



Bioteχνologias Aplicadas à Reprodução de Aves



João Paulo Ferreira Rufino
Frank George Guimarães Cruz
Pedro Alves de Oliveira Filho
Thaysa Marinho Farias
Lucas Duque Melo

2018

João Paulo Ferreira Rufino
Frank George Guimarães Cruz
Pedro Alves de Oliveira Filho
Thaysa Marinho Farias
Lucas Duque Melo

**Bioteχνologias
Aplicadas à
Reprodução de Aves**

Manaus - AM

2018

Copyright © 2018 João Paulo Ferreira Rufino, Frank George Guimarães Cruz, Pedro Alves de Oliveira Filho, Thaysa Marinho Farias e Lucas Duque Melo

Capa: João Paulo Ferreira Rufino

Diagramação: João Paulo Ferreira Rufino

Fotos: autores, acervo compartilhado e material bibliográfico referenciado

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

É proibida a apropriação da autoria total ou parcial desta obra, de qualquer forma ou por qualquer meio. A violação dos direitos de autor (Lei nº. 9610/98 de 19/12/1998) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Decreto nº. 1825, de 20 de dezembro de 1907.

Livro Digital / Digital Book – Ebook

Ficha Catalográfica elaborada por Lúcia Martins – CRB 11/451

B616

Biotecnologias aplicadas à reprodução de aves. / João Paulo Ferreira Rufino... [et al]. – Manaus: EDUA, 2018. 131 p.
Livro digital: il. col.

Inclui referências.

ISBN 978-85-526-0055-8

1. Avicultura. 2. Biotecnologia. 3. Reprodução. I. Rufino, João Paulo Ferreira. II. Cruz, Frank George Guimarães. III. Oliveira Filho, Pedro Alves de. IV. Farias, Thaysa Marinho. V. Melo, Lucas Duque. VI. Título

CDU 635.5

AGRADECIMENTOS

À Deus,
criador dos céus e da terra
pois sem Ele
nada seria possível.

A Universidade Federal do Amazonas,
pelo apoio institucional para publicação desta obra.

A equipe do Setor de Avicultura da FCA/UFAM,
por toda contribuição científica
e auxílio na elaboração desta obra.

Ao corpo docente e discente do
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFAM,
pela cessão de dados
e cooperação acadêmico.

Aos colegas pesquisadores,
pela cessão de dados e imagens
para enriquecimento desta obra.

Apresentação

A incubação artificial encontra-se na vanguarda das tecnologias que modificaram o setor avícola, e o tornaram uma área estratégica dentro da avicultura e do contexto macroscópico da produção animal. A produção de um pintainho de um dia vai muito além do simples ato de colocar ovos em uma máquina que deverá simular todos os procedimentos de choco da galinha.

Entender cada processo fisiológico, desde a formação do óvulo na galinha até o momento da eclosão do pintainho e suas primeiras horas no mundo tornou-se imprescindível para a indústria avícola. O estudo do desenvolvimento embrionário de pintainhos e as tecnologias (ou diríamos, biotecnologias) é fator primordial para a obtenção do sucesso dentro da cadeia produtiva.

A avicultura, já a alguns anos, figura dentre os carros-chefes do agronegócio brasileiro, obtendo êxito e destaque no desenvolvimento de novas tecnologias que visem o chamado “ajuste fino”, ou seja, deixamos de estudar as questões no âmbito macro, devido a riqueza de informações que já obtivemos, para direcionar nosso foco para os mínimos detalhes. No caso, dando ênfase realmente a questões minimalistas, muitas vezes a nível celular, ou mesmo estrutural das células, tecidos, órgãos ou sistemas das aves.

Neste contexto, a biotecnologia inserida na produção animal, especificadamente na avicultura, ganha destaque devido esta ser uma área que visa estudar, melhorar e desenvolver produtos e processos biológicos em associação com a ciência e a tecnologia, com contornos evidentes de multidisciplinaridade. Destaca-se ainda que a biotecnologia se encontra relacionada com qualquer aplicação tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos, ou seres derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica.

Sendo assim, esta obra objetiva disponibilizar um apanhado de informações reunidas durante quase 10 anos de estudos realizados com biotecnologias aplicadas a reprodução de aves, além do material reunido durante mais de 30 anos de atuação do Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas em pesquisas com avicultura.

Os autores

Sumário

Capítulo 1	1
1.1. Cadeia produtiva de pintos.....	2
1.2. Matrizes.....	4
1.2.1. Aspectos reprodutivos do macho.....	4
1.2.2. Aspectos reprodutivos da fêmea	7
1.2.2.1. Ovário: desenvolvimento folicular e papel endocrinológico	8
1.2.2.2. O oviduto: suas secreções e implicações no desenvolvimento embrionário.....	9
1.2.2.3. Vagina e glândulas hospedeiras de espermatozoides	12
1.2.2.4. Seleção espermática	13
1.2.2.5. Ovulação e oviposição	14
1.3. Parâmetros que afetam a incubação.....	16
1.3.1. Fatores relacionados a matriz.....	17
1.3.1.1. Idade	17
1.3.1.2. Nutrição da matriz e formação do ovo.....	18
1.3.1.3. Doenças	19
1.3.2. Fatores ambientais	20
1.3.2.1. Temperatura.....	20
1.3.2.2. Umidade relativa do ar	21
1.3.2.3. Viragem	22
1.3.2.4. Ventilação.....	23
1.3.2.5. Resfriamento	24
1.3.2.6. Estocagem dos ovos	25
1.3.2.7. Desinfecção dos ovos	27
1.4. Procedimentos industriais e manejo de incubação	27
1.4.1. Pré-incubação.....	27
1.4.2. Incubação dos ovos na máquina	29
1.4.3. Ovoscopia.....	31
1.4.4. Transferência dos ovos ao nascedouro	32
1.4.5. Retirada e manejo dos pintos com um dia.....	33
Capítulo 2.....	40
2.1. Desenvolvimento embrionário pré-postura.....	41
2.2. Desenvolvimento embrionário nas primeiras horas	42

2.3.	Mudanças na composição do ovo durante a incubação	44
2.3.1.	Casca	45
2.3.2.	Conteúdo de água	46
2.3.3.	Conteúdo de energia e sua utilização pelo embrião	48
2.4.	Fisiologia básica do embrião durante a incubação	51
2.4.1.	Função respiratória	52
2.4.2.	Função cardiovascular	54
2.4.3.	Função digestiva	57
2.5.	Características do pintainho recém-nascido	59
Capítulo 3	62
3.1.	Biotecnologia aplicada a reprodução de aves	63
3.2.	Inseminação artificial em aves	65
3.3.	Criopreservação de sêmen	71
3.4.	Nutrigenômica	73
3.5.	Sexagem in ovo	76
Capítulo 4	77
4.1.	Vacinação in ovo	78
4.2.	Administração de soluções in ovo	79
4.3.	Nutrição in ovo	82
4.4.	Principais nutrientes utilizados na alimentação in ovo	86
Referências	89

Capítulo 1

INCUBAÇÃO ARTIFICIAL

1.1. Cadeia produtiva de pintos

A incubação artificial pode ser considerada uma prática antiga na produção agropecuária, tendo em vista que há evidências datadas do século IV A.C onde os egípcios incubavam ovos em larga escala. Tanto o Egito, quanto a China, foram sociedades que utilizaram e aperfeiçoaram à técnica de incubação artificial de ovos (SALES, 2000) para a produção em escala de pintos.



Figura 1. Representação de tecnologia aplicada em incubadora rudimentar utilizada no antigo Egito (GHANY et al., 1967).

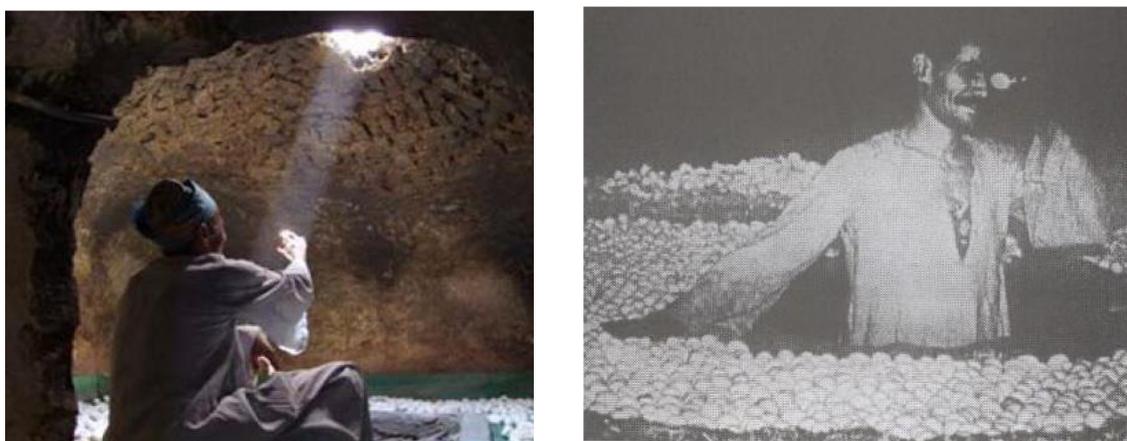


Figura 2. Procedimentos de ovoscopia rudimentar e em processo de aperfeiçoamento (GHANY et al., 1967).

No Brasil, as primeiras incubadoras disponibilizadas no mercado eram importadas, com a fabricação nacional se iniciando apenas na década de 60, com quase todos os modelos baseados nos importados. Somente na década 80 uma empresa americana se estabeleceu no Brasil, fabricando incubadoras mais modernas, com tecnologia de fácil operação, atendendo a uma forte exigência do mercado consumidor (CAMPOS, 2000).

Por muitos anos a incubação não recebeu a devida atenção dos pesquisadores e se caracterizava por uma área não estratégica dos complexos avícolas. Porém, atualmente, a avicultura moderna se volta cada vez mais para o tema incubação, com inovação nas pesquisas nos diversos parâmetros que envolvem esse segmento (CALIL, 2007). A tecnologia impulsiona esse avanço a partir do aprimoramento de equipamentos cada vez mais precisos que regulam todos os fatores que podem influenciar no sucesso da incubação dos ovos (SANTANA et al., 2014).

A incubação de ovos férteis alicerça a cadeia produtiva de aves, pois gera o produto a ser explorado em campo e seus resultados podem comprometer toda a rentabilidade do segmento. Por sua vez, o manejo empregado desde a postura dos ovos na granja de matrizes até o momento da eclosão no incubatório, interfere nos resultados de eclodibilidade e qualidade do pintainho produzido (SANTANA et al., 2014).

O conteúdo presente no vitelo e em outras estruturas do ovo dão suporte nutricional e fisiológico ao embrião durante todo o período de incubação, pois possuem todos os nutrientes necessários, fontes de energia e água que serão utilizados durante o desenvolvimento embrionário. Além desses nutrientes, os ovos necessitam de temperatura adequada e de movimentação periódica de rotação, evitando a aderência do embrião à parede interna do ovo, onde se situam as membranas internas. É fundamental o transporte de adequadas taxas de oxigênio do ar e de vapor d'água, dióxido de carbono e também calor, originados do metabolismo das células embrionárias durante a execução das etapas do desenvolvimento (SCALA JÚNIOR, 2003; SANTANA et al., 2014).

O sucesso do processo de incubação depende, em primeira instância da qualidade da matéria-prima (ovos férteis) fornecida pelas granjas de matrizes, que deve garantir a qualidade física e química dos ovos a serem incubados. A prática de manejo como seleção, classificação e desinfecção de ovos devem ser

realizadas de forma rigorosa pelo incubatório, pois estes métodos melhoram os índices de eclosão e o desempenho pós-nascimento (GERACILDA & FERREIRA, 2011).

Um bom incubatório é aquele que preserva as qualidades do ovo fértil; nada ali se cria, somente se transforma. O mais moderno, eficiente e bem controlado sistema de incubação não é capaz de produzir resultados satisfatórios se a condição sanitária, de manejo e nutricional dos reprodutores forem inadequadas, ou se o manejo dos ovos férteis entre a postura e a incubação não for cuidadosa (GONZALES, 2005).

Além disso, um lote saudável e bem manejado tende a produzir ovos incubáveis de boa qualidade. Neste contexto, a partir do momento que há a ovoposição, estima-se que naquele ovo haja um embrião com 30.000 a 60.000 células (todas com sua função futura já pré-definida). E através da maior atenção e cuidado possível com este, a incubação desta delicada estrutura embrionária estará completamente realizada.

O resultado da incubação é, portanto, o reflexo do correto manejo do processo de incubação, do cuidado na manipulação dos ovos férteis e das ótimas condições de manejo e sanidade do lote reprodutor (GONZALES, 2005).

1.2. Matrizes

1.2.1. Aspectos reprodutivos do macho

A avicultura brasileira caracteriza-se por sua dinamicidade, eficiência e produtividade, entretanto, sua constante evolução não deve cessar, principalmente em se tratando de garantias de conformidades de seus processos e produtos. Os aspectos voltados ao processo reprodutivo são de grande importância, considerando que exercem influência não somente sobre a produtividade de reprodutores, mas também no desenvolvimento das futuras progênes. Assim, o macho é importante na fertilidade do lote já que este é responsável pela fertilização dos óvulos de 10 galinhas ou mais. O objetivo principal do macho de matriz é fertilizar o óvulo e transferir seu potencial genético para a sua progênie. Portanto, na indústria avícola, o macho matriz é responsável pela fertilização, sendo necessária atenção especial ao manejo de criação (MURAKAMI & GARCIA, 2005; SANTOS, et al., 2006).

Características do sêmen como volume, concentração espermática e motilidade são influenciadas, dentre outros fatores, pela idade, aumentando nas primeiras semanas reprodutivas até alcançar a maturidade sexual completa (CEROLINI et al., 1997) e diminuindo após o período do pico de produção (HOCKING & BERNARD, 1997).

Rosenstrauch et al. (1994), ao avaliarem a fertilidade de galos Cornish nas 32^a, 48^a, 70^a e 110^a semanas de idade encontraram, respectivamente, valores de 95, 90, 75 e 15%. Observaram também redução na concentração espermática do sêmen. O epitélio seminífero dos galos foi examinado por microscopia eletrônica e foi detectada redução do diâmetro das células de Sertoli e elevação do número de espermatozoides nelas retidos com o aumento da idade, exceto em machos de fertilidade muito baixa. A fertilidade também foi avaliada pelo exame de ovos oriundos de galinhas inseminadas artificialmente e incubados por 10 dias, observando-se redução da fertilidade com o aumento da idade (ROCHA JÚNIOR & BAIÃO, 2001).

Na prática é mais fácil modificar a fertilidade do lote incidindo sobre o manejo dos machos. Substituir uma grande porcentagem de fêmeas velhas por jovens sem dúvida melhoraria a fertilidade do lote, mas é obvio que isto não seria economicamente interessante (CASANOVAS, 2004).

Anatomicamente, os testículos de galos, em número de dois, correspondem a 1% do peso vivo das aves (STURKIE & OPEL, 1976) e apresentam algumas particularidades que os diferem dos mamíferos. Eles estão localizados dentro da cavidade abdominal. Esta apresenta uma temperatura de 41-43 °C e mesmo assim ocorre a espermatogênese. A hipótese que explica a formação espermatogênica nestas condições é a que poderia haver resfriamento dos testículos através dos sacos aéreos abdominais (RUTZ et al., 2007).

