava em declínio. Como menos ovos foram postos, pode

haver menos necessidade de mobilizar o cálcio a partir do componente medular dos ossos, como o tibiotarso, para formação de casca, levando ao aumento da mineralização deste osso (117 semanas de idade). Este estudo nos mostra que o decréscimo na densidade mineral óssea pode ser associado à maior ocorrência de fraturas em carcaças de poedeiras processadas ao final do segundo ciclo de postura.

Todavia, ao envelhecer, um fenômeno interessante ocorre em poedeiras devido à condição particular da presença do osso medular, no qual qualquer perda na densidade mineral dos ossos com a idade pode ser mascarada pelo aumento no componente medular devido ao seu uso reduzido na calcificação da casca dos ovos em função do decréscimo na taxa de postura que ocorre com a idade. Nesta condição, os hormônios essenciais à reprodução como estrógeno e seus receptores declinam resultando em menor habilidade de absorção do Ca pelo trato gastrointestinal ou pelos túbulos renais e, da transferência do mesmo à glândula calcífera para a formação da casca. Baixos valores de massa óssea e aumento no risco a fraturas são característicos em ossos de poedeiras em final do período de postura, e são consequências de mudanças na estrutura do colágeno ósseo e redução na mineralização. A perda na integridade óssea associada à idade ocorre em parte devido à redução na produção de osteoblastos, células responsáveis pela deposição da matriz óssea. E em parte, devido à perda na capacidade de absorção da Vitamina D pelos intestinos e ossos. [24]

Um trabalho bastante interessante quanto a seleção genética de aves poedeiras para melhora da integridade óssea é o de [25] no qual desenvolveram um índice de seleção que incluía densidade radiográfica da quilha, força umeral e tibial e peso corporal. Nesse estudo eles utilizaram 5 gerações de uma linhagem comercial de poedeiras puras (Leghorn White). As gerações 1 e 2 indicaram baixa herdabilidade de características morfológicas, como vértebras torácicas esponjosas livres e volume do osso medular do

metatarso proximal (0,19 e 0,13, respectivamente). A herdabilidade do índice de seleção foi de 0,41 após a geração 4 e a seleção aumentou a resistência óssea na 5 geração, [25] usaram a seleção retrospectiva em características esqueléticas post-mortem no final do período de postura, no qual um preditor *in vivo* de integridade esquelética no início do ciclo de postura de ovos, por exemplo às 25 semanas de idade poderia diminuir o intervalo de geração necessário para melhorar esta característica.

Diferentemente, [26] ao trabalharem com o efeito do tipo de alojamento (sistema em piso, gaiola e enriquecido) nas fases de recria e postura sobre a qualidade óssea dos ossos medulares (fêmur e tibiotarso) e pneumáticos (úmero e quilha) em poedeiras Lohmann LSL até 73 semanas de idade. As aves alojadas em sistema de gaiola desde a recria até o período de postura tiveram menor pontuação em todas as variáveis ósseas avaliadas em todos os tipos de ossos. No entanto, aves em fase de recria alojadas em gaiolas e depois transferida para gaiolas enriquecidas em período de postura tiveram desempenho tão bom quanto as poedeiras alojadas continuamente em sistema de piso, em particular para o peso ósseo total do fêmur ($p = 0,044$) e força de ruptura óssea para o úmero ($p = 0,001$), devido à melhora da mobilidade. As aves alojadas em sistema de piso apresentaram maior peso ósseo para os medulares e pneumáticos, melhor teor de cinzas para o osso da quilha ($p = 0,048$), em comparação como os demais sistemas de alojamento. Mostrando assim, o quanto o tipo de alojamento pode ter interferência na qualidade óssea de galinhas poedeiras desde a recria até à postura.

Em estudos [21,23,27] afirmam que o tipo o tipo de criação da ave influencia diretamente a qualidade óssea dela, no entanto o fator mais importante é a quantidade de atividade física realizada pela poedeira, então, aves criadas com maior espaço nas gaiolas podem apresentar boas características ósseas ao longo de sua vida produtiva.

Assim fica claro que as propriedades mecânicas do osso não são determinadas apenas pela massa óssea total, mas também por sua distribuição geométrica, porosidade, organização estrutural em diferentes escalas e qualidade dos materiais ósseos, ou seja, resistência a fraturas ósseas no final do ciclo de postura. À medida que a quantidade de tecidos ósseos mineralizados estruturais diminui durante o período de postura, os ossos aumentam em fragilidade e são mais suscetíveis a fraturas,[21] uma vez que as fraturas limitam a mobilidade e a ingestão de ração e água,[29] aumenta a pressão sobre a medula espinhal causando dores aguda e crônica. [30] Neste contexto, [23] afirmam que a seleção genética e fatores ambientais, como alojamento, dieta, afetam as propriedades ósseas, como a força óssea, área cortical, densidade e conteúdo mineral ósseo e teor de cinzas.

CONCLUSÃO

A tecnologia da densitometria, que mensura a mineralização óssea em diferentes estágios da vida produtiva de poedeiras, é uma das mais recentes tecnologias validadas para se monitorar a integridade e susceptibilidade a fraturas em aves comerciais.

Desse modo, as aves da linhagem Lohmann se destacam quanto ao seu desenvolvimento ósseo, principalmente a Lohmann Brown seguida da Dekalb White, o que nos leva afirmar que, o aprimoramento de linhagens de poedeiras comerciais por meio da seleção de variáveis de integridade óssea de um osso em particular poderá melhorar a integridade do esqueleto como um todo.

REFERENCIAS

1. Brasil detém o segundo plantel de postura comercial da América Latina. [Internet]. AviSite, 2018. Available from: https://www.avisite.com.br/index.php?page=noticias&id=19054.
2. ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual. [Internet].

ABPA, 2020. Available from: https://abpa-br,org/mercados/#relatorios.

3. Regmi P, Deland TS, Steibel JP, Robison CI, Haut RC, Orth MW, Karcher DM. Effect of rearing environment on bone growth of pullets. Poult. Sci. [Internet]. The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of Poultry Science Association.; 2015;94(3):502–11. Available from: http://dx.doi.org/10.3382/ps/peu041.
4. Regmi P, Smith N, Nelson N, Haut RC, Orth MW, Karcher DM. Housing conditions alter properties of the tibia and humerus during the laying phase in Lohmann white Leghorn hens. Poult. Sci. [Internet]. Poultry Science Association Inc.; 2016;95(1):198–206. Available from: http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev209.
5. Augat P, Fan B, Lane NE, Lang TF, Lehir P, Lu Y, Uffmann M, Genant HK. Assessment of bone mineral at appendicular sites in females with fractures of the proximal femur. Bone.1998;22(4):395–402.
6. Vicente-Rodríguez G, How does exercise affect bone development during growth? Sport. Med. 2006;36(7):561–9.
7. Burrows M, Exercise and bone mineral accrual in children and adolescents [Internet]. ©Journal Sport. Sci. Med. 2007. Available from: http://www.jssm.org.
8. Casey-Trott TM, Korver DR, Guerin MT, Sandilands V, Torrey S, Widowski TM. Animal well-being and behavior opportunities for exercise during pullet rearing, Part I: Effect on the musculoskeletal characteristics of pullets. Poult. Sci. [Internet]. The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of Poultry Science Association.;2017;96(8):2509-7. Available from: http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex059.
9. Hester PY, Schreiweis MA, Orban JI, Mazzuco H, Kopka MN, Ledur MC, Moody DE. Assessing bone mineral density in vivo: Dual energy X-ray absorptiometry.