Diferente da disposição em mamíferos, os túbulos seminíferos não estão agrupados em lóbulos bem delineados circundados por tecido conjuntivo, mas sim ramificam-se livremente dentro da túnica albugínea. No galo adulto, extensões da túnica penetram entre os túbulos para agirem como estrutura de suporte. O tecido intersticial é desprezível, porém contém as células de Leydig, que são secretoras de androgênios. Os túbulos seminíferos de galos imaturos são alinhados por uma camada simples de células de Sertoli e espermatogônias. Já os machos maduros possuem túbulos de forma irregular alinhados por um

epitélio germinativo de múltiplas camadas. As espermatogônias dão origem aos espermátocitos primários, secundários e espermátides. Estas últimas progressivamente se transformam em espermatozóides, por um processo denominado espermiogênese (BASKT & BAHR, 1995; RUTZ et al., 2007).

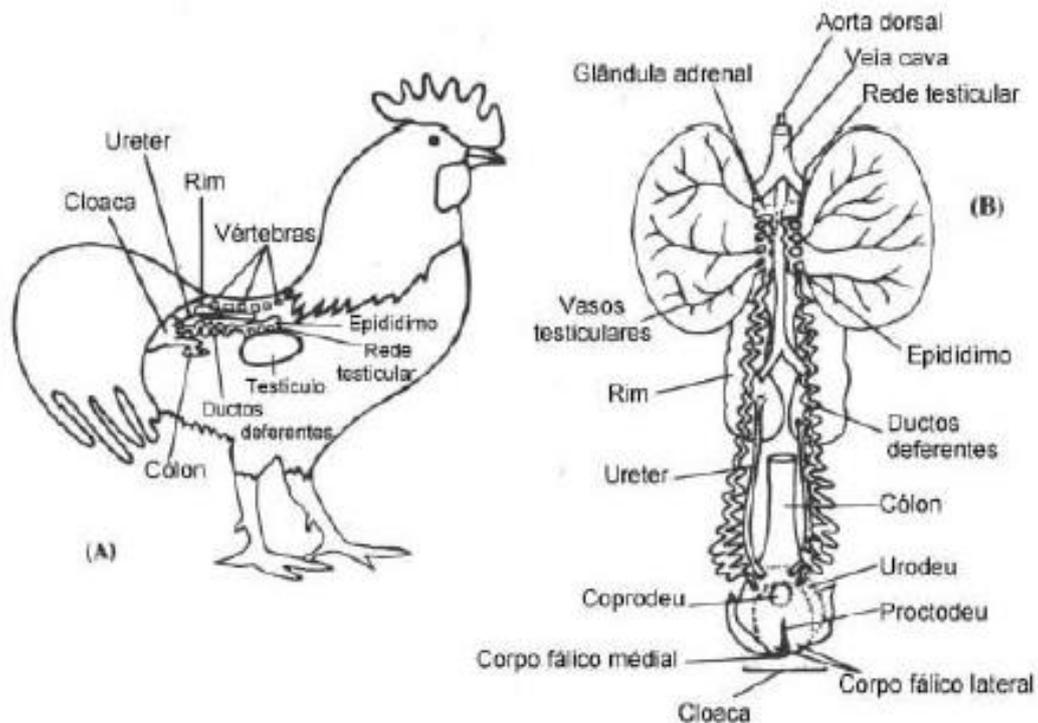


Figura 3. Aparelho reprodutor do galo (BURROWS & QUINN, 1937).

Os galos não possuem os epidídimos caracteristicamente enrolados e subdivididos como a maioria dos mamíferos. Os espermatozóides passam dos túbulos seminíferos, através dos túbulos retos, para os ductos eferentes. A partir dos ductos deferentes, os espermatozóides atravessam uma série de ductos conectados e são transportados para o lúmen dos epidídimos. Em conjunto, estes ductos são denominados de região epididimária (RUTZ et al., 2007).

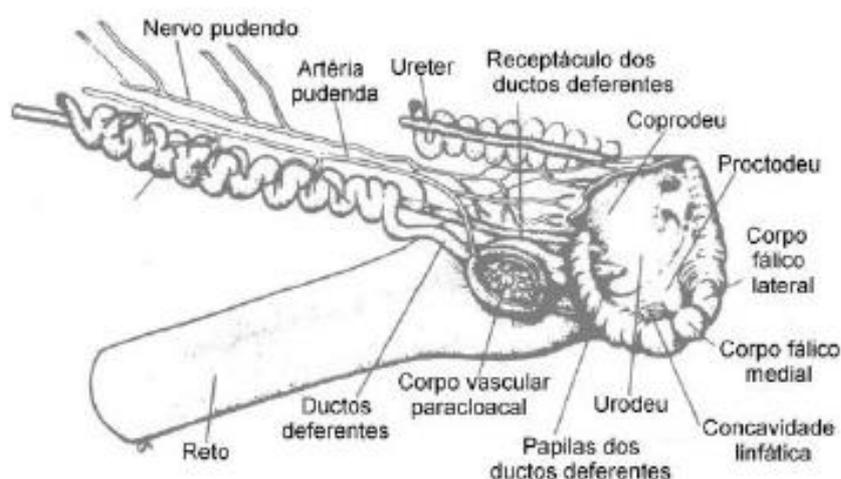
Assim, a região epididimária compreende os túbulos retos, ductos deferentes distais e proximais (ductos deferentes), um túbulo curto de conexão e o duto do epidídimo (HESS et al., 1976). Em aves, ductos compõe mais do que 70% da região epididimária, sugerindo que os ductos eferentes representam um componente mais importante da região epididimária que o túbulo reto ou duto epididimário (CLULOW & JONES, 1988). O epitélio destes ductos apresenta convulsões para aumentar a área de superfície do lúmen do ducto e consiste de

células ciliadas e não ciliadas (ETCHES, 1996). As principais funções dos ductos deferentes em todas as espécies incluem reabsorção de fluido, transporte, concentração espermática e secreção protéica (ILIO & HESS, 1994).

O duto do epidídimo abre-se dentro do duto deferente o qual é o primeiro local de armazenamento de espermatozóides no galo. O duto deferente é um tubo bastante enrolado, o qual na sua extremidade distal, torna-se reto e dilata-se levemente, passa através da parede da cloaca e termina como extensão semelhante a uma papila que se projeta dentro da cloaca (RUTZ et al., 2007).

Não existem órgãos acessórios tais como vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral associados ao duto deferente. No galo que não tenha ejaculado, os espermatozóides atravessam o duto deferente em cerca de 84 horas, ao passo que em machos que já ejacularam, os espermatozóides requerem 24 a 48 horas para atravessar (ETCHES, 1996).

O macho não tem um órgão penetrador (ex. pênis), porém um falo que faz contato com a vagina em eversão durante a cópula. A ereção do falo resulta em engurgitamento com um fluido semelhante a linfa derivado do corpo vascular paracloacal, uma extensão do falo localizado na parede da cloaca (ETCHES, 1996; ETCHES, 1999).



1.2.2. Aspectos reprodutivos da fêmea

O aparelho genital da galinha é composto por um ovário e um oviduto, que se localizam do lado esquerdo da cavidade abdominal da ave. Durante o período embrionário, o oviduto e o ovário do lado direito estão inicialmente presentes.

Entretanto, a produção de substâncias inibidoras do ducto de Müller (origem do oviduto) pelo ovário resulta em regressão do ducto direito e do ovário direito, mas não do esquerdo. O ducto esquerdo é aparentemente protegido por apresentar maior número de receptores para estrogênio, sendo assim, mais sensível ao estrogênio que o ducto direito. Aparentemente o estrogênio impede a ação de substâncias inibidoras do ducto de Müller (BAHR & JOHNSON, 1991).

O ciclo reprodutivo é comandado por diversos fatores, como o aumento da duração dos dias (aumento do período de luminosidade), que estimulam a glândula pituitária anterior das aves para a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH), aumentando o tamanho dos folículos, e da secreção do hormônio luteinizante (LH), que estimula a saída do ovo de seu folículo e também o desenvolvimento de células intersticiais produtoras de hormônios sexuais (COLVILLE & BASSERT, 2010; FREITAS et al., 2011).

1.2.2.1. Ovário: desenvolvimento folicular e papel endocrinológico

O ovário de mamíferos e de aves difere. Em mamíferos, diversos folículos podem ovular em um determinado momento dentro de um intervalo de vários dias ou semanas, enquanto que em aves um único folículo ovula e o óvulo (gema) é liberado, mas dentro de um intervalo mais curto (preferencialmente todos os dias). Além disso, tendo em vista que o embrião deve obter todos os nutrientes para o desenvolvimento embrionário, o óvulo maturo de aves é muito maior que o de mamíferos. Nas aves, os folículos grandes e amarelos, destinados a ovulação estão organizados em uma hierarquia (RUTZ et al., 2007).

Durante a vida sexualmente ativa de uma fêmea, o ovário esquerdo apresenta-se semelhante a um cacho de uva. Isso é devido ao fato de numerosos folículos arredondados e de tamanhos variados se projetarem da superfície ventral do ovário, cada folículo estando suspenso por um pedículo ou talo folicular (SISSON & GROSSMAN, 1986).

O controle da hierarquia folicular que permite a ovulação diária é estabelecido pelos folículos pequenos (6 a 8 mm). O folículo amarelo que ultrapassar 8 mm em diâmetro, entra em hierarquia, continua a desenvolver e ovula. Entretanto, eventos moleculares dentro de folículos menores (<8 mm) fazem com que muitos folículos entrem em atresia (regridem), enquanto outros folículos são selecionados para entrar em hierarquia (JOHNSON, 1993).

Uma das principais funções dos ovários é a produção de hormônios esteróides, essenciais para o crescimento e função do trato reprodutivo. A progesterona atua na secreção de albúmen e indução do pico de LH. Os androgênios atuam em características sexuais secundárias (crista e barbela). Os estrogênios atuam na síntese da gema pelo fígado, mobilização de cálcio dos ossos medulares para a glândula da casca. Ao contrário de mamíferos, as células da granulosa são a principal fonte de progesterona e de pequenas quantidades de androgênios, enquanto que as células da teca produzem androgênios e estradiol. É importante salientar que as células da granulosa não luteinizam, porque não existe a necessidade de formação de corpo lúteo, uma estrutura associada a prenhez (BAHR & JOHNSON, 1991).

Quando o ovário amadurece e os folículos individualmente começam a crescer, um pequeno disco branco, redondo, é visto na superfície de cada folículo, sob a membrana vitelina, denominado de blastodisco e contendo o material cromossômico. O disco assenta-se em cima de uma coluna de gema branca, a latebra, que se estende até o centro (SWENSON & REECE, 1996).

1.2.2.2. O oviduto: suas secreções e implicações no desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento do oviduto é estimulado por vários hormônios gonadais, embora a ação da progesterona seja mais direcionada para células secretórias, tais como aquelas responsáveis pela produção de avidina. Estrogênio e androgênio promovem o desenvolvimento de uma variedade de tecido glandular, muscular e conjuntivo dentro do oviduto (RUTZ et al., 2007).

Resumidamente, o oviduto e as partes que o compõe podem ser anatomicamente separados em cinco compartimentos. O primeiro compartimento é o infundíbulo, que capta o óvulo logo após a sua liberação pelo ovário e, caso ocorrer a presença de espermatozóide, ocorre a fertilização. Este é um processo eficiente, onde a fertilidade é uma característica atribuída ao galo, enquanto que o desenvolvimento embrionário é de responsabilidade da fêmea (RUTZ et al., 2007). Na ovulação, o infundíbulo sustenta e libera o ovócito secundário em até trinta minutos antes de incluí-lo permanentemente. E esta ovulação pode estar sob controle hormonal, mas o controle nervoso através das fibras vasomotoras ou dos nervos para o músculo liso do folículo também é

possível. Entretanto, a transecção dos nervos pélvicos e lombossacrais, que parecem ser parassimpáticos, não influenciaram na taxa e no tempo da ovulação (SISSON & GROSSMAN, 1986).

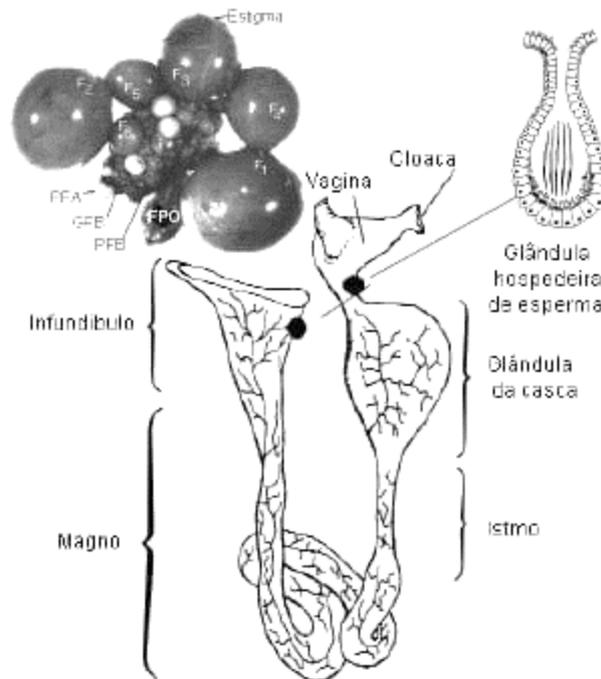


Figura 5. Sistema reprodutor da galinha (BAKST et al., 1994).

O magno é a região responsável pela secreção de albúmen, sendo esta a parte mais longa do oviduto. Este secreta e armazena albumina antes da formação do ovo e libera materiais proteínicos quando o óvulo passa através de seu lúmen. O estímulo para a liberação deste material tem sido frequentemente associado à distensão mecânica por passagem da gema. O volume de albumina que rodeia o ovo quando ele se dirige ao magno é apenas cerca de metade daquele do ovo acabado. Nessa ocasião, a albumina é mais espessa e mais viscosa do que no ovo acabado e não está separada em camadas. Os líquidos adicionados por último aumentam o volume da albumina. As duas membranas da casca são depositadas ao redor da albumina quando ela passa através do istmo (SISSON & GROSSMAN, 1986; RUTZ et al., 2007; FREITAS et al., 2011).

O istmo é a região mais curta, próxima ao útero e menos espiralada, onde se depositam as fibras de queratina, as quais entrarão na composição das

membranas da casca (GARCIA & FERNÁNDEZ, 2001; RUTZ et al., 2007). Embora a deposição da maior parte da casca do ovo ocorra, de fato, no útero, a calcificação inicial de pontos específicos na membrana ocorre no istmo (FREITAS et al., 2011).

O útero, ou glândula da casca, é um órgão muscular e secretório, onde o fluído é adicionado ao ovo e ocorre a formação da casca do ovo e deposição da cutícula (RUTZ et al., 2007; FREITAS et al., 2011).

Fisiologicamente, durante as primeiras cinco horas em que o ovo em desenvolvimento permanece no útero, o fluído é adicionado à albumina, aproximadamente dobrando seu volume. Essa adição de fluído e os efeitos mecânicos de retorcimento resultam na estratificação do ovo branco em quatro regiões reconhecíveis. Estendendo-se para fora da gema em direção a ambos os pólos do ovo, estão às calazas que são brancas, trançadas e de natureza protéica. A capa de albumina interna estende-se ao redor da gema e as calazas representam extensões dessa camada. Exatamente por fora dessa camada está uma camada branca líquida, e a seguir estão as camadas, branca viscosa e branca menos viscosa. Vale ressaltar que há uma frequente sugestão que as calazas servem para manter a gema e o embrião em desenvolvimento no centro do ovo para evitar aderências embrionárias nas membranas da casca. A casca é secretada mais ativamente durante as últimas 15 horas em que o ovo permanece no útero. Ela está composta de carbonato de cálcio (98%) e uma matriz glicoprotéica (2%). A parte cristalina da casca consiste em colunas de material mergulhado na membrana externa da casca. Essas colunas são separadas por poros que se estendem do lado externo do ovo até as membranas da casca e permitem a troca de gás pelo embrião. O lado externo da casca é uma camada proteínica, denominada cutícula, que pode bloquear a entrada de microorganismos (SISSON & GROSSMAN, 1986; SWENSON & REECE, 1996; REECE, 2008; COLVILLE & BASSERT, 2010).