Poult. Sci. 2004;83(2):215–21.

10. Jendral MJ, Korver DR, Church JS, Feddes JJR. Bone mineral density and breaking strength of white leghorns housed in conventional, modified, and commercially available colony battery cages. Poult. Sci. Poultry Science Association Inc.; 2008;87(5):828–37.
11. Scholz AM, Bernau M. Body composition in farm animals by dual energy X-ray absorptiometry. Farm Anim. Imaging Dublin 2012. 2012;(June).
12. Lopes, HA; Silva, CN; Pinto, OC; Marques, G; Cartagenes, N; Soares W. Densitometria Óssea. Rev. Científica Multidiscip. Núcleo do Conheciemnto. 2017;13:1–7.
13. Kelly TL, Berger N, Richardson TL. DXA Body Composition : Theory and Practice. Appl. Radiat. Isto. 1998;49(5):511–3.
14. Alves WJ, Malheiros EB, Sakomura NK, da Silva EP, da Silva Viana G, de Paula Reis M, Gonçalves CA, Suzuki RM. In vivo description of body growth and chemical components of egg-laying pullets. Livest. Sci. Elsevier B.V.; 2019;220(September 2018):221–9.
15. Mazzuco H, Hester PY. The effect of an induced molt and a second cycle of lay on skeletal integrity of white leghorns. Poult. Sci. 2005;84(5):771–81.
16, Mitchell AD, Rosebrough RW, Taicher GZ, Kovner I. In vivo measurement of body composition of chickens using quantitative magnetic resonance 1. Poultry Science Association Inc.; 2011;90:1712–9.
17. Gous RM, Moran ET, Stilborn HR, Bradford GD, Emmans GC. Evaluation of the parameters needed to describe the overall growth, the chemical growth, and the growth of feathers and breast muscles of broilers. Poult. Sci. 1999;78(6):812–21.
18. Aggrey SE. Comparison of three nonlinear and spline regression models for

describing chicken growth curves. Poult. Sci. 2002;81(12):1782–8.

19. Aggrey SE. Logistic nonlinear mixed effects model for estimating growth parameters. Poult. Sci. 2009;88(2):276–80.

20. Rowland LO, Harms RH. The Effect of Wire Pens, Floor Pens and Cages on Bone Characteristics of Laying Hens. Poult. Sci.[Internet]. Poultry Science Association Inc.; 1970;49(5):1223–5. Available from: http://dx.doi.org/10.3382/ps.0491223.

21. Whitehead CC. Overview of bone biology in the egg-laying hen, Poult, Sci, 2004;83(2):193–9,

22. Schreiweis MA, Orban JI, Ledur MC, Moody DE, Hester PY. Effects of ovulatory and egg laying cycle on bone mineral density and content of live white leghorns as assessed by dual-energy X-ray absorptiometry. Poult. Sci. [Internet]. Poultry Science Association, Inc.; 2004;83(6):1011–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1093/ps/83.6.1011.

23. Fleming RH, Mccormack HA, Mcteir L, Whitehead CC. Relationships between genetic, environmental and nutritional factors influencing osteoporosis in laying hens. Br. Poult. Sci. 2006;47(6):742–55.

24. Scolari TMG. Osteoporose em poedeiras comerciais: uma doença metabólica multifatorial. [Internet]. Embrapa Suínos e Aves, 2007. Available from: http://www.avidite.com.br/cet/trabalhos.php?codigo=98.

25. Bishop SC, Fleming RH, Mccormagk HA, Flock DK, Whitehead CC. Inheritance of bone characteristics affecting osteoporosis in laying hens. Br. Poult. Sci. 2000;41(1):33–40.

26. Neijat M, Casey-Trott TM, Robinson S, Widowski TM, Kiarie E. Effects of rearing and adult laying housing systems on medullary, pneumatic and radius

bone attributes in 73-wk old Lohmann LSL lite hens. Poult. Sci. [Internet]. Poultry Science Association Inc.; 2019;98(7):2840–5. Available from: http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez086.

27. Jr DCL, Fulton RM, Hester PY, Karcher DM, Kjaer JB, Mench JA, Mullens BA, Newberry RC, Nicol CJ, Sullivan NPO, Porter RE. Hen welfare in different housing systems. 2011;90:278–94.

29. Nasr MAF, Murrell J, Wilkins LJ, Nicol CJ. The effect of keel fractures on egg-production parameters, mobility and behaviour in individual laying hens, Anim, Welf. 2012;21(1):127–35.

30. Nasr MAF, Nicol CJ, Murrell JC. Do laying hens with keel bone fractures experience pain? PLoS One. 2012;7(8).

CAPÍTULO 3 – DESEMPENHO E QUALIDADE ÓSSEA DE FRANGAS POEDEIRAS EM CRESCIMENTO

Este capítulo foi redigido conforme as normas da revista **Journal Bone and Mineral Research**

RESUMO: Os minerais desempenham importante papel na vida dos seres vivos por isso seu adequado fornecimento na dieta é importante, nas aves sua representação varia de 3% a 4% do peso vivo relacionando-se diretamente com o desenvolvimento e mineralização óssea. Objetivou-se com a pesquisa avaliação macroscópica do tibiotarso direito em três linhagens de poedeiras, Dekalb White, Lohmann Brown e Lohmann White, a partir de um dia a 126 dias de idade. Foram utilizadas 270 aves de postura distribuídas em delineamento ao acaso, com três tratamentos (Dekalb White, Lohmann White e Brown) e seis repetições, sendo cada repetição representada por uma gaiola contendo 15 aves, totalizando 90 aves de cada linhagem, que posteriormente foram sacrificadas de acordo com a idade (1,7,14,28,56,70,77,84,98,112 e 126 dias de idade) para coleta dos tibiotarsos direito para determinação do comprimento do osso, índice Seedor, epífises proximal e distal, diáfise, conteúdo mineral ósseo (Ca). Todos os dados relacionados ao crescimento ósseo foram ajustados para cada parâmetro do modelo logístico e para análise do conteúdo de cálcio ósseo foi realizado uma ANOVA com teste de média Tukey à 5% de probabilidade através do software SAS versão 9.4. O comprimento ósseo apresentou-se de forma similar nas três linhagens estudadas (0,042/dia) apresentando diferenças quanto ao ponto de inflexão, sendo a Dekalb White aos 29 dias, Lohmann White aos 30 dias e as Lohmann Brown aos 31 dias de idade. Esse constante crescimento quanto ao comprimento ósseo é importante, pois auxilia as aves nas funções mecânicas, principalmente de sustentação ao peso corporal. Quanto ao perímetro das epífises proximal e distal as aves das linhagens Lohmann Brown apresentaram valores superiores em relação as aves Dekalb White e Lohmann White, evidenciando adaptação bioquímica dos ossos a deposição muscular durante o crescimento. A análise de variância para a deposição de cálcio ósseo os resultados não foram significativos ($p = 0.9204$) aos 28 dias de idade entre as três linhagens. No entanto, foi observado que a deposição do cálcio aumentou proporcionalmente com a idade. Assim, ressaltamos que os parâmetros ósseos medidos demostraram que as aves da linhagem Lohmann Brown obtiveram os melhores indicadores de crescimento ósseo, o que poderá refletir em sua vida produtiva, seguido da Lohmann White e Dekalb white.

Palavras-chave: CÁLCIO ÓSSEO; COMPRIMENTO; EPÍFISE DISTAL; EPÍFISE PROXIMAL; LOHMANN BROWN

INTRODUÇÃO

Os minerais desempenham importante papel na vida dos seres vivos, atuando como componentes estruturais de órgãos e tecidos do corpo e constituintes dos fluidos corporais na forma de eletrólitos envolvidos na manutenção da homeostase, catalisadores, reguladores de processos enzimáticos e hormonais, por isso o adequado fornecimento de

minerais na dieta é importante, em aves sua representação varia de 3% a 4% do peso vivo. [1,2,3]

No organismo das aves o cálcio (Ca) é um dos minerais em maiores quantidades, preponderante ao crescimento, relacionando-se diretamente com o desenvolvimento e mineralização óssea, sendo cerca de 98% presente no esqueleto na forma de hidroxiapatita ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$) e 2% se encontra em sua forma ionizada (Ca^{2+}) no fluido intra e extracelular desempenhando papéis importantes no metabolismo. [4]

Segundo [5] a importância do cálcio no suprimento nutricional das poedeiras consiste na sua atividade acerca das funções vitais, estruturais e, dentre demais incumbências, auxilia na formação do ovo, compondo boa parte do peso da casca, auxiliando em sua qualidade externa e proteção do seu conteúdo interno. No entanto, a baixa rigidez óssea e disfunções esqueléticas, como a osteoporose, é uma realidade nas poedeiras modernas. [6,7] Essas aves, passam por remodelação óssea diária para a formação de casca de ovo, que ocorre mais de 300 vezes durante o ciclo de postura, o que representa 900 g de cálcio do sistema esquelético da galinha em sua vida útil. [8]

Desta forma, é importante o cuidado no desenvolvimento da ave por completo, que além do crescimento de todos os tecidos como um todo, destaca-se o desenvolvimento de sua estrutura óssea, compreendendo o crescimento do osso cortical e trabecular, e antes do início da postura, o diâmetro dos ossos longos (úmero, tibiotarso, fêmur) tende aumentar em aproximadamente 20%. [6,9] Esse aumento no diâmetro é importante pois é considerado ponto de avaliação para a integridade óssea, servindo como critério de avaliação à resistência óssea ao longo da vida, e se compararmos ao humano, esse aumento no diâmetro ósseo se mostra positivamente correlacionado com a resistência à flexão do osso. [10]

A importância dos ossos como fonte de Ca depende muito de sua concentração na dieta, ou seja, se sua concentração for acima de 3,6% a deposição na casca será derivado diretamente da absorção pelo intestino, todavia, se a concentração for menor que 2%, o Ca presente nos ossos irá suprir 30 – 40% do Ca presente na casca e, em dietas deficientes deste mineral, a fonte exclusiva de fornecimento será o esqueleto, justificando a necessidade das avaliações quanto as características provenientes dos ossos das aves. [11,12] Essa contínua seleção para características ósseas em poedeiras pode gerar linhagens distintas com relação às propriedades mecânicas dos ossos, ou seja, a melhora do bem-estar dessas aves através da seleção de variáveis de integridade óssea. [12]

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliação morfológica do tibiotarso direito, compreendendo o comprimento do osso, índice Seedor, epífises proximal e distal e a diáfise, conteúdo mineral ósseo (Ca) em três linhagens de poedeiras comerciais Dekalb White, Lohmann White e Lohmann Brown em idades de crescimento alojadas em gaiolas convencionais.

MATERIAL E MÉTODOS

Cuidado e uso de animais

Todos os procedimentos adotados neste estudo envolvendo cuidados e o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, sob protocolo nº 006425/18.

Aves, alojamento, desenho experimental e dietas

Foram utilizadas 270 aves de postura Lohmann e Dekalb nas variedades branca e marrom, que permaneceram em estudo do primeiro ao 126 dias de idade, distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com três tratamentos (Dekalb White,

Lohmann White e Brown) e seis repetições cada, sendo a repetição representada por uma gaiola contendo 15 aves, totalizando 90 aves de cada linhagem.

As aves foram alojadas em galpão experimental dotado de sistema de ventilação por pressão negativa, equipado com sistema de controle de temperatura. O aquecimento na fase inicial foi feito por luz infravermelha de 400W. As pintainhas foram alojadas em gaiolas com 100 cm de comprimento x 80 cm de largura x 30 cm de altura, forrada com papel kraft, e após 6 semanas foram transferidas e alojadas em gaiolas com as seguintes dimensões, 50 cm de comprimento x 50 cm de largura x 30 cm de altura, em galpão climatizado com temperatura mínima de 19º C e máxima de 24º C. As gaiolas eram de material galvanizado, equipadas com comedouro tipo calha e bebedouro tipo *nipple*, durante as 18 semanas de idade o fornecimento de água e ração foi *ad libitum*. Nas primeiras seis semanas, a iluminação e o calor foram fornecidos diariamente por 24 horas por lâmpadas infravermelhas. Da sexta à décima semana, o programa de luz adotado foi de 12 h de luz:12 h de escuro e, mantida até as 18 semanas de idade. Foi realizada a primeira debicagem aos 8 dias de idade e a segunda com 10 semanas de idade. O programa de vacinação adotado segue no anexo I.