Por fim, a vagina atua como passagem do ovo do útero até a cloaca. Na região uterovaginal estão localizadas as glândulas hospedeiras de espermatozoides. Os espermatozoides ali se armazenam após a inseminação artificial ou monta natural, quando então se deslocam em via ascendente em direção ao infundíbulo (RUTZ et al., 2007).

Tabela 1. Principal função e tempo médio estimado para formação do ovo de cada região do sistema reprodutor da galinha segundo Freitas et al. (2011).

Nome	Função	Tempo
Infundíbulo	Recepção dos gametas e fertilização	15 minutos
Magno	Secreção de albumina	3 horas
Ístmo	Secreção da membrana interna e externa	1 hora e meia
Útero	Produção da casca	20 a 21 horas
Vagina e Cloaca	Transporte do ovo	1 minuto

1.2.2.3. Vagina e glândulas hospedeiras de espermatozoides

As espécies avícolas apresentam semelhanças no trato reprodutivo com outras espécies animais (ex. répteis) devido a presença de sítios especializados no trato feminino, no qual os espermatozoides residem durante períodos prolongados após uma cópula. Existem dois sítios distintos nas espécies avícolas, um localizado na junção útero-vaginal e o outro na porção inferior do infundíbulo. Em ambos os sítios, os espermatozoides são armazenados nas glândulas hospedeiras, que se caracterizam por ser invaginações do epitélio do lúmen do túbulo (BAKST et al., 1994). As glândulas localizadas na junção útero-vaginal são consideradas o principal sítio de armazenamento de espermatozoide no oviduto. Já no infundíbulo vai ocorrer a fertilização. Estas glândulas armazenam espermatozoides durante um período de 3 a 4 semanas em galinhas e 8 a 15 semanas em peruas (BRILLARD, 1993), embora a percentagem de ovos férteis começa a cair dentro de 5-7 dias na galinha e de 14-21 dias na peru.

Normalmente 50-200 células espermáticas entram nas glândulas e se orientam paralelamente ao longo da glândula. A aglutinação de cabeça com cabeça dos espermatozoides é a possível explicação para a manutenção prolongada in vivo dos espermatozoides nas glândulas (TINGARI & LAKE, 1973). O mecanismo que causa a liberação das células espermáticas das glândulas não é conhecido, mas isto possivelmente ocorra com uma redução progressiva na capacidade espermática em aglutinar.

Ao avançar a idade, a duração da fertilidade é reduzida após uma única inseminação ter sido realizada. No passado foi postulado que isto ocorria em função de uma redução na capacidade de armazenamento espermático nas glândulas hospedeiras (VAN KREY et al., 1967). Alternativamente, Brillard (1993) sugere que o declínio na duração da fertilidade com a idade resulta de

uma maior facilidade da liberação dos espermatozoides das glândulas hospedeiras.

1.2.2.4. Seleção espermática

A quantidade de espermatozoides depositados na vagina das aves excede (em bilhões) o número de células espermáticas necessárias para fertilizar de 1 a 15 oócitos. Pesquisas conduzidas em perus e galináceos demonstraram que somente de 1-2% da população inicial de espermatozoides alcançam as glândulas hospedeiras da junção útero-vaginal. Destes, aproximadamente 1% (ou 0,0001% da dose utilizada na inseminação artificial) alcançam o infundíbulo (BRILLARD & BAKST, 1990; BRILLARD, 1993; BAKST et al., 1994). Na realidade, estudos iniciais demonstraram que a migração espermática aos sítios de armazenamento é um processo ativo onde a motilidade individual e progressiva é necessária. Assim, espermatozoides mortos ou que não apresentam motilidade não alcançam as glândulas hospedeiras de espermatozoides (ALLEN & GRIGG, 1957).

Tabela 2. Características seminais comparativas entre as principais espécies de animais domésticos (CBRA 1998; CBRA, 2013).

Espécie	Volume médio ejaculado (mL)	Motilidade média (%)	Concentração média (x10 ⁶ spz/mL)
Bovino	5 a 8	40 a 70	800 a 2.000
Ovino	0,80 a 1,20	60 a 80	2.000 a 6.000
Caprino	0,80 a 1,20	60 a 80	2.500 a 5.000
Suíno	150 a 200	50 a 80	200 a 300
Equino	60 a 100	40 a 75	150 a 300
Galo	0,20 a 0,50	60 a 80	3.000 a 7.000

Tendo em vista que muitos estudos tem consistentemente registrado a ausência de espermatozoides morfologicamente anormais (ex. peça intermediária dobrada, cabeça dupla e flagelo duplo) no lúmen das glândulas hospedeiras de espermatozoides, pode ser concluído que existe um mecanismo altamente eficiente na seleção espermática na vagina para eliminar grande parte da população espermática inicial, criando assim condições para a seleção de uma subpopulação limitada mas altamente selecionada de espermatozoides (<1% da dose inicial) (BRILLARD, 1993).

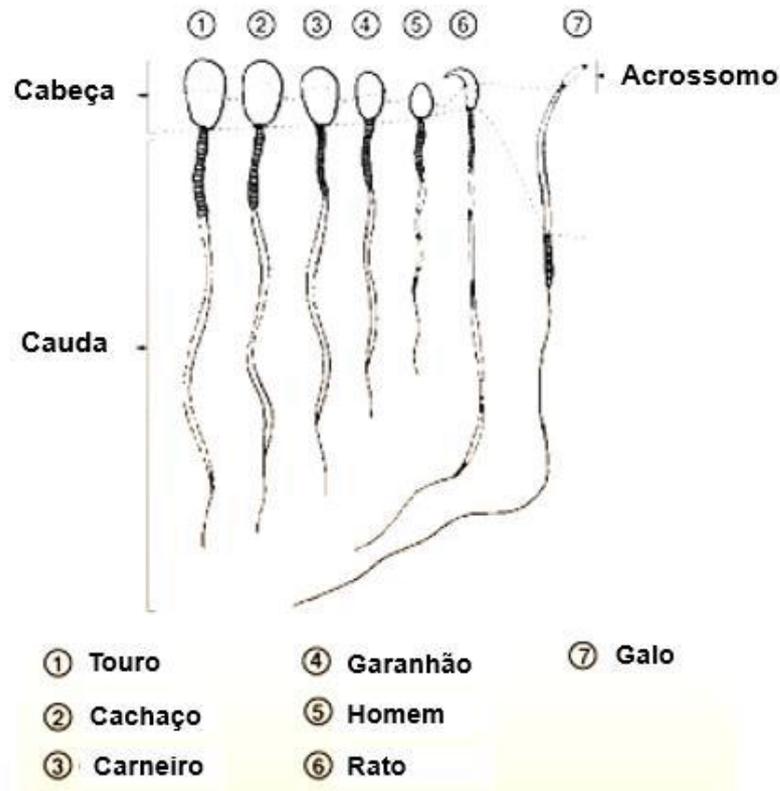


Figura 6. Morfologia seminal comparativa entre as principais espécies de animais domésticos.

1.2.2.5. Ovulação e oviposição

O ciclo ovulatório é regulado por dois sistemas independentes e sem sincronia (FRAPS, 1965). Um destes sistemas é a maturação dos sistemas esteroidogênicos do folículo mais desenvolvido (F1) (JOHNSON, 1990). Os folículos pequenos (<10 mm) são as principais fontes de estrogênio. Ao alcançar a puberdade, o estrogênio produz feedback negativo a nível da pituitária propiciando a redução na produção de LH. Uma via funcional está presente nos folículos maiores até 12 a 20 horas antes da ovulação. O folículo F1 perde a capacidade de converter progesterona em androstenediona e, conseqüentemente, a produção de progesterona pelos folículos aumenta devido a ação do LH. Na realidade, a progesterona estimula a síntese e secreção de LHRH pelo hipotálamo (KNIGHT et al., 1985). A concentração do LH plasmático apresenta um pico 4 a 6 horas antes da ovulação (JOHNSON & VAN TIENHOVEN, 1980). Este pico de LH é essencial para que ocorra a ovulação (JOHNSON, 1990).

A ovulação ocorre aproximadamente 6 horas após o pico de LH e de 15-45 minutos após a oviposição. Ao avaliar a parede celular do folículo, pode ser observada uma região estruturalmente diferente, caracterizada por ser avascular, que é denominada de estigma. Esta região é composta pelo epitélio, teca interna e externa e camada granulosa. A teca externa é composta principalmente por fibroblastos e matriz extracelular de colágeno. Antes da ovulação, a região do estigma aumenta em largura e torna-se transparente. O colágeno altera estruturalmente, tornando-se um tecido mais frágil. Estas alterações ficam restritas a região do estigma (BAHR & JONHSON, 1991).

As alterações nas fibras do colágeno ocorrem por ação de enzimas, como colagenases e proteases, que atuam na dissociação do colágeno antes da ovulação. A atividade da colagenase aumenta com a maturação folicular. A dispersão das fibras de colágeno ocorre em função da alteração da matriz que mantém unida as fibras de colágeno. Com o rompimento do estigma ocorre a ovulação (BAHR & JONHSON, 1991; RUTZ et al., 2007).

A arginina-vasotocina, um hormônio da neuro-hipófise está relacionado com a oviposição em galinhas (PROUDMAN, 1993). A oviposição é um resultado de eventos sucessivos que ocorrem a nível do oviduto, incluindo contração do útero e peristaltismo da vagina. A contração do útero é causada pela ação da arginina-vasotocina, após se ligar a um receptor do miométrio do útero (TAKAHASHI et al., 1994). Durante este processo, atuam prostaglandinas (RUTZ et al., 2007).

A oviposição ocorre aproximadamente 25-26 horas após a ovulação e após o ovo ter sido formado no oviduto. As prostaglandinas e os hormônios da pituitária posterior são os mais importantes no processo da oviposição. Dentre as prostaglandinas se destacam a PGF2a e a PGE2. A PGF2a atua na contração do útero da galinha, enquanto que a PGE2 atua na abertura útero-vaginal (BAHR & JOHNSON, 1991; ETCHESS, 1996). Assim como nos mamíferos, ocorre um mecanismo de feedback entre a arginina-vasotocina e a prostaglandina na contração do útero e oviposição (RUTZ et al., 2007).

De forma geral, o ciclo ovulatório em galinhas é caracterizado por uma sequência de ovos colocados. Esta consiste no número de dias em que ocorre a oviposição, seguido por um dia de pausa. Assim, uma vez os mecanismos de

feedback entre ovário, pituitária e hipotálamo alcançarem a maturidade de desenvolvimento, a matriz é capaz de produzir ovos (RUTZ et al., 2007).

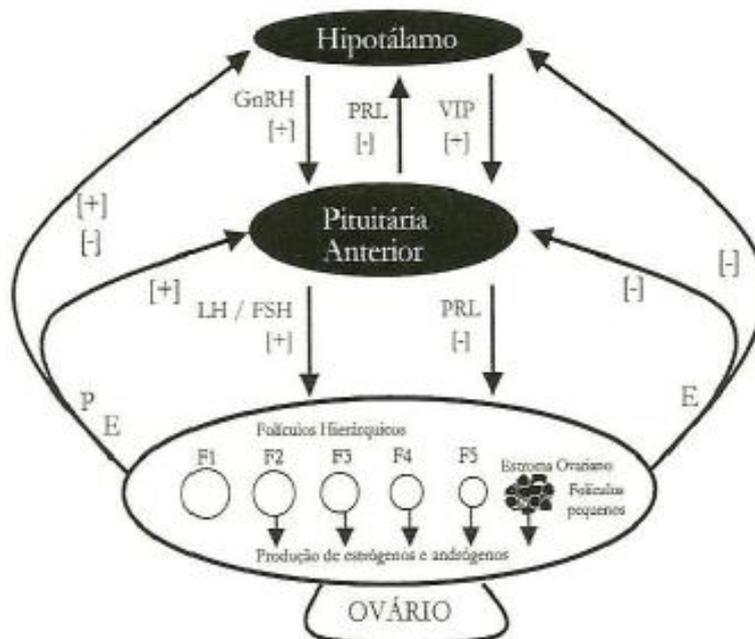


Figura 7. Funcionamento endócrino do ciclo ovulatório das galinhas: GnRH (Hormônio liberador de gonadotropinas); LH (Hormônio luteinizante); FSH (Hormônio folículo estimulante); PRL (Prolactina); VIP (Peptídeo intestinal vaso ativo); E (Estradiol); P (Progesterona); Sinais [+] e [-] indicam efeitos de retroalimentação hormonal positiva e negativa no processo reprodutivo das aves. (MACARI & GONZALES, 2003).

1.3. Parâmetros que afetam a incubação

Os ovos das aves dão suporte ao embrião durante toda a incubação, pois possuem todos os nutrientes, fontes de energia e água que serão utilizados durante o desenvolvimento embrionário. Além desses nutrientes, os ovos necessitam de temperatura adequada e de movimentação periódica de rotação, evitando a aderência do embrião à parede interna do ovo, onde se situam as membranas internas. É fundamental o transporte de taxas adequadas de oxigênio do ar e de vapor d'água, dióxido de carbono e também calor, originados do metabolismo das células embrionárias durante a execução das complexas etapas do desenvolvimento (SCALA JÚNIOR, 2003).

Nesse sentido, alguns fatores podem afetar o desempenho da incubação, como a temperatura, a umidade relativa do ar, a viragem dos ovos, fluxo de ar dentro da incubadora e condições de armazenamento pré-incubação. Além desses itens, a idade e o estado nutricional da matriz interferem na qualidade do pintainho produzido. Atualmente, todos esses fatores são controlados por equipamentos modernos, que garantem ao embrião o desenvolvimento adequado durante o período de incubação (SANTANA et al., 2014).

1.3.1. Fatores relacionados a matriz

1.3.1.1. Idade

Diversos trabalhos já verificaram que a idade da matriz tem influência direta na qualidade, composição, peso dos ovos e, conseqüentemente, um grande efeito no peso do pinto e desempenho da ave a *posteriori* (DALANEZI et al., 2004; LUQUETTI et al., 2002; NOY et al., 1997).

Em estudo desenvolvido por Luquetti et al. (2001), observando a influência de três idades de matrizes (30, 45 e 60 semanas de idade), frangos de corte provenientes de matrizes mais velhas apresentaram maior peso corporal que aqueles provenientes de matrizes jovens,

Tona et al. (2004) em outro estudo avaliando o efeito de duas idades de matrizes (35 e 45 semanas) associadas a dois períodos de armazenamento dos ovos (frescos e armazenados por sete dias) sobre o desempenho de frangos até os 42 dias de idade, verificaram que matrizes velhas produzem ovos e pintos de um dia e de sete dias, maiores que matrizes jovens e recomendam que se os ovos precisarem ser armazenados para posterior incubação, que sejam os ovos de matrizes jovens em vez dos de matrizes velhas.

Neste contexto, outros autores verificaram também que a qualidade da casca diminui com o aumento da idade da matriz, pois uma ave jovem apresenta uma taxa de retenção de cálcio de aproximadamente 60%, enquanto a matriz velha possui a retenção de apenas 40% do cálcio absorvido da dieta (BAIÃO & CANÇADO, 1997).