Foi adotado um programa de alimentação em cinco fases de acordo com cada idade: ração pré-inicial (1 a 21 dias), inicial (22 a 42 dias), crescimento (43 a 84 dias), pré-postura I (85 a 105 dias) e pré-postura II (106 a 126 dias). As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais das linhagens, de acordo com o manual de manejo de cada linhagem, garantindo que não houvesse nenhum tipo de limitante, conforme detalhado na Tabela 1.

Avaliação macroscópica óssea

Objetivando a integridade óssea, as aves foram eutanásiadas por inalação de dióxido de carbono (CO_2), respeitando as normas do CONCEA. Posteriormente foi realizada a

retirada dos membros pélvicos de cada ave, seguida da dissecação, retirando a pele, músculos e ligamentos, isolando e identificando os tibiotarsos direitos com base em suas respectivas idades (1, 7, 14, 28, 56, 70, 77, 84, 98, 112 e 126 dias) e armazenados em sacos plásticos em freezer à -20ºC.

Na análise macroscópica óssea, os tibiotarsos direitos, sem suas respectivas cartilagens, foram pesados em uma balança semi-analítica de precisão (0,001g) modelo MARKL L 1002, e realizada as medidas de comprimento com o auxílio de uma régua e os perímetros das epífises proximal e distal e da diáfise (respeitando os contornos). Em seguida foi obtido o índice de Seedor, o qual corresponde aos valores do peso (g) dividido pelo seu comprimento (cm). [13]

Tabela 1. Ingredientes e composição nutricional das dietas

Ingredientes g/kg	Age (Days)				
	0-21	22-42	43-84	85-105	106-126
Corn (7,88%)	578,5	580,9	650,0	650,0	644,3
Wheat Bran	50,0	50,0	32,9	50,0	0,0
Soybean Meal (45%)	300,0	300,0	261,0	244,2	246,2
Soybean Oil	28,0	27,8	14,9	16,7	27,9
Dicalcium Phosphate	20,8	20,2	19,8	18,4	21,3
Limestone	9,90	10,2	10,9	11,9	49,9
NaCl	3,50	3,30	3,00	3,00	3,00
$NaHCO_3$	1,00	1,00	1,40	1,80	1,80
Mineral vitamin premix[1]	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
DL-Met (99%)	2,10	2,10	1,80	1,10	2,00
L-Lys (54,6%)	2,90	1,60	1,40	0,00	0,60
L-Thr (98%)	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
Choline Chloride (60%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Calculated composition					
CP (g/kg)	193 (180)	192 (210)	177 (183)	170 (193)	164(163)
AMEn (kcal/kg)	3000	3000	3000	3000	3000
Ca (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	25,0
Fd (g/kg)	5,00	4,90	4,70	4,50	4,80
Na (g/kg)	1,80	1,70	1,70	1,80	1,80
K (g/kg)	7,90	7,90	7,20	7,10	6,60
Cl (g/kg)	2,80	2,70	2,50	2,50	2,50
Lys (g/kg)	10,50	9,80	8,80	7,70	7,80
Met (g/kg)	4,80	5,50	4,70	4,20	4,30
Met + Cys (g/kg)	7,40	7,40	6,70	5,90	6,60
Thr (g/kg)	6,90	6,50	6,00	5,80	5,60
Val (g/kg)	7,90	10,0	8,60	9,10	6,80
Trp (g/kg)	2,20	2,10	1,90	1,90	1,80

[1]Provided per kilogram of diet: manganese = 150 g, iron = 100 g, zinc = 100g, copper = 16 g, iodine = 1.5 g, selenium = 300 mg, folic acid = 1 mg, pantothenic acid = 15 mg, niacina = 40 mg, biotin = 0.060 mg, vitamin B1 = 1.8 mg,

vitamin B12 = 0.012 mg, vitamin B2 = 6 mg, vitamin B6 = 2.8 mg, vitamin A = 8250, vitamin D3 = 2.000 UI, vitamin E = 15 mg, vitamin K3 = 1.8 mg. Values between parentheses represented analyzes composition.

Composição mineral óssea

A determinação dos teores cálcio do tibiotarso em aves com 28, 84 e 126 dias de idade, foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da FCAV/UNESP, Jaboticabal (LANA). Os ossos foram descongelados em temperatura ambiente por 24 h, posteriormente, submetidos à pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55ºC por 72 horas. Na sequência os ossos foram triturados em moinho tipo bola e o conteúdo colocado em papel filtro para serem desengordurados em éter de petróleo utilizando o extrator Soxhlet pelo período de 5 horas, posteriormente secos a 105ºC em estufa de circulação forçada de ar pelo período de 16 horas obtendo os valores de matéria seca.

O conteúdo mineral do tibiotarso foi analisado no Laboratório do Departamento de Tecnologia da Faculdade da FCAV/UNESP, Jaboticabal, utilizando espectrometria de absorção atômica no extrato obtido por via úmida (nítrico-perclórico) direto do material moído. Os métodos foram aplicados [14] e expressos como porcentagem de matéria seca desengordurada ou matéria mineral.

Análise estatística

Todas as análises dos dados foram realizadas por meio do software SAS 9,4 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para análise dos dados de conteúdo de cálcio ósseo, foi feito um arranjo em esquema fatorial cruzado 3x3 (3 linhagens x 3 idades), com três repetições, os mesmos foram submetidos análise de variância usando o procedimento PROC MIXED. Em todos os casos o banco de dados foi avaliado para garantir que as respostas não fossem influenciadas por valores outliers (valores fora da região entre 3 e -3) ou influentes (3*n parâmetros/n de observações) e havendo significância foi aplicado o teste de média Tukey com 5% de probabilidade.

Utilizando o procedimento PROC NLMIXED utilizado para ajustar o modelo logístico para avaliar o comprimento ósseo, índice Seedor, epífises proximal, distal e diáfise em relação a idade da ave, como descrito:

$$Y = \frac{L}{[1 + \exp^{-k\,(X - X*)}]}$$

Onde, Y é o valor observado (de peso ósseo, área cortical óssea, BMC, BMD e resistência óssea) na idade X (dias); L é o peso a maturidade (kg ou g); k taxa de crescimento por dia; X é a idade da ave (dia) e X^* é idade em que a taxa de crescimento é máxima, ponto de inflexão da curva (dia/dia).

RESULTADOS

Na tabela 2 são apresentados os parâmetros estimados pela função logística para o comprimento ósseo e índice Seedor. Observou-se que a taxa de crescimento (k) para o comprimento ósseo foi similar nas três linhagens estudadas 0,042 / dia, apresentando diferenças no ponto de inflexão (X*), no qual aves Dekalb White obtiveram seu máximo comprimento aos 29 dias de idade, enquanto que as Lohmann White aos 30 dias e as Lohmann Brown aos 31 dias de idade. Isso mostra que as três linhagens apresentaram desenvolvimento em relação ao comprimento do osso similar, apenas com pequenas variações. Quanto ao o parâmetro L, ou seja, o ponto em que a curva apresenta sua assíntota, foi representativo as aves Lohmann Brown 12,90 cm, apresentando uma variabilidade de 10,47% do parâmetro dentro da linhagem e, a Dekalb White apresentou comprimento de 12,36 cm. Esse constante crescimento quanto ao comprimento ósseo é importante, pois o osso cortical está em constante formação nessa fase de crescimento, auxiliando as aves nas funções mecânicas, principalmente de sustentação ao peso corporal.

O índice Seedor, que é a relação entre o peso ao comprimento ósseo, foi melhor para Lohmann Brown 0,766 g/cm em comparação a Dekalb White 0,623 g/cm e a Lohmann

White 0,559 g/cm, com taxa de crescimento de 0,051 / dia tendo seu ponto de inflexão aos 49 dias de idade. A variação quanto ao índice de Seedor entre as linhagens foi de 20,32% da Lohmann Brown e Dekalb White e 25,61% para as aves da mesma linhagem (Lohmann). Os nossos achados para o índice Seedor são positivos pois serve como indicativo da densidade óssea, pois quanto maior este índice, maior a densidade da peça óssea e vice-versa.

Tabela 2. Estimativa dos parâmetros da função logística para comprimento e índice Seedor do tibiotarso direito de frangas poedeiras em diferentes idades

Parameter	Bone Length			Seedor Index		
	DW	LB	LW	DW	LB	LW
L (cm)	12.36 ± 0.17	12.90 ± 0.12	12.32 ± 0.17	0.623 ± 0.02	0.766 ± 0.02	0.559 ± 0.01
K (/ day)	0.043 ± 0.002	0.042 ± 0.002	0.041 ± 0.002	0.044 ± 0.004	0.051 ± 0.004	0.047 ± 0.003
X* (days)	29 ± 1.21	31 ± 0.83	30 ± 1.25	50 ± 2.78	49 ± 2.14	47 ± 1.98

DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; ± SE – Erro Padrão.

Como estamos avaliando o crescimento ósseo com base nos parâmetros do tibiotarso, sendo o mesmo caracterizado como osso longo, ou seja, apresenta em sua constituição epífises proximal e distal e a diáfise, que de modo geral apresentou correlações positivas ao comprimento, conferindo as aves desenvolvimento ósseo seja em tamanho e forma. Desta forma, o perímetro da epífise proximal para a Lohmann Brown foi bastante representativo com 6,78 cm, com variação de 7,50% para a Dekalb White (6,07 cm) e 8,97% para a Lohmann White (5,59 cm). A taxa de crescimento a epífise proximal foi maior à Lohmann White 0,036 / dia, com diferença de 0,006 /dia as aves Lohmann Brown e Dekalb White, isso refletiu diretamente quando ao ponto de inflexão sendo essas aves (Lohmann White) mais precoces (25 dias) em comparação com as demais linhagens, conferindo as aves uma precocidade quanto a angulação dos seus movimentos entre os ossos do esqueleto, principalmente ao tibiotarso e fêmur devido a sua

intensificação de carga (Tabela 3 e Fig. 1A). Para a diáfise as aves Lohmann Brown apresentaram um crescimento constante 2,44 cm, com variação de 3,04% as aves Dekalb White, uma vez que apresentaram similaridade quanto ao parâmetro L. A taxa de crescimento foi maior para as aves da linhagem Lohmann Brown 0,054 / dia, com diferença de 0,020/ dia em relação as aves Dekalb White, tendo o seu ponto de inflexão aos 21 dias. Desta forma, podemos afirmar que os valores obtidos nessa pesquisa para comprimento ósseo, perímetro de epífises proximal, distal e da diáfise, estão intimamente interligados quanto ao desenvolvimento dos ossos trabecular e cortical no tibiotarso permitindo crescimento em comprimento e largura, portanto, a avaliação dos atributos ósseos em termos de subpartes ósseas pode levar a um melhor entendimento da dinâmica óssea, refletindo diretamente a resistência óssea e bem-estar (Tabela 3 e Fig. 1B).

Na epífise distal as aves Lohmann White também apresentaram-se bastante precoce com taxa de crescimento 0,056 / dia e ponto de inflexão aos 17 dias de idade, sendo mais precoce em 3 dias que a Lohmann Brown (20 dias), mesmo assim as aves da linhagem Lohmann Brown apresentaram maior epífise distal (5,14 cm) em relação a Lohmann White (4,58 cm) essa variação dentro da linhagem foi de 8,66% (Tabela 3 e Fig, 1C). Essa diferenciação no crescimento das epífises e diáfise evidencia uma adaptação bioquímica dos ossos para suportar a deposição de massa muscular durante o crescimento.

Tabela 3. Perímetro das epífises proximal, distal e diáfise do tibiotarso direito de frangas poedeiras em diferentes idades de crescimento

Parameter	Proximal Epiphysis cm)			Diaphysis (cm)			Distal Epiphysis (cm)		
	DW	LB	LW	DW	LB	LW	DW	LB	LW
L (cm)	6,07 ± 0.22	6.78 ± 0.19	5.59 ± 0.13	2.47 ± 0.10	2.44 ± 0.05	2.20 ± 0.06	4.78 ± 0.15	5.14 ± 0.06	4.58 ± 0.07
k (/ day)	0.029 ± 0.003	0.030 ± 0.002	0.036 ± 0.003	0.034 ± 0.006	0.054 ± 0.007	0.037 ± 0.005	0.036 ± 0.005	0.052 ± 0.004	0.056 ± 0.007
X* (days)	31 ± 3.25	36 ± 2.43	25 ± 2.13	21 ± 3.80	21 ± 1.88	17 ± 2.51	17 ± 2.81	20 ± 1.15	17 ± 1.56
R^2	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.98

DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; ± SE – Erro Padrão.