Vale ressaltar que uma espessura de casca inferior a 0,27 mm dificilmente mantém o embrião vivo até o fim do ciclo da incubação, sendo o melhor resultado obtido com casca de espessura entre 0,33 a 0,35 mm (SCHMIDT et al., 2003).

Outro fator importante é o peso corporal da ave relacionado a maturidade sexual, pois o peso em excesso ocasiona um grande desenvolvimento dos folículos prematuros, causando ovulações duplas, ovos defeituosos que reduzem a viabilidade do embrião (NEVES, 2005).

À medida que as matrizes envelhecem ocorre um aumento de intervalo entre ovulações, resultando em redução na taxa de postura, o que é acompanhado de um aumento no tamanho do ovo, pois a mesma quantidade de gema proveniente de síntese hepática é depositada em um menor número de folículos (ZAKARIA et al., 1983).

Sendo assim, o envelhecimento da matriz influencia diretamente na taxa de eclosão dos ovos, e após o pico de postura a produção de ovos diminui, bem como a sua fertilidade (CAMPOS, 2000).

Quanto a progênie, pintos derivados de matrizes jovens tendem a apresentar desempenho inferior ao daqueles derivados de matrizes velhas, o que é atribuído à menor quantidade de albúmen e gema dos ovos de matrizes jovens (PINCHASOV & NOY, 1993).

E os nutrientes destinados ao desenvolvimento do embrião, por serem oriundos do processo de formação do ovo (SCHMIDT et al., 2003), sofrem influência direta da idade, pois a matriz jovem tende a produzir ovos com quantidade de gema, albúmen e porosidade da casca menor (NEVES, 2005).

1.3.1.2. Nutrição da matriz e formação do ovo

Como se sabe, os fatores nutricionais são determinantes na qualidade do ovo (WASHBURN, 1982), especialmente no que se refere ao peso do ovo e qualidade, espessura, porosidade e condutância da casca, dentre outros fatores (RAHN et al., 1979).

A qualidade da casca pode ser alterada por fatores nutricionais, uma vez que o cálcio e o fósforo que são utilizados para formar a casca vem exclusivamente da dieta das aves. (BAIÃO & CANÇADO, 1997; ALBINO, 2005).

O consumo inadequado de vitamina E pode provocar problemas de fertilidade, de viabilidade embrionária e até mesmo na produção (BARRETO et al., 1999). Esse fato se agrava quando as aves são submetidas ao estresse calórico, provocado pela rápida elevação na temperatura ambiente, com repercussão na redução do consumo de ração, além de elevar e acelerar perdas

na concentração de vitamina E na dieta via oxidação (SCHEIDELER & FRONING, 1996).

A casca e a cutícula do ovo exercem uma barreira física protegendo o embrião dos microorganismos e proporcionam também a difusão dos gases respiratórios (NEVES, 2005). A casca evita ainda que ocorra perda de umidade excessiva, desidratação do ovo e fonte de cálcio para a formação do embrião. A qualidade da espessura da casca é indicada pela gravidade específica, quando a densidade for menor a 1.080 tem maior perda de umidade, mais trinca e mortalidade precoce do embrião (LAUVERS & FERREIRA, 2011).

O formato do ovo também muda a resistência da casca. O índice ideal (relação entre a largura x altura do ovo) é de 74, acima é considerado um ovo curto e redondo, e abaixo de 72 é considerado longo. Estas variações que ocorrem no formato do ovo tornam-no mais frágil ou resistente na hora da bicagem exercida pelo pintinho no processo de eclosão (SCHMIDT et al., 2003). Além disso, o ovo considerado ideal para incubação deve ser de formato ovalado, pois formatos mais compridos ou excessivamente redondos possuem tendência de quebrar durante o processo de viragem nas incubadoras (ALBINO, 2005; LAUVERS & FERREIRA, 2011).

1.3.1.3. Doenças

Perdas excessivas por mortalidade e descarte podem ocorrer nas matrizes. A base de dados AgriStats calcula que para cada 0,25% de aumento em mortalidade semanal, vai ocorrer oito ovos a menos por fêmea alojada e isso irá aumentar a desvalorização da franga 1,7 centavos/dúzia de ovos (AGRISTATS, 1993). Além destes custos diretos, perdas de fêmeas excessivamente vai também, a certo ponto, prejudicar o fluxo de produção de uma companhia (VALLE, 1999).

O Relatório Anual de 1998 da AgriStats apresenta que em uma única amostra de 49 milhões de matrizes de corte, ocorreu uma mortalidade média de produção de 16,47% em 40 semanas. O melhor complexo de 25% apresentou uma mortalidade de matrizes de 11,79% e os melhores cinco tiveram perdas de apenas 10,71%. Perdas de machos foram de 43,7%; 38,4% e 38,2% para os mesmos grupos mencionados acima. Mortalidade e descarte das fêmeas neste

estudo foram de 6,80% (41 semanas de produção) e 44,080% (40 semanas de produção) (AGRISTATS, 1999).

Com base nestes resultados, pode-se dizer que perdas semanais em matrizes na indústria americana varia entre 0,41% por semana. Na América Latina mortalidade “normal” por semana é geralmente mais baixa que nos Estados Unidos e variam entre 0,25 – 0,28% em 40 semanas de produção com algumas operações reportando níveis mais elevados principalmente no início de produção (VALLE, 1999).

Jones et al. (1978) afirma que as causas mais comuns de mortalidade em matrizes de corte foram as seguintes: problemas reprodutivos (24.9%), lesões por canibalismo (24,5%), lesões renais (9,5%), hemorragias hepáticas (7,1%), doença de Marek (4,9%) e sinovite/tenosinovite por *Staphylococcus* (4,1%). Perdas totais de fêmeas em produção foram de 11,6%; 10% e 12,4% nos lotes analisados.

Vale salientar que qualquer tipo de doença que prejudica os órgãos relacionados à absorção de cálcio e fósforo, e conseqüentemente funções metabólicas e de formação do ovo, compromete a qualidade do ovo produzido (BAIÃO & CANÇADO, 1997).

1.3.2. Fatores ambientais

1.3.2.1. Temperatura

A temperatura é o requisito físico mais importante e crítico que afeta diretamente na determinação da eclodibilidade de pintos (DECUYPERE & MICHELS, 1992), além de estar diretamente relacionada com o desenvolvimento do embrião e com todos os demais parâmetros que devem ser controlados durante a incubação (SANTANA et al., 2014).

Vários estudos foram realizados ao longo dos anos para a determinação da temperatura ideal e as variações aceitáveis durante a incubação de ovos férteis. Barott (1937) citado por Decuypere et al. (2003) já demonstrava que 37,8°C poderia ser considerada a temperatura ideal para a obtenção de uma boa eclodibilidade dos pintainhos. Além disso, esse mesmo autor verificou que a variação na temperatura não poderia ser superior a $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$, determinando assim, os limites superior e inferior da temperatura de incubação.

Lourens et al. (2005), ainda neste contexto, avaliaram duas temperaturas: uma considerada alta para o embrião, 38,9 °C e outra baixa, 36,7 °C; versus a temperatura ideal de incubação, 37,8 °C. Nesse estudo os autores observaram que os maiores embriões foram incubados a 37,8 °C, com uma menor mortalidade na 3^o semana nessa mesma temperatura e maior eclodibilidade nos ovos incubados na temperatura ideal de incubação.

Alguns autores sugerem que a temperatura de incubação acima de 39°C ou abaixo de 30°C são letais para os embriões (DECUYPERE & MICHELS, 1992). Embriões mais velhos de galinhas (*Gallus gallus*) são mais susceptíveis a altas temperaturas e embriões mais jovens, a temperaturas mais baixas (WEBB, 1987). Além disso, embriões de linhagens de frangos de corte são mais sensíveis a variações de temperatura, tanto para altas como para baixas, em comparação a embriões de linhagens de postura (DECUYPERE & MICHELS, 1992).

Os ovos perdem temperatura para o ambiente por condução, resfriando de forma lenta, por um período de 18 horas até chegar a 18°C, que é considerado como temperatura ideal para o armazenamento (BRITO, 2006). Dessa forma a temperatura de estocagem, deve ser abaixo da temperatura requerida para se iniciar o desenvolvimento embrionário “zero fisiológico” (24°C). Ovos armazenados em temperaturas maiores que o zero fisiológico, antecipa a eclosão, em relação aos que foram armazenados em temperatura entre 18 a 20°C (SCHMIDT et al., 2003).

1.3.2.2. Umidade relativa do ar

A umidade relativa do ar no interior da incubadora é um fator determinante no sucesso da incubação de ovos férteis, podendo variar muito mais que a temperatura sem que ocorram danos na eclodibilidade, desde que mantida em uma determinada amplitude visando a obtenção de melhores resultados (LAUVERS & FERREIRA, 2011; SANTANA et al., 2014).

A umidade da incubação influencia na produção de calor metabólico do embrião, no peso do pinto, deixar a membrana da casca flexível para os pintinhos nascerem, alterações no desenvolvimento do embrião e ajuda a inflar os pulmões após nascimento (SANTANA et al., 2014).

Um ovo pode perder de 11 a 13% de água durante a incubação. Porém, esta perda de água não é uma variável estritamente relacionada com os valores de umidade relativa na incubadora, podendo ser influenciado por fatores como temperatura, movimentos iônicos, concentração protéica, porosidade da casca, além de ser produto do metabolismo energético (AR, 1991).

Esta perda de umidade do ovo ocorre pelo processo de difusão, não sendo constante durante o período de incubação, podendo ser mais contundente nos três primeiros dias de incubação, mais lenta após estas fases, e voltando a incrementar entre o 15º e 18º dia de incubação (ALDA, 1994; DECUYPERE et al. 2003).

Neste contexto, a rápida perda de água nos primeiros dias de incubação é necessária devido à falta do completo desenvolvimento sanguíneo, sendo preciso a eliminação de água pela casca, à medida que se degrada o albúmen, isso permite a entrada de ar na câmara e propicia oxigênio para o desenvolvimento do embrião (ALDA, 1994).

Na sala de estocagem, a umidade deve estar entre 70 a 85%. Estes ovos não devem atingir o ponto de orvalho, pois a condensação de água sobre a casca permite a contaminação dos ovos, e reduz o rendimento da incubação (CASTRO, 1994).

Quando a umidade do ar na incubadora for baixa, leva a perda de água além dos limites normais atrasando a eclosão. E na presença de alta umidade do ar na incubadora, os embriões tendem a eclodir precocemente, molhados, pegajosos ou com desenvolvimento incompleto (NEVES, 2005).

1.3.2.3. Viragem

A posição e a viragem dos ovos são fatores determinantes no sucesso do desenvolvimento do embrião, sendo esta necessária para evitar a aderência do embrião às paredes internas do ovo, permitindo adequado fluxo de ar. Além disso, a movimentação é importante para permitir o crescimento adequado das membranas extraembrionárias e o equilíbrio dos fluidos embrionários, proporcionando um melhor transporte de nutrientes do albúmen para o embrião (ROBERTSON, 1961; SANTANA et al., 2014).

Além disso, a escassez de viragem diminui a eclodibilidade e aumenta o nascimento de pintainhos de má qualidade (SANTANA et al., 2014). Diversos

estudos já verificaram que a viragem diária dos ovos é realizada pelas galinhas como um processo de incubação natural (KALTOFEN & UBBELS, 1954; KALTOFEN, 1956).

A viragem é necessária devido ao fato do ovo perder umidade durante o desenvolvimento do embrionário, o embrião se desenvolve na parte superior do ovo, protegido pela membrana interna da casca próximo da câmara de ar, o que podem levar à aderência, e conseqüente a morte (CAMPOS, 2000). A viragem permite o crescimento adequado das membranas extra-embriônicas e o equilíbrio dos fluídos embrionários, com conseqüente intercâmbio de nutrientes do albúmen para o embrião (BRITO, 2006; SANTANA et al., 2014).

Na incubadora a viragem é realizada até o 18º dia no ângulo de 45º a cada hora, ressaltando que os ovos não devem ser movimentados de forma circular, pois a membrana corioalantóica pode se romper, levando o embrião a óbito (BRITO, 2006).



Figura 8. Máquina de incubação realizando viragem dos ovos.

1.3.2.4. Ventilação

A posição dos ovos, ao introduzi-los na incubadora, é fundamental para a formação da câmara de ar do ovo, aumentando a probabilidade de que a eclosão ocorra pela via da bicagem interna (DEEMING, 1989). Provavelmente, uma correta posição do ovo na máquina incubadora permite que as trocas de gases

através da casca sejam normais durante o processo de incubação (RONDÓN & MURAKAMI, 1998).

É largamente reconhecido que o processo de ventilação *indoor* nunca é perfeitamente homogêneo, sendo que a temperatura e umidade nunca são distribuídas perfeitamente através do volume da incubadora. Já foi demonstrada que a existência de múltiplas regiões de fluxo de ar heterogêneo, presença de áreas de ar parado e a ocorrência de curto circuito do fluxo de ar para a saída do exaustor como possíveis causas da ineficiência de mistura (JANSSENS et al., 2003; ARAÚJO et al., 2009).

A ventilação interna deve ser uniforme para que não ocorram diferenças de temperatura e no fornecimento de oxigênio e saída de CO₂. De Smit et al. (2006) demonstraram que a concentração de CO₂, assim como a composição de gases no interior da incubadora, desempenham um papel importante do desenvolvimento embrionário, e, através da manipulação das condições inerentes à incubação, foram capazes de alterar o ciclo do desenvolvimento do embrião. Ainda nesse estudo, o aumento na concentração de CO₂ no interior da incubadora, devido à ausência de ventilação durante os primeiros dez dias de incubação, melhorou o desenvolvimento do embrião e proporcionou efeitos benéficos para o desempenho pós-nascimento (ARAÚJO et al., 2009).

Em condições não isotérmicas, misturas incompletas resultam em um gradiente tridimensional que tem maior impacto no processo de qualidade, eficiência do uso de energia e do próprio processo de incubação. Dessa forma, a variabilidade da temperatura e ventilação interfere no tempo de incubação, resultando em um sub-ótimo produtivo. E na avicultura industrial, o tamanho das máquinas de incubação encontra-se cada vez maior, resultando num número cada vez maior de ovos incubados por m², e uma maior heterogeneidade das condições ambientais (VAN BRECHT et al., 2003; ARAÚJO et al., 2009).

1.3.2.5. Resfriamento

A temperatura dos ovos no momento da coleta pode variar, com um ovo recém produzido apresentando uma temperatura próxima à temperatura corporal da galinha (41 °C), podendo este levar muito mais ou muito menos tempo para resfriar dependendo do seu posicionamento na bandeja e/ou na máquina.

Neste contexto, embora o nível exato do chamado "zero fisiológico" seja amplamente discutido, há um consenso geral de que o desenvolvimento embrionário, que inicia ainda no oviduto da fêmea, continua enquanto a temperatura interna dos ovos for superior a 25 - 27 °C, sendo necessário verificar todas as condições ambientais que podem influenciar.

Assim, o resfriamento deve ser realizado de forma lenta e gradual, de 41 °C para 23 °C, com duração entre 6 e 8 horas, podendo assim, os ovos ser armazenados na sala de ovos em temperatura de 18 a 19 °C (JONES, 1996), permitindo que seja atingido o zero fisiológico e o embrião tenha o seu desenvolvimento retardado e a entrada dos ovos na máquina seja programada conforme o estágio de desenvolvimento embrionário.

No entanto, se o resfriamento ocorrer rapidamente após a postura e os ovos forem armazenados por um longo tempo, ocorre mortalidade embrionária, pois este embrião teve apenas 24 a 26 horas de desenvolvimento, e ele será frágil (ALDA, 1994), podendo morrer na primeira fase de incubação entre 24 e 26 horas (PATRÍCIO, 1994).

Estudos demonstraram que breves períodos de resfriamento durante o processo de incubação não afetam a eclosão, o peso corporal ou a mortalidade embrionária (LANCASTER & JONES, 1988). Entretanto, ovos resfriados durante a incubação, por longos intervalos, apresentam danos aos parâmetros de incubação (KÜHN et al., 1982).

1.3.2.6. Estocagem dos ovos

O armazenamento dos ovos antes do início do processo de incubação tem por objetivo evitar a mistura de ovos de lotes diferentes ou com estado sanitário que possa comprometer o sucesso da incubação. O manejo realizado durante o período de armazenamento dos ovos depende de uma série de fatores, tais como, condições ambientais, linhagem, estágio do desenvolvimento do embrião, tempo de estocagem e idade da matriz, afetando diretamente a eclodibilidade e qualidade do pinto ao nascer (SANTANA et al., 2014).

A estocagem dos ovos é necessária dentro dos sistemas comerciais de incubação, com diversos fatores podendo acarretar a mortalidade embrionária. Entretanto, o desenvolvimento embrionário de ovos mantidos em temperaturas acima do zero fisiológico pode iniciar de forma inadequada, influenciando na

variabilidade de desenvolvimentos, e diminuindo a eclodibilidade (DECUYPERE & MICHELS, 1992).

Segundo Fassenko (1996), é consenso que o estoque de ovos fertilizados diminui a sobrevivência embrionária proporcionalmente à duração da armazenagem, com a eclodibilidade podendo declinar a partir do 3º dia de estocagem, independente da temperatura (MEIJERHOF et al., 1994).

Assim, é fato comprovado que quanto maior o prolongamento do período de estocagem dos ovos, menor será a taxa de eclosão (MARTIN, 2003; TONA, 2003). Além disso, o armazenamento aumenta o tempo de duração da incubação (MATHER & LAUGHLIN, 1976; MUAMBI et al., 1980), sendo isto uma consequência dos efeitos do armazenamento sobre o desenvolvimento embrionário (TONA, 2003).

Neste caso, para ovos estocados por longos períodos de tempo, o início do desenvolvimento embrionário é retardado (ARORA & KOSIN, 1966), a taxa de crescimento é lenta (MATHER & LAUGHLIN, 1976) e a taxa de produção de CO₂ é aumentada depois dos 18 dias de incubação (HAQUE et al., 1996; FASENKO et al., 2002).



Figura 9. Armazenamento de ovos em pequeno incubatório.

1.3.2.7. Desinfecção dos ovos

A desinfecção dos ovos permite a redução da contaminação dos ovos e minimiza os seus efeitos deletérios (SILVA, 1996), com uma desinfecção eficiente melhorando a eclodibilidade e a qualidade dos pintos (CAMPOS, 2000).

Embora o ovo apresente barreiras naturais (casca, cutícula e membrana), as bactérias podem chegar ao conteúdo interno do ovo (BRITO, 2006). Após a postura, o ovo naturalmente esfria, e este resfriamento ocasiona o encolhimento da parte interna do ovo, podendo haver uma sucção de bactérias para o interior do mesmo, através dos poros da casca, acarretando à sua contaminação (SILVA, 1996).

O ovo com boa qualidade de casca pode apresentar a penetração de bactérias em até 30 minutos. Desta forma, é recomendada a desinfecção na hora da coleta ou no máximo 30 minutos após a postura, utilizando uma pulverização com formol e amônia quartenária na coleta, outra pulverização na seleção, e mais uma vez antes dos ovos serem enviados ao incubatório (BRITO, 2006).

Vale ressaltar que os ovos sempre terão a presença de microorganismos na casca, podendo contaminar-se antes da ovulação ou mesmo durante a formação do ovo no trato reprodutivo (SESTI, 2005). Todavia, vale ressaltar que parte dos microorganismos é aderida à casca quando o ovo passa pela cloaca, local por onde também transitam as fezes (MAULDIN, 2002).

Devido a isso, é muito importante o cuidado sanitário relacionado tanto à ave quanto ao ambiente externo onde é realizada a ovoposição (JONES, 1991). Geralmente, são encontrados na casca dos ovos entre 300 e 500 microorganismos no momento da postura, podendo estes penetrar cerca de 30 minutos após a mesma (SESTI, 2005).

1.4. Procedimentos industriais e manejo de incubação

1.4.1. Pré-incubação

Ao iniciar os procedimentos para incubação dos ovos, estes devem ser acondicionados em bandejas específicas antes de serem colocadas nas máquinas incubadoras. É importante salientar que se o aquecimento for feito diretamente na incubadora, uma carga de ovos armazenados a 18 °C e transferidos diretamente para a máquina determina desordem de temperatura no ambiente da máquina, podendo levar a um atraso da eclosão, além de choque

térmico entre a temperatura ambiente com a temperatura dos ovos, podendo ocasionar elevada mortalidade embrionária. Para evitar o problema, recomenda-se realizar um pré-aquecimento dos ovos lentamente por 8 a 12 horas em sala de pré-aquecimento.

Este manejo pode ser uma boa prática para ovos estocados em temperaturas abaixo de 20 °C por longos períodos de tempo. Porém, precisa ser feita com condições de temperatura, umidade e ventilação adequadas para evitar a condensação dos ovos e provocar mortalidades embrionárias ou contaminações dos ovos acima dos padrões desejados.

Muitos incubatórios realizam este manejo em frente as incubadoras, apresentando resultados aceitáveis quando a sala possui uma circulação de ar, e a temperatura do ambiente da sala mantém-se entre 24 °C e 28 °C, apresentando umidade relativa em torno de 65% ($\pm 3\%$).

O tempo ideal para a realização do pré-aquecimento encontra-se em média entre 8 horas, com a temperatura interna dos ovos no momento da incubação devendo encontrar-se no intervalo entre 26 °C a 28 °C.

É importante destacar que antes de realizar todos estes procedimentos prévios, deve-se descartar os ovos sujos, quebrados, pequenos (de acordo com a Política do Incubatório), tamanho muito grande ou de gema dupla, qualidade de casca frágil ou grosseiramente deformados.





Figura 10. Anomalias verificadas em ovos durante a seleção pré-incubação. Os ovos que apresentarem tais situações devem ser descartados (COBB, 2008).

1.4.2. Incubação dos ovos na máquina

Após a preparação, os ovos são transferidos para as máquinas a fim de serem incubados (MURAROLLI, 2006). O período de incubação para ovos de galináceos é de 21 dias (± 2 horas), podendo variar em função da idade da matriz, qualidade da casca, tempo e temperatura de armazenamento dos ovos e a temperatura da incubadora e nascedouros (GUADAGNIN, 1994; MACARI & GONZALES, 2003).

A temperatura considerada ideal na sala de incubação é de 24 a 26 °C (BRITO, 2006). Temperaturas elevadas podem adiantar o nascimento, e provocar alta mortalidade aos 19 a 21 dias de incubação, com pintainhos mortos nas bandejas, refugos e desidratados. Temperaturas baixas podem ocasionar atraso nos nascimentos, pintos com umbigo mal cicatrizado e ovos bicados não nascidos dentre outros (MARQUES, 1994; GERACILDA & FERREIRA, 2011).

Vale ressaltar que no transporte dos ovos para o interior das máquinas incubadoras deve-se evitar choques mecânicos, objetivando garantir a integridade física dos ovos a serem incubados, e o desenvolvimento dos embriões nestes.

O horário ideal para realização da incubação deve ser determinado em função de diversas variáveis, dentre as quais destacam-se a idade da matriz, tempo de estocagem dos ovos, horário previsto para o início dos trabalhos e retirada dos pintainhos dentre outros.

Outra variável a ser considerada é a época do ano, pois as diferenças climáticas entre verão e inverno associadas ao inadequado manejo de ambiente controlado no incubatório podem ocasionar reduções nos percentuais de eclosão e na qualidade dos pintainhos.

O horário de retirada dos pintainhos também é um fator importante para a definição da hora correta de incubação, pois um manejo incorreto pode ocasionar pequenas oscilações no horário de nascimento dos pintainhos, proporcionando nascimentos adiantados ou atrasados, ou pintainhos com umbigo mal cicatrizado e, conseqüentemente, contaminação, como também pode haver um aumento no número de ovos bicados e não nascidos.

A temperatura ideal da sala de incubação é de 24 °C (± 3 °C), sendo que temperaturas fora da faixa aceitável podem implicar em atrasos ou adiantamentos nos nascimentos, uma vez que a temperatura da sala de incubação influencia diretamente na regulação da temperatura no interior das máquinas incubadoras, que estão entre 37,3 °C e 37,5 °C.

Neste sentido, recomenda-se que a umidade relativa do ar no interior das máquinas incubadoras esteja entre 65% ($\pm 3\%$) como sendo a umidade ideal, cuidando para que a umidade relativa não fique inferior a 50% nas incubadoras, o que pode implicar em aumento no tempo de incubação e atraso no nascimento.

Quanto a renovação do ar das salas de incubação, estas devem suprir as necessidades de renovação de ar das incubadoras e do ambiente, proporcionando ideal renovação de gases no ambiente e respiração dos embriões. Vale ressaltar que a renovação de ar na incubadora deve ser calculada com base na composição do ar seco e nas trocas gasosas do embrião durante a incubação.



Figura 11. Incubação de ovos em máquina de incubação PETERSIME 168.

1.4.3. Ovoscopia

Durante o decorrer da incubação é importante realizar o processo de ovoscopia, utilizando como ferramenta o equipamento denominado ovoscópio (ou uma lâmpada com a luz direta sobre o ovo), vislumbriando não só para retirar os ovos inférteis, como também aqueles onde houve mortalidade embrionária.

Geralmente fazem-se duas ovoscopias, uma entre o 7º e o 12º dia, e outro entre o 14º e o 18º dia. Na primeira retiram-se os inférteis e os mortos onde não há dúvidas sobre a mortalidade dos embriões. A segunda ovoscopia serve para a elucidação das dúvidas não esclarecidas e, se houverem embriões mortos, retiram-se os ovos. Esta segunda ovoscopia também serve para observar o desenvolvimento das câmaras de ar conforme o padrão desejado.

Quanto a amostragem dos ovos para realização de tal procedimento, primeiro deve-se selecionar o lote fonte a ser examinado, onde um percentual representativo do número de ovos seja selecionado para tal finalidade. Existem duas razões para isso: a amostra da incubadora será mais eficiente e é o meio mais representativo da fertilidade. Nunca se devem selecionar bandejas em sequência, sendo muito importante identificar as bandejas em que a ovoscopia tenha sido realizada.



Figura 12. Procedimento de ovoscopia em pequeno incubatório.

Ressalta-se ainda que a manipulação dos ovos deve ser realizada sempre com luvas limpas e higienizadas, em local com assepsia prévia. Os ovos podem

ficar no máximo 2 horas fora da incubadora para a realização deste procedimento e seus adicionais, sem que haja real prejuízo no desenvolvimento embrionário, ou mesmo mortalidade maciça destes embriões.

1.4.4. Transferência dos ovos ao nascedouro

A transferência deve ser realizada entre 444 a 448 horas de incubação, ou seja, 18,5 dias após terem sido colocados nas incubadoras. A transferência deve ser rápida para evitar queda de temperatura dos ovos, e consequentemente, submeter os embriões à choque térmico.

Outrora, quando os ovos são transferidos precoce ou tardiamente, o embrião é exposto a condições que podem não ser tão favoráveis, podendo acarretar diminuição nas taxas de eclodibilidade e eclosão.

Em estudo de Tona et al. (2001), ovos de matrizes Hybro®, Cobb® e Ross® entre 27 a 75 semanas, foram transferidos da incubadora para as bandejas de nascimento com 15, 16, 17 ou 18 dias de incubação. A melhor eclodibilidade foi observada nos ovos transferidos com 18 dias quando comparada aos demais tratamentos, entretanto as diferenças entre as eclodibilidades dos ovos transferidos nestes períodos não foram significativas, mas, apresentaram resultado numérico inferior.

Obrigatoriamente, para auxiliar em melhor controle do lote de ovos, cada bandeja de incubação deve ser convertida em uma bandeja de eclosão. No momento da transferência devem ser evitadas correntes de ar no ambiente, procedendo o desligamento dos ventiladores e aspersores da sala de incubação durante a transferência.

Vale ressaltar que, neste estágio, a casca do ovo é mais frágil devido ao embrião retirar cálcio da casca para auxiliar na formação do seu esqueleto. Sendo assim, é necessário extremo cuidado durante a transferência entre as bandejas a fim de evitar a quebra do ovo dentre outros problemas.

O manuseio incorreto dos ovos durante esta fase pode ocasionar rupturas de casca até mesmo hemorragias ao embrião. Ressalta-se que as transferências automatizadas permitem a realização mais cuidadosa deste processo em relação ao manejo manual.

A temperatura ideal da sala do nascedouro também é de 24 °C (± 3 °C), sendo que temperaturas fora da faixa aceitável podem implicar em atrasos ou

adiantamentos nos nascimentos, uma vez que a temperatura deste ambiente influencia diretamente na regulação da temperatura no interior dos nascedouros, que estão entre 36,3 °C e 36,5 °C (1° C a menos que a temperatura da máquina de incubação utilizada).

Neste sentido, recomenda-se que a umidade relativa do ar no interior das máquinas incubadoras esteja entre 75% ($\pm 3\%$) (10% a mais que a umidade da máquina de incubação utilizada) como sendo a umidade ideal, cuidando para que a umidade relativa não fique inferior a 60% nas incubadoras, o que pode implicar em aumento no tempo de incubação e atraso no nascimento.



Figura 13. Transferência dos ovos para nascedouro PETERSIME 168.

1.4.5. Retirada e manejo dos pintos com um dia

Os pintos recém-nascidos são sensíveis à variação de temperatura e agressões de microorganismos, portanto, devem ficar na sala de nascimento o menor tempo possível a fim de preservar sua integridade.

Inicialmente deve ser realizada uma avaliação dos pintos nascidos a fim de separá-los em três categorias: a) pintos de primeira; b) pintos de segunda; e c) refugos (inaptos). Como critérios, os pintos nascidos devem apresentar as seguintes características para serem considerados pintos de primeira:

- Olhos brilhantes;
- Bico perfeito;

- Sem defeito de aprumos (asas, patas, dedos dentre outros);
- Penugem seca e fofa;
- Pernas enceradas (hidratadas);
- Umbigo cicatrizado.



Figura 14. Pintos durante o processo de bicagem (interna e externa) da casca e momento da eclosão propriamente dita.



Figura 15. Seleção de pintos de um dia: separação de aptos e inaptos.

Além disso, outros procedimentos são usualmente realizados durante o processo de seleção de pintos pós-nascimento, como a vacinação contra a doença de Marek que é obrigatória de ser realizada ainda no incubatório.

Todavia, a maioria dos pintos de um dia também é vacinada contra a doença de Gumboro e Bouda Aviária em regiões epidêmicas (MURAROLLI,

2006), sendo esta tríplice vacina realizada de forma subcutânea na base do pescoço através de vacinação manual ou utilizando vacinadora automatizada.