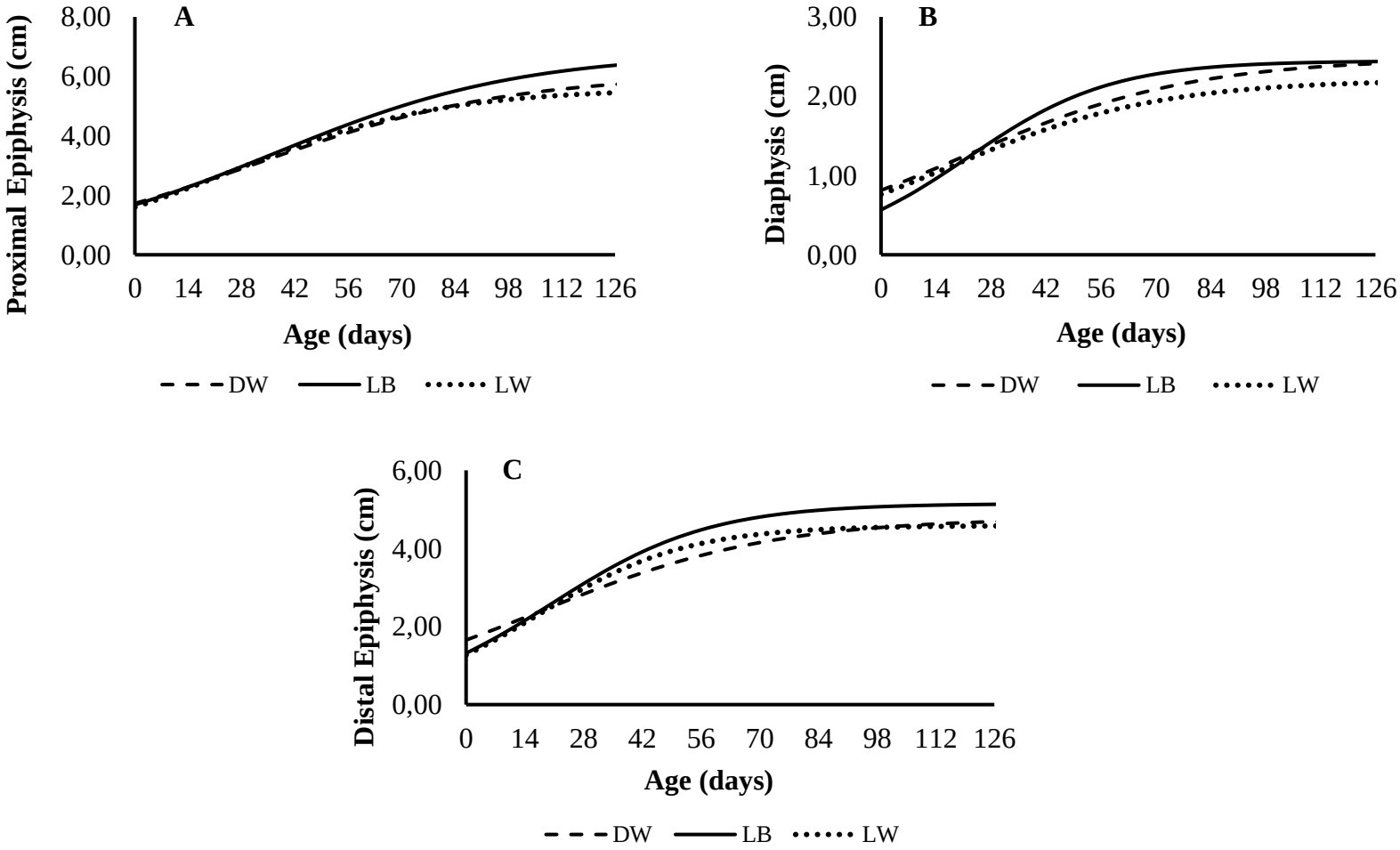


Fig. 1. Representação gráfica do perímetro da epífise proximal (A), diáfise (B) e a epífise distal (C) do tibiotarso direiro de três linhagens distintas com diferentes idades.

As médias para o conteúdo de cálcio ósseo nas três linhagens de poedeiras comerciais, em 28, 84 e126 dias de idade, estão apresentadas na Tabela 4. A análise de variância mostra que não houve efeito significativo (p = 0,9204) aos 28 dias de idade entre as três linhagens estudadas (Lohmann Brown, Lohmann White e Dekalb White). Já aos 84 e 126 dias de idade houve efeito significativo (p = <,0001) para as aves Lohmann Brown que se mostrou mais eficiente na deposição do cálcio ósseo em relação as demais. No entanto, se avaliarmos as médias para cada linhagem nas três idades, observamos que a deposição do cálcio foi aumentando com o avançar da idade, isso mostra que houve interação da idade para a deposição do cálcio, em que, à medida que as aves cresciam aumentava a de deposição do cálcio no osso, evidenciando como as três linhagens foram eficientes na absorção deste mineral, principalmente por este ser importante na vida produtiva de aves poedeiras.

Tabela 4. Médias da deposição de cálcio em poedeiras em fase de crescimento

Age (days)	Bone calcium deposition (g)				
	DW	LB	LW	Média	P-valor
28	0.2103^{Ac}	0.1647^{Ac}	0.1727^{Ab}	0.1826 ± 0.02	0.9204
84	1.1553^{Bb}	1.6553^{Ab}	0.8857^{Ba}	1.2321 ± 0.39	<.0001
126	1.5026^{Ba}	2.2840^{Aa}	1.1087^{Ca}	1.6318 ± 1.63	<.0001
Média	0.9561 ± 0.95	1.3680 ± 1.36	0.7224 ± 0.72	1.0155 ± 0.47	
P-valor	<.0001	<.0001	<.0001		

Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas diferentes, na coluna e na linha, respectivamente, diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade,
DW – Dekalb White; LB – Lohmann Brown; LW – Lohmann White; ± SE – Erro Padrão.

DISCUSSÃO

A seleção contínua para características ósseas em poedeiras comerciais podem gerar linhagens distintas com relação às propriedades mecânicas dos ossos sem alterar negativamente os índices zootécnicos, como a produção de ovos e o peso corporal, assim

como através de uma dieta balanceada de acordo com exigência da linhagem e sua fase produção. Desta forma os achados nesta pesquisa mostram o quanto é importante a integridade esquelética de uma ave longeva tendo consequências positivas em sua saúde.

Como sabemos a estrutura esquelética de uma poedeira comercial apresenta desenvolvimento completo na fase de recria, esse desenvolvimento é baseado no crescimento longitudinal e em espessura dos ossos longos do esqueleto apendicular, que se dá pelo processo de ossificação endocondral e ossificação intramembranosa, respectivamente. [7] Desta forma, podemos observar que os resultados obtidos para o comprimento ósseo e sua relação com as epífises mostra como a ossificação endocondral se desenvolveu bem ao crescimento das aves, uma vez que, esse processo de ossificação se desenvolve a partir da cartilagem hialina, com ocorrência na maioria dos ossos longos, principalmente na epífise proximal a qual aumenta em comprimento e tamanho com o crescimento da cartilagem epifisária, permitindo maior movimentação entre os ossos do esqueleto [15] (Tabela 3).