Estas doenças são graves quando acometem as aves, o que leva a necessidade de uma vacinação precoce, para que os pintinhos desenvolvam imunidade (BERNARDINO, 1994) e evitem a sua propagação.



Figura 16. Vacinação de pintos de um dia utilizando vacinadora pneumática.

Já a distinção do sexo dos pintos de um dia é uma atividade que iniciou de forma experimental e a cada dia vem se tornando uma obrigatoriedade nos incubatórios industriais. Em 1933, os japoneses Mausi e Hashimoto (GIBBS, 1944) relataram pela primeira vez o método de distinção do sexo de pintos de um dia através do exame dos órgãos copulatórios rudimentares das aves.



Figura 17. Diagrama mostrando a posição da mão em concha, com os dedos evertendo a cloaca e mostrando a localização relativa do órgão copulatório (Adaptado de Shrader et al., 1935).

Outros métodos de sexagem foram desenvolvidos com o passar dos anos, tais como o uso de cruzamentos envolvendo caracteres ligados ao sexo a fim de criar um dimorfismo sexual

aparente, e o método de avaliação das penas da asa, onde o macho apresenta empenamento mais lento e as penas primárias do mesmo comprimento ou menor que as outras, e a fêmea empenamento mais rápido com as penas primárias maiores que as secundárias.

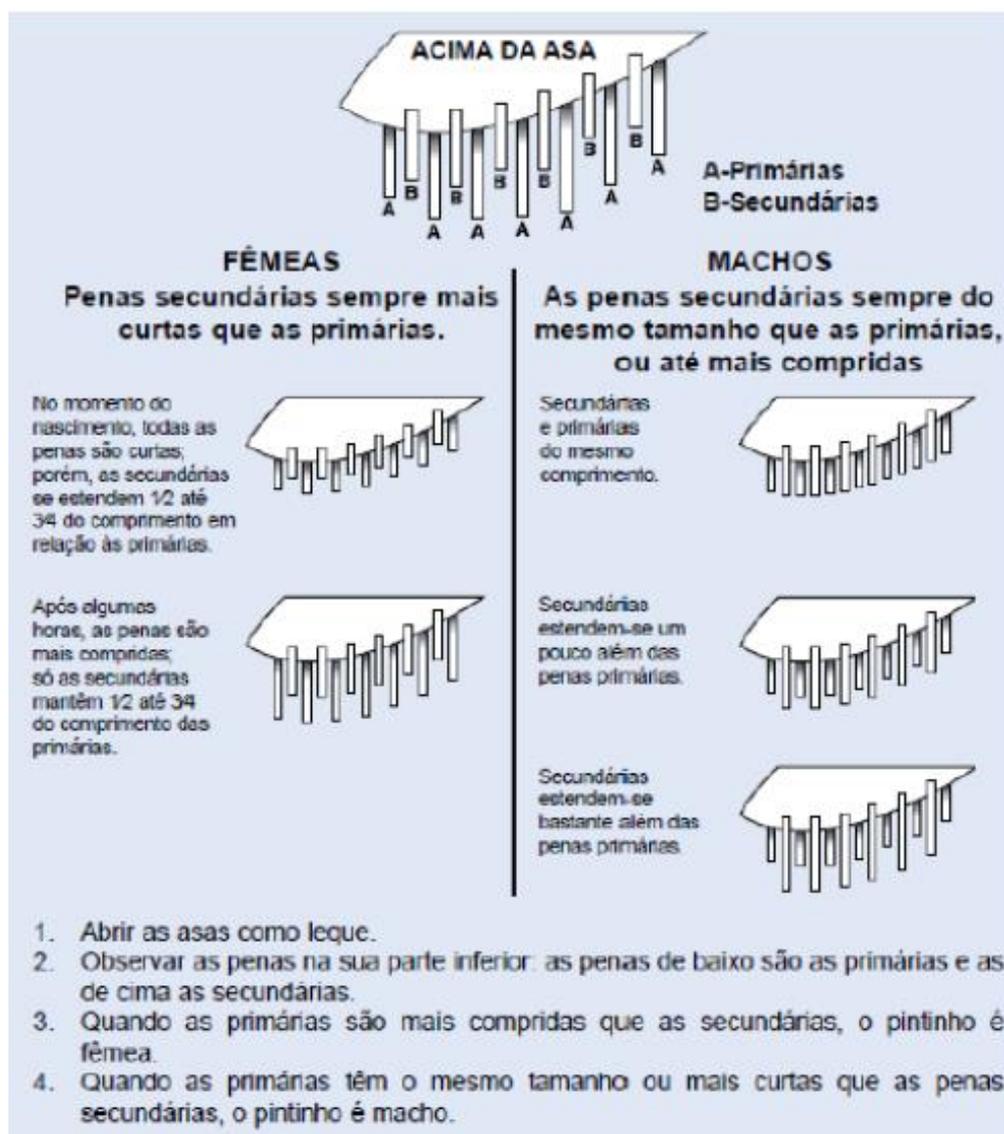


Figura 18. Metodologia de sexagem para identificação conforme o desenvolvimento do empenamento na asa (COBB, 2008).

Outrora, devido estes métodos alternativos não apresentarem a mesma eficiência que o desenvolvido por Mausi e Hashimoto, o método de sexagem pela avaliação dos órgãos copulatórios rudimentares é o método mais utilizado no sistema de produção e seleção de pintos de um dia, chegando a índices de eficiência que atingem 95%.

É fato que o órgão copulatório das aves varia um pouco em forma e tamanho. Outrora, de um modo geral, os pintos com órgãos bem definidos de qualquer tamanho considerável são machos. Um pouco mais da metade das fêmeas não tem órgãos visíveis e as outras têm órgãos muito pequenos, aproximadamente do tamanho de pontos de alfinete, ou órgãos ligeiramente maiores que parecem planos, flácidos ou vagamente delineados. Normalmente, o que primeiro parece ser um órgão feminino considerável, acaba por ser parte de uma das dobras ou desaparece inteiramente após o alongamento (SHRADER et al., 1935).

Na figura 19, observa-se um conjunto de modelos de cloacas de pintos de um dia evertidas, com ampliação, apresentando os diferentes tipos. A percentagem na ilustração representa o número aproximado de vezes que cada tipo é normalmente encontrado a cada cem pintinhos.

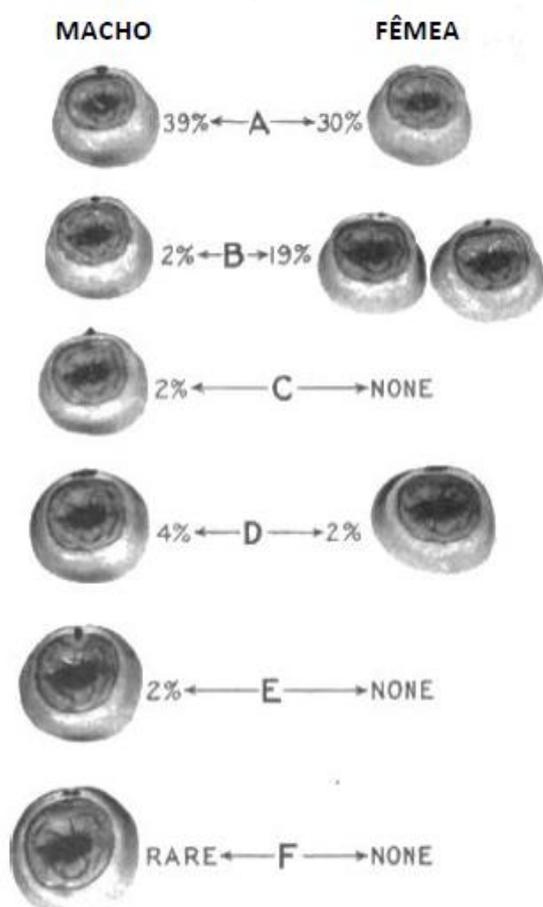


Figura 19. Representação de modelos de cloacas evertidas de pintinhos demonstrando os vários tipos de órgãos que podem ser observados e a porcentagem aproximada de ocorrência (Adaptado de Shrader et al., 1935).

Os dados ilustram que os tipos que podem causar maior grau de dificuldade são relativamente poucos. Nota-se que não deve haver problemas em reconhecer o sexo de pintos com órgãos do tipo A, C, E ou F, pois não há órgãos femininos que se assemelhem a estes. E os tipos, B e D, constituem apenas uma pequena parcela de machos (SHRADER et al., 1935).

A sala de triagem dos pintos de um dia deve apresentar temperatura entre 24 a 26 °C, umidade relativa do ar de 50%, pressão negativa de 5% e renovação de ar de 30 m³/h/1000 pintos (BRITO, 2006).

Com a finalização dos procedimentos no incubatório, os pintinhos devem ser entregues em seu destino o mais rápido possível, devendo ser alimentados imediatamente. Deve-se proporcionar a eles ambiente e as condições adequadas, que atendam a todas as suas exigências nutricionais e fisiológicas. Assim, promove-se o desenvolvimento precoce de um comportamento alimentar e de consumo de água, otimizando o desenvolvimento dos intestinos, órgãos, esqueleto dentre outros processos anato-fisiológicos.

O transporte das aves necessita de vários cuidados, que caso não sejam observados, podem comprometer o desempenho do lote na granja. Os principais problemas ocasionados pelo transporte deficiente são estresse, desidratação, mortalidade precoce e refugagem (LAUVERS & ARAÚJO, 2011).

Os pintainhos são transportados em caixas especiais de plástico ou papelão, tendo capacidade para 50 a 100 aves (CAMPOS, 2000), com algumas caixas de papelão apresentando 4 divisões para 25 pintos cada, evitando assim que os estes fiquem amontoados e sofram asfixia (LAUVERS & ARAÚJO, 2011).



Figura 20. Pintos de um dia alojados e embalados para transporte.

Os pintos são transportados em jejum, sendo essa prática utilizada devido pesquisas afirmarem que os pintos mantidos em jejum até 24 horas apresentam melhor rendimento devido o maior tempo para aproveitamento dos nutrientes do saco vitelino. Porém, o prolongamento deste jejum por 48 horas pode intensificar a desidratação e causar mortalidade (ANTUNES & ÁVILA, 2005), e 72 horas após o nascimento, sintomas graves de inanição e/ou desidratação podem ser verificados, ocasionando danos permanentes no desenvolvimento destes.

Os veículos utilizados para este transporte devem manter a temperatura do seu interior em torno de 26 °C, com boa ventilação e umidade relativa do ar entre 55 a 60% (ANTUNES & ÁVILA, 2005). Durante o percurso deve-se evitar movimentos bruscos, com o mínimo possível de paradas, que quando houverem, devem apresentar duração mínima (GUSTIN, 1994).

Capítulo 2

DESENVOLVIMENTO

EMBRIONÁRIO

2.1. Desenvolvimento embrionário pré-postura

O ovário de uma ave em condições normais apresenta a chamada “hierarquia folicular”, caracterizada por vários estágios de desenvolvimento que envolvem cerca de 10 a 12 folículos, liberados consecutivamente. As sequências são separadas por um período de pausa, que dura aproximadamente 40 horas. Desta forma, o ciclo de postura ocorre em dias sucessivos, seguidos de uma interrupção (pausa de postura) e um recomeço (NORTH, 1984; BARBOSA, 2011; BARBOSA et al., 2013).

Fisiologicamente, a fertilização do óvulo de galinha ocorre na região do infundíbulo, logo após a ovulação, e o processo de formação do ovo a partir da ovulação demanda cerca de 25 a 26 horas. Durante esse período, o ovo permanece no oviduto, onde a temperatura é de aproximadamente 42 °C, possibilitando o desenvolvimento embrionário, que, no momento da postura, encontra-se no estágio de pré-gástrula (FIUZA et al., 2006).

O ovo fertilizado mantido em temperaturas elevadas em relação à temperatura média do ambiente favorece o contínuo desenvolvimento do embrião (FIUZA et al., 2006). Este desenvolvimento é paralisado quando o ovo é colocado em temperatura ambiente abaixo do ponto zero fisiológico que, segundo Fassenko et al. (1991), encontra-se um pouco abaixo de 20 à 21 °C.

Outrora, num conjunto geral de processos, a formação completa do pintinho requer aproximadamente 22 dias, sendo as referidas 25 a 26 horas (pouco mais de um dia) que este irá passar dentro da galinha (formação embrionária inicial), e mais 504±2 horas (aproximadamente 21 dias) na incubação (natural ou artificial).

Este período de desenvolvimento pré-incubação coincide com a formação estrutural do ovo, iniciando-se no infundíbulo, cerca de 15 minutos após o processo de fecundação, quando o espermatozoide se une ao óvulo para formar a célula-mãe denominada zigoto (BARBOSA, 2011).

Quando esta célula passa pelo magno e chega no istmo ocorre a primeira clivagem, dando origem a duas células. E estas células dividem-se em quatro, depois em oito células até o momento que o ovo chega ao útero (PATTEN, 1951; NORTH, 1984).

De acordo com Lille (1951), quando o ovo chega ao útero já encontra-se com 16 células, ganhando a denominação de mórula. E este processo contínuo

de clivagens continuam até 256 células (blastômeros), formando um pequeno disco localizado no polo animal, especificadamente na região vitelínica (BARBOSA, 2011).

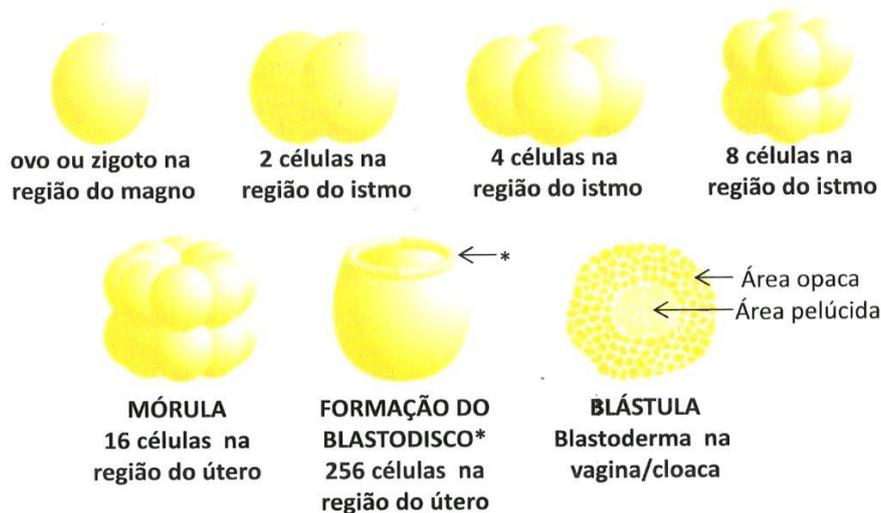


Figura 21. Desenho esquemático do desenvolvimento embrionário no período pré-postura (Figura publicada por Barbosa, 2011).

O término deste processo de clivagens é evidenciado pelo surgimento da blastocele (cavidade rasa) que se forma por meio do desprendimento do vitelo pelos blastômeros. E a partir da formação da blastocele, o ovo entra no denominado estágio de blástula e, nesta fase, este blastodisco formado ganha a alcunha de blastoderma. E a área marginal do blastoderma que mantém as células aderidas à gema é denominada zona de junção (BARBOSA, 2011).

Anteriormente à ovoposição, o blastoderma começa a se diferenciar em duas camadas germinativas, iniciando a gastrulação. De acordo com Eyal-Giladi (1991) no momento em que o ovo é posto, o embrião tem aproximadamente 60.000 células e encontra-se em pleno desenvolvimento, porém, aguardando que as condições ambientais proporcionem os estímulos necessários para a realização dos processos fisiológicos.