Além disso, salientamos que ossos em crescimento apresentam regiões fisiologicamente distintas, com características particulares de desenvolvimento, sendo importante conhecer as medidas fisiológicas de cada região do osso avaliado para identificar possíveis anomalias em seu crescimento. [19] Contudo, as epífises dos ossos longos são formadas principalmente por osso trabecular e a diáfise por maior quantidade de osso cortical, ou seja, o crescimento dos ossos ocorre com a formação de novos tecidos, na periferia dos ossos longos, permitindo crescimento em comprimento e largura, juntamente com a reabsorção parcial de tecido existente, pois as epífises aumentam de tamanho com o crescimento da cartilagem epifisária acompanhado por ossificação endocondral e a diáfise cresce em diâmetro e espessura [20,21] , essa condição é importante principalmente em criação de frangos de corte, devido a discondroplasia tibial [22] (Tabela

3).

Em pesquisa sobre a qualidade óssea de frangas Lohmann White [23] observaram que o tibiotarso foi mais longo em aves criadas em sistema convencionais em comparação com as frangas criadas em sistema em piso, já em sua fase final. Esses dados corroboram com os resultados do presente estudo considerando que as aves foram criadas no sistema convencional.

Estudos sobre a qualidade óssea de poedeiras de ovos brancos e ovos marrons ao final do ciclo de produção [24] constataram que as poedeiras marrons apresentaram fêmures com comprimento semelhante ao das poedeiras de ovos brancos, entretanto, o peso e a resistência à quebra foram superiores. Segundo os autores, o motivo do maior peso do fêmur ser em aves de ovos marrons é devido a espessura total do osso ser maior nestas aves e sugere uma maior quantidade de tecido ósseo no mesmo comprimento, aumentando a sua densidade, consequentemente a sua resistência óssea.

O índice Seedor é utilizado como indicativo da densidade óssea, sendo determinado pela divisão do peso do osso pelo seu comprimento e, quanto maior essa relação, maior é a densidade óssea. [25] (Tabela 2) Assim, [26] relataram que não houve efeito do índice Seedor em relação as fontes de minerais e granulometria de calcário em aves Hy-Line White com 38 semanas de idade. [27] ao avaliarem a influência do sistema de criação em piso sobre cama e gaiola sobre as características ósseas em linhagens Dekalb Brown de 52 a 72 semanas de idade, observaram que o índice de Seedor não apresentou diferenças significativas entre os dois sistemas de produção. [28] afirmaram que, o tipo de criação da ave influencia diretamente a qualidade óssea, no entanto o fator mais importante é a quantidade de atividade física realizada pela poedeira, então, aves criadas com maior espaço nas gaiolas podem apresentar boas características ósseas.

Em nossos achados observamos que as aves Lohmann Brown apresentaram um maior índice Seedor tendo sua relação direta com o comprimento, fator este preponderante para a determinação da densidade óssea da ave, pois quanto maior a densidade óssea menos riscos as aves tem em apresentar futuras fraturas, uma vez, que essa determinação da qualidade óssea está sendo determinada na fase de crescimento da ave, ou seja, fase em que as aves tendem apresentarem um pool do seu crescimento corporal e esquelético.

Sabemos que no período de produção as aves poedeiras carecem de uma grande quantidade de cálcio, seja para a manutenção do metabolismo bioquímico e para deposição na casca dos ovos, assim o fornecimento ideal de Ca é de fundamental importância para manter a força óssea. [29,30] Segundo o [31] a necessidade diária de Ca de 3,85 g/ave/dia foi reduzida para 3,25 g/ave/dia em sua última edição. [31] Neste seguimento vários são os estudos realizados para estimar o nível ideal de Ca na dieta que não venha afetar nem o desenvolvimento esquelético da ave, assim como a produção de ovos.

Contudo, [32] estudaram os efeitos de diferentes níveis alimentares de Ca e vitamina D_3 sobre o peso, teor e a concentração de cinzas no osso da ulna, fêmur, tíbia e sub-regiões da tíbia e fêmur em poedeiras Lohmann White de 74 semanas e, observaram que a ingestão de Ca de 3,4 a 4,8 g/ave/dia não afetou o peso relativo do osso em relação ao peso corporal, teor e concentração de cinzas dos ossos da ulna, tíbia e fêmur. Já [33] relataram que, com uma ingestão de Ca de 4,1 – 4,6 g/ave/dia e relação constante de 12:1 (Ca:P) não influenciou os parâmetros ósseos em poedeiras Lohmann Brown as 73 semanas de idade. Por outro lado, [34] ao avaliarem a ingestão de Ca de 2,1 - 4,2 g/ave/dia, deficiente para excesso, com nível alimentar constante de P disponível (0,40%) aumentou linearmente a densidade mineral da tíbia em galinhas Hy-lineW36 as 21 semanas de idade.

Esses estudos corroboram como os nossos achados, pois mesmo o nosso estudo não avaliando níveis de cálcio na dieta das frangas, pudemos observar que, à medida que as aves cresciam aumentava-se a deposição de cálcio no osso analisado. Isso nos mostra como as três linhagens foram eficientes na absorção deste mineral, principalmente por avaliar a deposição do cálcio no osso na fase de crescimento das aves, uma vez que este mineral é importante na vida produtiva de aves poedeiras, pois além de estar envolvido em várias funções, como na ativação de metaloproteínas da matriz óssea importantes para o crescimento e remodelação óssea, é um componente essencial para a formação da casca do ovo (Tabela 4). Nos evidenciando o quanto é importante chegar em determinado nível que atenda tanto a exigência das aves quanto ao seu estágio de crescimento, produção e integridade esquelética.

CONCLUSÃO

Diante do contexto, salientamos que estratégias nutricionais que visam minimizar algumas afecções ósseas na fase de produção e/ou aumentar a produção de ovos, mas sim em estágios iniciais do desenvolvimento esquelético, pois de acordo com os nossos achados, mostra ser mais eficiente a manutenção da saúde e produção animal das aves. Além disso, os parâmetros ósseos medidos demostraram que as aves da linhagem Lohmann Brown obtiveram os melhores indicadores de crescimento ósseo, o que poderá refletir em sua vida produtiva, seguido da Lohmann White e Dekalb white.

REFERENCIAS

1. Massuqueto A, Maiorka A, Macari M. Absorção de minerais, In: Macari M, Maiorka A. Fisiologia das aves comerciais. Jaboticabal: Funep, 2017.
2. Souza CS, Vieites FM. Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. Arch. Zootec. 2014;63(241):11.
3. Camelo A. A Importância do cálcio e fósforo na dieta de poedeiras Cálcio e

Fósforo. Groc. Multimix [Internet]. 2016; Available from: http://www.agroceresmultimix.com.br/blog/calcio-e-fosforo/

4. Veum TL. Phosphorus and calcium nutrition and metabolism, In: Vitti DMSS, Kebread E. Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals. Ed. CAB International: Oxfordshire [Internet]. 2010; Available from: https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20103120511.

5. Núñez R, Carballada F, Boquete M. Two flushing-like reaction cases from calcium pidolate who tolerated calcium carbonate. Allergol. Immunopathol. (Madr). 2012;40(5):318.