2.2. Desenvolvimento embrionário nas primeiras horas

No período entre a postura e a incubação, o ovo é mantido em um limiar de temperatura abaixo da ideal para o desenvolvimento embrionário, havendo

uma retomada deste desenvolvimento, com intensa multiplicação celular, quando os ovos são submetidos às condições de incubação (BARBOSA, 2011).

A gastrulação recomeça durante as primeiras horas de incubação. A camada anterior à blastocele dará origem ao epiblasto ou ectoblasto; e a camada posterior, ao hipoblasto ou endoblasto (ROMANOFF, 1960; GONZALES & CESARIO, 2003).

De acordo com Hamburger e Hamilton (1951), a gastrulação caracteriza-se por um espessamento da região posterior da área pelúcida. Depois de 6 a 7 horas de incubação, o espessamento começa a alongar-se no sentido caudocefálico, formando um sulco, nunca ultrapassando a região média da área pelúcida. O blastoderma perde sua forma circular e alonga-se ligeiramente, mudando sua forma de contorno circular para piriforme.

Depois de 10 a 12 horas de incubação, a região espessada está tipicamente alongada e representa o início da linha primitiva. A formação da linha primitiva representa a segunda fase da gastrulação (BARBOSA, 2011).

A linha primitiva adquire sua forma e aspecto definitivo depois de 16 horas de incubação. Ela define o eixo anteroposterior do embrião, pois este desenvolver-se-á anteriormente a ela. A sua extremidade posterior é chamada de placa primitiva, e um sulco superficial aparece no espessamento, na extremidade anterior, formando o nó de Hensen (HOUILLON, 1972).

Conforme a linha primitiva cresce, ela dá origem ao mesoderme entre o hipoblasto e o epiblasto. Os folhetos tornam-se gradualmente aparentes e podem ser denominados de ectoderme, mesoderme e endoderme. Desta forma, a distinção das três camadas germinativas caracterizando um blastoderma completamente diferenciado, dá-se após o ovo ser posto, na fase inicial da incubação (BARBOSA, 2011).

Um ligeiro espessamento adiante do nó de Hensen indica um prolongamento cefálico correspondente à notocorda. À medida que a notocorda se desenvolve, a linha primitiva regride (COSTA, 1950; GONZALES & CESARIO, 2003). Consequentemente, os somitos começam a formar-se em cada lado da notocorda (BARBOSA, 2011).

Durante a primeira semana de incubação ocorre um intenso desenvolvimento de tecidos e órgãos. Neste período crítico para o embrião, as membranas extraembrionárias viabilizam seu crescimento (BARBOSA, 2011).

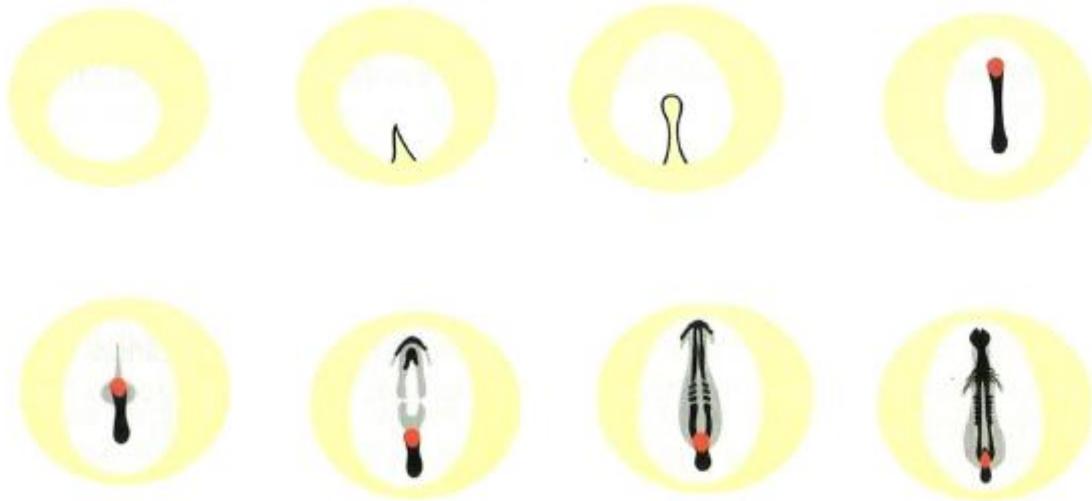


Figura 22. Desenho esquemático da regressão do nó de Hensen. Depois de estender-se quase até o centro do blastoderme, a linha primitiva começa a regredir, com o nó de Hensen movendo-se em uma direção posterior, à medida que a prega cefálica e a placa neural começam a se formar. Enquanto o nódulo move-se posteriormente, a notocorda desenvolve-se na área anterior a ele e os somitos começam a formar-se de cada lado da notocorda (Figura publicada por Barbosa, 2011).

2.3. Mudanças na composição do ovo durante a incubação

O processo de desenvolvimento embrionário depende de algumas reações, quando o embrião utiliza principalmente o substrato da gema para realização das conversões energéticas, ou seja, transformação de carboidratos e gordura em energia. No entanto, todas estas reações são dependentes de duas variáveis: uma física (temperatura) e outra bioquímica (enzimas). A participação enzimática nas reações tem relação com a modulação da velocidade e da eficiência das reações, enquanto a temperatura pode influenciar na velocidade das reações; retardando-a através das baixas temperaturas ou aumentando-a através das altas temperaturas. Portanto, enzimas e temperatura são os fatores que também influenciam nessas reações (CALIL, 2007).

Basicamente, o desenvolvimento do embrião promove modificações simultâneas em todos os componentes do ovo, que vão diminuindo em diferentes proporções ao longo do período de incubação. A casca é uma fonte de cálcio, e este mineral auxilia no controle do equilíbrio eletrolítico. O albúmen fornece

proteínas e se liquefaz, tornando disponível água e eletrólitos para o embrião. A gema fornece energia para as demandas fisiológicas de manutenção, sendo que água também é produzida quando os lipídios são oxidados. Outra parte da energia originada da gema é utilizada para sintetizar os tecidos e permitir o crescimento embrionário (AR et al., 1974; RAHN & AR, 1974; SOTHERLAND & RAHN, 1987; TULLET, 1990; TAZAWA & WHITTOW, 2000).

2.3.1. Casca

A casca é a fonte primária de cálcio para o desenvolvimento embrionário. Outros minerais são fornecidos a partir da casca para o embrião em desenvolvimento, como magnésio e fósforo (ROMANOFF & ROMANOFF, 1949). Segundo Richards (1997), também são encontrados traços de cobre, zinco, manganês e ferro na casca e suas membranas, sendo que estes minerais também contribuem para o metabolismo embrionário.

No decorrer da incubação, o intercâmbio de CO₂ em conjunto com a enzima anidrase carbônica cria condições de meio ácido que permitem a dissolução da casca e a transferência de cálcio para a circulação. A dissolução dos botões mamilares adjacentes à interface “corioalantóide-casca” representam a fonte dominante de cálcio no sangue. Com esta recuperação de cálcio e conjuntamente de fósforo, o esqueleto do embrião inicialmente constituído de cartilagem vai sendo mineralizado (TUAN & ONO, 1986; DIECKERT et al., 1989; TAZAWA & WHITTOW, 2000).

Concomitantemente com a mineralização do embrião, ocorrem acúmulos de grânulos calcificados nos limites do saco vitelino. Neste caso, o cálcio vai sendo transferido através das vilosidades no sistema vascular do saco vitelino e agrega-se em esferas na superfície do mesmo. Estes grânulos de cálcio só são absorvidos após a bicagem interna, quando acaba o acesso de cálcio através da casca devido à interrupção da ação da corioalantóide. A mineralização e o desenvolvimento esquelético do embrião são mantidos, devido a esta transição da fonte de minerais da casca para a absorção dos grânulos de cálcio e fosfotina da gema. Porém, o acesso a esta fonte diminui gradativamente após a eclosão com a absorção do vitelo pelo pinto (TAZAWA & WHITTOW, 2000).

Peebles et al. (2001) pesquisaram as mudanças de peso ocorridas na casca durante a embriogênese de ovos provenientes de matrizes pesadas com

27 semanas de idade (aves novas) e 36 semanas de idade (consideradas pelo autor como aves velhas). Esta análise foi realizada quando os embriões estavam com seis, 12 e 18 dias de incubação e revelaram que o peso da casca diminuiu com a progressão da incubação, sendo que os ovos das matrizes mais velhas tiveram aumento significativo nas perdas de peso de casca quando comparadas às matrizes novas.

Abdel-Salam et al. (2006) utilizaram ovos de matrizes pesadas de 36 a 40 semanas de idade para avaliar as espessuras relativas das camadas mamilar, paliçada, cristal vertical e cutícula em relação ao peso do ovo, através da técnica de microscopia eletrônica nos momentos anteriores à incubação e após a eclosão. Estas análises ultraestruturais, segundo os autores, confirmaram pesquisas anteriores que demonstraram que as cascas têm uma perda expressiva da espessura durante a incubação. A camada mamilar, neste experimento, perdeu cerca de 50% de sua espessura original, estando relacionada diretamente à captação de cálcio pelo embrião durante seu desenvolvimento.

2.3.2. Conteúdo de água

A distribuição de água no ovo não é uniforme, sendo que a gema tem um nível relativamente baixo na concentração de água quando comparada ao albúmen. O albúmen é considerado o principal local de armazenamento de água, apresentando aproximadamente 85 a 95% em sua constituição, seguida de proteínas, enquanto os lipídios e os minerais estão incluídos em frações mínimas (SOTHERLAND & RAHN, 1987).

A utilização do albúmen permite o provimento de água e eletrólitos para o desenvolvimento embrionário e através da formação do fluido sub-embrionário, o embrião é capaz de transformar esses nutrientes dentro do ovo para utilizá-los durante seu crescimento. A formação do fluido sub-embrionário ocorre porque o volume de água do albúmen é reduzido rapidamente embora sua pressão osmótica diminua. Essa queda de pressão, apesar da evaporação contínua de água do albúmen, ocorre pela ação de bombeamento iônico dentro do espaço de formação do blastoderma, localizado na superfície da gema. A água então é retraída neste espaço, formando o compartimento do fluido sub-embrionário. Este fluido pode ser considerado como um local de estoque temporário de água

e eletrólitos, de onde estes são canalizados através dos vasos sanguíneos a outros sítios. Ao mesmo tempo, o fluido sub-embrionário contribui para a dispersão dos nutrientes condensados da gema, aumentando a sua disponibilidade para a membrana do saco vitelino (SCHLESINGER, 1958; WHITTMAN & KALTER, 1988; AR, 1991).

Em relação à perda de água do ovo, a maior fração é perdida através de difusão por meio dos poros da casca para o ambiente. A perda de água do conteúdo do ovo também ocorre por outras vias: uma parte é retida pelo embrião e pelo saco vitelino e outra porção é mantida nos resíduos do ovo eclodido, principalmente nas membranas da casca (RAHN & AR, 1974; SOTHERLAND & RAHN, 1987; AR, 1991).

Ao longo da incubação, o ar do meio externo vai substituindo a água perdida pelo ovo, provocando aumento da câmara de ar (AR et al., 1974; TULLET & DEEMING, 1982; TAZAWA & WHITTOW, 2000).

Segundo Ar et al. (1974) e Rahn e Ar (1974), a taxa de perda de peso dos ovos (M_{H_2O}) ($\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$) é determinada pelos seguintes fatores: a condutância de vapor de água da casca e das membranas da casca (G_{H_2O}) ($\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}\cdot\text{torr}^{-1}$) e a diferença de pressão do vapor de água entre os componentes do ovo e o ambiente ao redor dos mesmos (ΔP_{H_2O}) (torr).

Esta taxa de perda de peso foi expressa pelos autores através da fórmula:

$$(M_{H_2O}) = (G_{H_2O}) \times (\Delta P_{H_2O})$$

A (ΔP_{H_2O}) é a diferença de pressão do vapor de água entre os componentes do ovo (P_{H_2O} , ovo) e a pressão do vapor de água do ambiente ao redor dos ovos (P_{H_2O} , ambiente). A (P_{H_2O} , ovo) está relacionada a temperatura interna do ovo, enquanto a (P_{H_2O} , ambiente) é afetada pela temperatura, umidade e ventilação das máquinas de incubação (BARBOSA, 2011).

Com o aumento da idade da matriz ocorre aumento da (G_{H_2O}). O termo condutância foi conceituado como uma medida que avalia a capacidade da casca em permitir as trocas de gases e vapor de água entre o embrião e o meio ambiente. Esta é diretamente relacionada com o número e dimensão dos poros, com a espessura ou resistência da casca e suas membranas (TULLET, 1990).

Buhr (1995) avaliou a perda de peso dos ovos de matrizes leves com idades de 34 e 49 semanas no período de um a 18 dias de incubação e concluiu que os ovos das reprodutoras com 49 semanas perderam mais peso quando comparadas às matrizes de idade mais nova. Santos et al. (2005), estudando este mesmo parâmetro em matrizes leves e pesadas com 30, 45 e 60 semanas de idade, verificaram que a perda de umidade dos ovos aumenta significativamente com o aumento da idade das matrizes, devido principalmente ao aumento da condutância da casca com a progressão da idade das aves.

2.3.3. Conteúdo de energia e sua utilização pelo embrião

No início do desenvolvimento embrionário, o acesso ao oxigênio é limitado à difusão simples auxiliada por hemoglobina ainda primitiva. A energia gasta neste momento decorre em grande parte por glicólise através de glicose prontamente acessível ou por um aumento transitório de lactato que ocorre até a corioalantóide se tornar funcional (CIROTTA & ARANGI, 1989).

À medida que a corioalantóide inicia sua função respiratória, o acesso ao oxigênio, via poros da casca sustenta plenamente a oxidação de ácidos graxos da gema, utilizados como fonte primária de energia e como base para o desenvolvimento embrionário. O principal componente empregado na produção de energia são os triglicerídeos, correspondendo cerca de 67% dos lipídios da gema. A membrana vitelínica, uma estrutura vascularizada que reveste a gema externamente, assume posição de grande relevância no que diz respeito ao metabolismo lipídico, sendo responsável pela absorção de lipídios da gema e posterior transferência para o corpo do embrião (NOBLE & COCCHI, 1990; SATO et al., 2006).

Entre o 10° e 12° dia de incubação, a expansão do embrião dentro do saco amniótico associado ao aumento de seus movimentos, faz com que o albúmen anteriormente compartimentalizado na parte mais fina do ovo tenha sua ruptura na conexão seroamniótica. Desta forma acontece um consumo oral desta mistura de albúmen e fluido amniótico, que é absorvida através do sistema gastrointestinal. Este consumo e absorção se tornam contínuos até que o fluido albúmen-amniótico desapareça e a bicagem interna se inicie. Ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucóide são proteínas de destaque evidenciadas no sangue e continuam a ser detectáveis após a eclosão. Ovomucóide é uma das

proteínas do albúmen que tem grande quantidade de carboidratos. O embrião utiliza estes carboidratos do albúmen com o objetivo de preservar os aminoácidos para a síntese proteica. Como resultado, a glicose no sangue aumenta progressivamente para dar suporte ao fígado e a deposição de glicogênio muscular (MORAN Jr., 2007).