6. Swiatkiewicz S, Arczewska-Wlosek A, Jozefiak D. Bone quality, selected blood variables and mineral retention in laying hens fed with different dietary concentrations and sources of calcium. Livest. Sci. 2015;181:194–9.

7. Whitehead CC. Overview of bone biology in the egg-laying hen. Poult. Sci. 2004;83(2):193–9.

8. Anderson KE, Havenstein GB, Jenkins PK, Osborne J. Changes in commercial laying stock performance, 1958-2011: Thirty-seven flocks of the North Carolina random sample and subsequent layer performance and management tests. Worlds. Poult. Sci. J. 2013;69(3):489–514.

9. Riddell C. Non-infections skeletal desordens of Poultry: an overview. In Bone Biology and Skeletal Disordens in Poutry. 1992;23:119-145.

10. Rauch F. Bone accrual in children: adding substance to surfaces. Pediatr. 2007;119S137.

11. Murakami AE, de Moraes Garcia ER, Martins EN, Moreira I, Scapinello C, de Oliveira AFG. Effect of linseed oil inclusion in diets on the performance and bone parameters of broiler chickens. Rev. Bras. Zootec. 2009;38(7):1256–64.

12. Mazzuco H. Osteoporose em poedeiras comerciais: uma doença metabólica multifatorial. Circ. Técnica 43, Embrapa. 2005;1–8.

13. Seedor JG. The biophosphanate alendronate (MK – 217) inhibit bone loss due to ovariectomy in rats. Journal of Bone and Mineral Research. 1993;4:265-270.

14. Silva DJ, Queiroz AC. Anélise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3 ed. Editora UFV: Viçosa, MG. 2002;235.

15. Dyce KM, Sack WO, Wensing JG. Tratado de Anatomia Veterinária. 4 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2010;872.

19. Applegate TJ, Lilburn MS. Growth of the fêmur and tíbia of a commercial broiler line. Poult. Sci. 2002;81:1289-1294.

20. Fornari MB. Investigação de polimorfismo em genes associados ao desenvolvimento ósseo como marcadores moleculares para características de integridade óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte. 1-65, 2012.

21. Reece WO. Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos. 3.ed. Roca: São Paulo. 2008;468.

22. Dos Santos R de F. Parametros biofisicos e morfometricos dos ossos, musculos e cartilagens articulares de frangos de cortes saudaveis e com discondroplasia tibial 2016;1–55.

23. Regmi P, Deland TS, Steibel JP, Robison CI, Haut RC, Orth MW, Karcher DM. Effect of rearing environment on bone growth of pullets. Poult. Sci. [Internet]. The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of Poultry Science Association.; 2015;94(3):502–11, Available from: http://dx.doi.org/10.3382/ps/peu041.

24. Riczu CM, Saunders-Blades JL, Yngvesson AK, Robinson FE, Robinson FE, Korvert DR (2004) End-of-Cycle Bone Quality in White- and Brown-Egg Laying Hens. **Poultry Science,** 83:375–383.

25. Pereira R, Menten JFM, Romano GG, Silva CLS, Zavarize KC, Barbosa NAA. Eficiência de uma fitase bacteriana na liberação do fósforo fítico em dietas de frangos de corte. 2012;64:137–44.

26. Gleice M, Alves M, Bastos-leite SC, Castro C De, Dêis J, Silva B, Medeiros FM De. Substituição dos minerais inorgânicos por orgânicos e duas granulometrias de calcário na dieta de poedeiras comerciais leves. Ver. Agropecuária Técnica [Internet]. 2015;36(1):128–35. Available from: http://periodicos.ufpb.br/ojs/index,php/at/index.

27. Reis TL, Luchese RH, Adler GH, Junior CVF, Silva LG. Ósseas e a qualidade físico-química e microbiológica de ovos de galinhas. 2019;1623–30.

28. Lay Jr DC, Fulton RM, Hester PY, Karcher DM, Kjaer JB, Mench JA, Mullens BA, Newberry RC, Nicol CJ, Sullivan NPO, Porter RE. Hen welfare in different housing systems. 2011;90:278–94.

29. Mazzuco H. Integridade óssea em poedeiras comerciais: Influência da dietas enriquecidas com ácido graxos poliinsaturados e tipo de muda induzida. Circ. Técnica 47 – Embrapa. 2006;1-12.

30. Cheng TK, Coon CN. Sensitivity of Various Bone Parameters of Laying Hens to Different Daily Calcium Intakes 1 A mineral reserve in the bones of laying hens is critical to layer nutrition. The calcium and calcium : phosphorus ratio have been shown to affect the bone status. 1990;m:2209–13.

31. National Research Council (NRC). Nutrient requirements of poultry, 9th ver. Ed. The National Academies Press, Washington, DC, USA.1994. doi:10,17226/2114.

32. Akbari Moghaddam Kakhki R, Heuthorst T, Wornath-Vanhumbeck A, Neijat M, Kiarie E. Medullary bone attributes in aged lohmann lsl-lite layers fed different levels of calcium and top-dressed 25-hydroxy vitamin D 3. Can. J. Anim. Sci. 2018;99(1):138–49.

33. Safaa HM, Serrano MP, Valencia DG, Frikha M, Jiménez-Moreno E, Mateos GG. Productive performance and egg quality of Brown egg-laying hens in the late phase of production as influenced by level and source of calcium in the diet. Poult. Sci. 2008;87(10):2043–51.

34. An SH, Kim DW, An BK. Effects of dietary calcium levels on productive performance, eggshell quality and overall calcium status in aged laying hens. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 2016;29(10):1477–82.

ANEXO I

Cronograma de vacinação para poedeiras.

Idade (dias)	vacinas	Cepa	doença	Via de aplicação
1	Bio SHS viva	119/95BR	Penumovirose Marek Bouba Gumboro	Spray
7 a 16	New Vacin Bio Bronk Vet Bio Coccivet R	HB1 H120	New castle Bronquite infecciosa Coccidiose	Água
28 a 30	New Vacin Bio Bronk Vet	La Sota H120	New castle Bronquite infecciosa	Água
40	Bio Coriza	221+222+Modesto	Coriza	Peito
45 a 50	Bio SHS viva	119/95BR	Penumovirose	Água
56 a 70	Bouba das Aves forte	Bouba Forte	Epitelioma	Asa
65 a 70	New Vacin Bio Bronk Vet	La Sota H120	New castle Bronquite infecciosa	Água
90 a 105	Intermut 7 Multipla Oleosa Bio Gallinárium Bio HSH Viva	La sota H120 221+222 Modesto EDS (76) 9R	New castle Bronquite infecciosa Coriza Sind. Queda Postura Penumovirose	Peito

Fonte: Grupo de estudo Lavinesp.