Depois do uso de lipídios, a estratégia metabólica muda no momento da bicagem interna. Neste momento, a demanda de oxigênio do embrião excede o suprimento disponível pela difusão através da casca, e então o embrião começa a metabolizar carboidratos através de mecanismos anaeróbicos até o momento da bicagem externa. Os músculos mais ativos no momento da eclosão usam glicose proveniente das reservas de glicogênio (FREEMAN, 1969; MENNA & MORTOLA, 2002). De acordo com Hoiby et al. (1987), o aumento transitório de lactato (produto da glicólise anaeróbia) que ocorre após a bicagem interna, desaparece quando a função pulmonar provê concentração de oxigênio adequada para o catabolismo de ácidos graxos continuar como fonte de energia.

A demanda de utilização de energia através do metabolismo lipídico da gema se eleva com o crescimento do embrião e reflete em concomitante acréscimo do consumo de oxigênio, sendo que este consumo diminui antes da bicagem interna e externa da casca e aumenta novamente após a eclosão (FREEMAN, 1969; MORAN Jr., 2007). Morita et al. (2009) afirmaram que a energia derivada do metabolismo anaeróbico durante os períodos anteriores à eclosão é necessária para sustentar tanto a manutenção fisiológica como o crescimento, entretanto se esta energia é limitada, o embrião terá que escolher entre crescimento corporal e atividade vital de manutenção. No experimento destes autores, os níveis de glicose no embrião aumentaram significativamente entre o 15° e 21° dia de incubação, independente das idades das matrizes estudadas, que variaram entre 29 e 60 semanas, demonstrando a demanda energética crescente do embrião.

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

triglicérides significativamente menores em pintos recém-eclodidos descendentes de matrizes com 51 semanas quando comparado aos pintos das matrizes de 64 semanas de idade. Burnham et al. (2001) demonstraram menor relação percentual de saco vitelino residual nos pintos eclodidos dos ovos de matrizes novas. Foi justificado pelos autores que os pintos descendentes dessas aves têm taxa de absorção de saco vitelino mais elevada do que aqueles originados das galinhas mais velhas, provavelmente para compensar possíveis deficiências de nutrientes no saco vitelino, ineficiência embrionária na transferência de lipídios ou na utilização destes nutrientes.

Pesquisando o peso absoluto do saco vitelino residual, Sklan et al. (2003) incubaram ovos de um lote de matrizes desde a idade de 29 até 69 semanas e observaram que o peso dos sacos vitelinos de pintos recém-eclodidos foi maior com a progressão da idade. Os autores citaram que o resultado obtido foi coerente, visto que aves mais velhas têm ovos com maior peso e maior percentual de gema. Estes resultados concordaram com os encontrados por Barbosa et al. (2005). Entretanto, neste trabalho os autores verificaram que a relação percentual entre o peso do saco vitelino e o peso do pinto foi significativamente menor nos pintos descendentes das matrizes leves de 56 semanas (13,0%) quando comparado às idades de 26 e 41 semanas (13,9%) que foram semelhantes entre si. Rocha et al. (2008), ao analisarem estas variáveis em pintos descendentes de matrizes pesadas com idades de 31, 38 e 43 semanas, não verificaram diferenças significativas entre as idades.

Vale ressaltar ainda que o jejum pós-eclosão pode provocar perda de peso, além de retardar o crescimento da ave equivalente a um ou dois dias de ganho de peso (NIR & LEVANON, 1993). Baião & Cançado (1998) e Cançado e Baião (2002) afirmam ainda que essa perda de peso pode ser de aproximadamente 5% a 10%, e depois de 48 horas em jejum de água e ração, passa a ocorrer perda de gordura corporal.

Segundo Nakage (2007), os efeitos negativos do jejum pós-eclosão não são eliminados com a alimentação pós-jejum durante cinco dias. Almeida (2002) afirma ainda que aves submetidas a jejum pós-eclosão de 72 horas não apresentam ganho de peso compensatório com a realimentação e atingem os 42 dias de idade com peso corporal menor que o das aves não submetidas.

Pintos nascidos de ovos de matrizes velhas tendem a apresentar um melhor desempenho pós-eclosão que os nascidos de ovos leves e de matrizes jovens (NOY & PINCHASOV, 1993), o que tem sido atribuído ao maior tamanho e maior proporção de água e gordura e maior concentração de proteína na gema (MAY & STADELMAN, 1960; McNAUGHTON et al., 1978; CARDOZO, 2002) apresentados pelos ovos das primeiras em relação aos ovos das últimas.

Riccardi et al. (2009) afirmaram ainda que este jejum pós-eclosão afeta diretamente o desenvolvimento dos órgãos e o crescimento dos pintos. E que, embora pintos de ovos pesados tendam a absorver mais rapidamente o saco de vitelo que os de ovos leves sob jejum, isso não evita que eles percam mais peso corporal que os de ovos leves.

2.4. Fisiologia básica do embrião durante a incubação

O desenvolvimento do embrião é um processo de grande complexidade que, pode ser dividido em três fases distintas, sendo elas: diferenciação celular, crescimento e maturação (BOERJAN, 2006).

Neste contexto, a diferenciação celular embrionária é caracterizada pela diferenciação das células e a formação dos tecidos. Na fase subsequente, o desenvolvimento embrionário caracteriza-se pelo aumento de massa e contínuo desenvolvimento dos órgãos, resultantes de alta atividade metabólica e de proliferação celular (BOERJAN, 2006), onde o desenvolvimento embrionário é retomado quando a temperatura do ovo encontra-se entre 37 a 38 °C (FRANCISCO, 2011).

Durante a fase final do desenvolvimento embrionário, chamada maturação, o embrião passa por uma série de eventos que lhes prepara para viver no ambiente externo à casca. Neste período, as principais glândulas iniciam constante secreção hormonal, promovendo interação entre os órgãos dentro da cadeia metabólica (CALIL, 2007), com a taxa metabólica se estabilizando e atingindo a fase de platô aproximadamente no décimo nono dia de incubação.

Neste estágio, a passagem da respiração cório-alantóidea para a respiração pulmonar se efetua de forma gradativa, iniciando-se entre dezoito e dezenove dias de idade, data na qual o embrião bica a câmara de ar para produzir total mudança do tipo de respiração entre o vigésimo e vigésimo primeiro dia, instante em que começa a bicar a casca (FRANCISCO, 2011).

2.4.1. Função respiratória

Neste contexto específico, é importante ressaltar que existem três áreas onde ocorre a função respiratória durante o desenvolvimento embrionário, sendo elas: área vascular, membrana corioalantóide e pulmões. A área vascular é uma região altamente vascularizada do saco vitelino que toma forma espalhando-se “em leque” a partir do embrião e envolve a gema, ocorrendo crescimento mais acelerado durante o terceiro e quinto dia de incubação. Desde o segundo dia de incubação, os vasos sanguíneos do saco vitelino conectados à aorta dorsal do embrião permitem que o sangue inicie a circulação através do embrião e da área vascular (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; ACKERMAN & RAHN, 1981; TAZAWA & WHITTOW, 2000).



Figura 23. Expansão da área vascular de embrião de galinha com três dias (à esquerda) e aos quatro dias de incubação (à direita) (Figura publicada por Barbosa, 2011).

Esta fina rede do sistema circulatório vitelínico desempenha papel principal na troca de gases até que a corioalantóide faça contato com a membrana interna da casca entre o quinto e sexto dia de incubação. O mesênquima que recobre o fundo do saco alantoide entra em contato com o mesênquima que recobre o córion. Estes dois anexos embrionários começam a se fundir e o saco alantoide em crescimento pressiona o córion, que se encontra próximo a casca e ao longo de toda a sua extensão. A parte nivelada do alantóide que se adere ao córion constitui a corioalantóide (COSTA, 1950; LILLIE, 1952; HOUILLON, 1972).

A partir do quinto dia de incubação há uma transição da função respiratória exercida pela área vascularizada para a corioalantóide, até o oitavo dia de incubação, quando a área vascularizada termina sua função de troca gasosa (ACKERMAN & RAHN, 1981).

Esta membrana cresce rapidamente e por volta do 12º dia de incubação a corioalantóide já está envolvendo todo o conteúdo do ovo, revestindo toda a superfície da membrana interna da casca e está completamente infiltrada nos poros. A função respiratória da corioalantóide se estende até quase a fase final da vida embrionária (ACKERMAN & RAHN, 1981; TULLET, 1990).

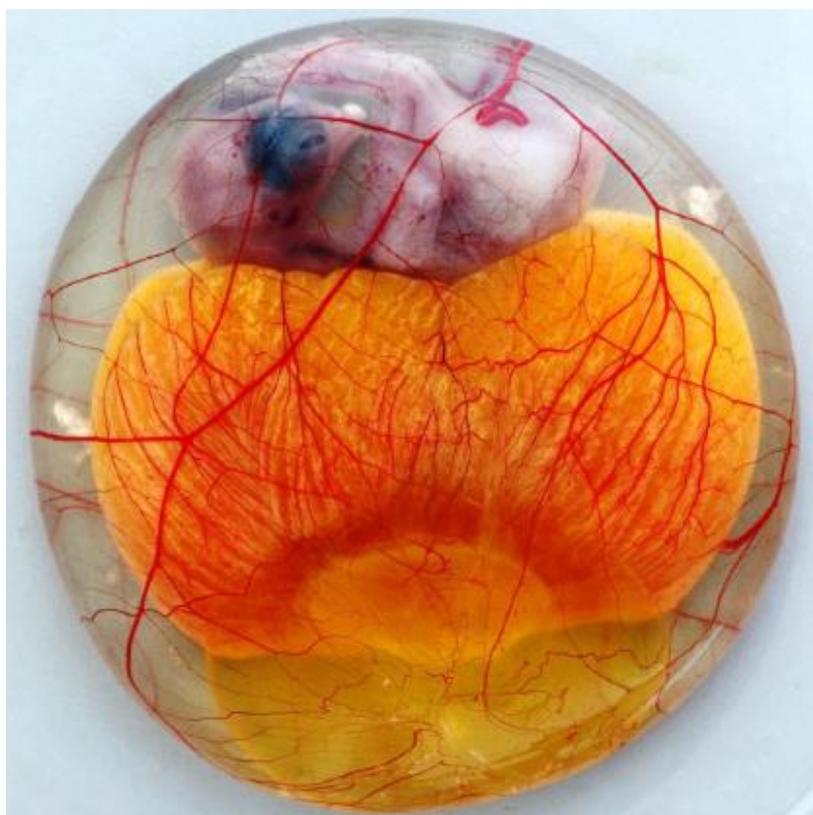


Figura 24. Embrião de galinha com 12 dias de incubação. Nesta etapa, a corioalantóide envolve todo o conteúdo do ovo. (Figura publicada por Barbosa, 2011).

O momento da “bicagem interna” é marcado pela perfuração da membrana corioalantóide e membrana interna da casca e ocorre inicialmente pela reinalação dos gases da câmara de ar, onde inicia a respiração através dos pulmões. A membrana corioalantóide ainda tem funcionalidade, que vai sendo progressivamente reduzida. O estágio de desenvolvimento do embrião se divide

em dois: fase pré-natal até ocorrência da bicagem interna (cuja respiração ocorre através da área vasculosa e posteriormente da corioalantóide); e fase perinatal, que vai da bicagem interna até a bicagem externa da casca. A partir da eclosão, a ventilação pulmonar é estabilizada e os pulmões assumem definitivamente a função respiratória (ROMANOFF, 1960; TULLET & DEEMING, 1982; WANGEESTEN & WEIBEL, 1982; TAZAWA & WHITTOW, 2000).

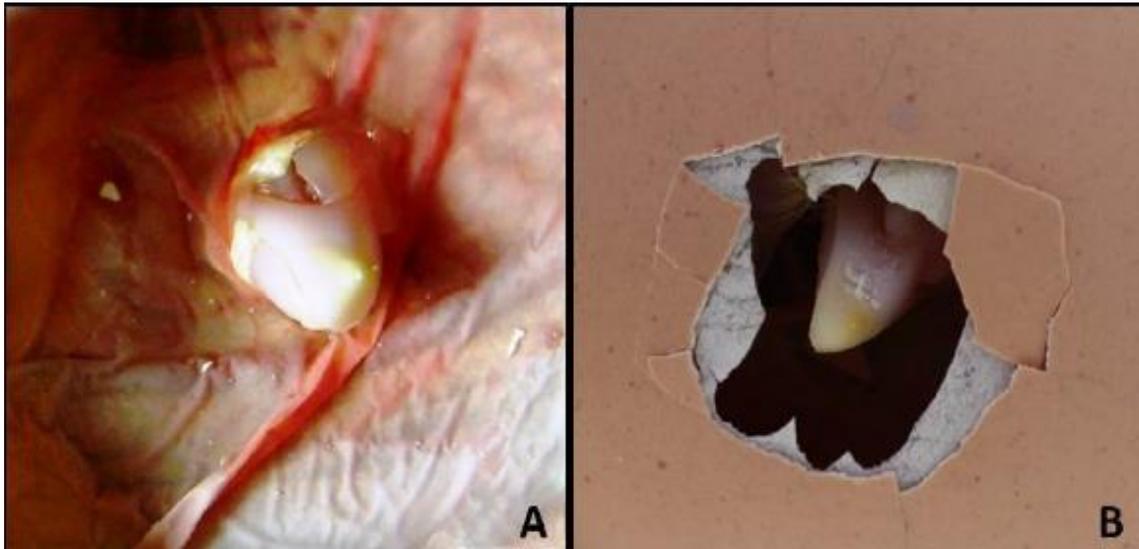


Figura 25. Embrião de galinha iniciando a bicagem interna da casca (A); e finalizando a bicagem externa (B) (Figura publicada por Barbosa, 2011).

2.4.2. Função cardiovascular

O coração primordial do embrião é uma estrutura tubular emparelhada que logo se torna única. A limitação devido à falta de espaço imposta sobre este órgão em crescimento obriga o coração tubular a curvar-se, representando apenas o ventrículo e o bulbo entre as primeiras 36 a 48 horas de incubação. As alterações estruturais que separam o átrio do ventrículo, ventrículo da aorta, e às câmaras direita e esquerda, ocorrem a partir do 3º dia e estendem-se ao 8º dia de incubação. O coração do embrião atinge sua estrutura e morfologia definitiva com aproximadamente 18 dias de incubação (HAMBURGER & HAMILTON, 1951; LA CRUZ et al., 1972; TAZAWA & WHITTOW, 2000; BELLAIRS & OSMOND, 2005).

Os primeiros batimentos são evidenciados com aproximadamente 30 horas de incubação sendo que o sangue começa a circular após cerca de 40

horas, quando as conexões entre a aorta dorsal e os vasos do saco vitelino completam a área vascular. A pressão arterial e o volume de sangue aumentam como uma função exponencial do tempo de incubação, mas a taxa do aumento de volume sanguíneo é menos veloz comparada ao crescimento do embrião. Embora a tendência do débito cardíaco seja aumentar paralelamente com o crescimento embrionário, a sua distribuição para a corioalantóide diminui à medida que os embriões crescem. Provavelmente, no 10º dia de incubação, cerca de metade do débito cardíaco vai para a circulação corioalantóide, e no 18º dia apenas um quarto do débito cardíaco flui através dela (TAZAWA et al., 1971; OKUDA & TAZAWA, 1988; CROOSLEY II et al., 2002).

Com o início da bicagem interna, o fluxo de saída do sangue do ventrículo e átrio direitos para os pulmões aumenta enquanto este fluxo para os tecidos sistêmicos e a corioalantóide diminui. No período perinatal o fluxo para os tecidos e corioalantóide diminuem tanto, que até o momento da eclosão, 75% do sangue que sai do átrio direito circula pelas artérias pulmonares (RAHN et al., 1985; SBONG & DZIALOWSKI, 2007).

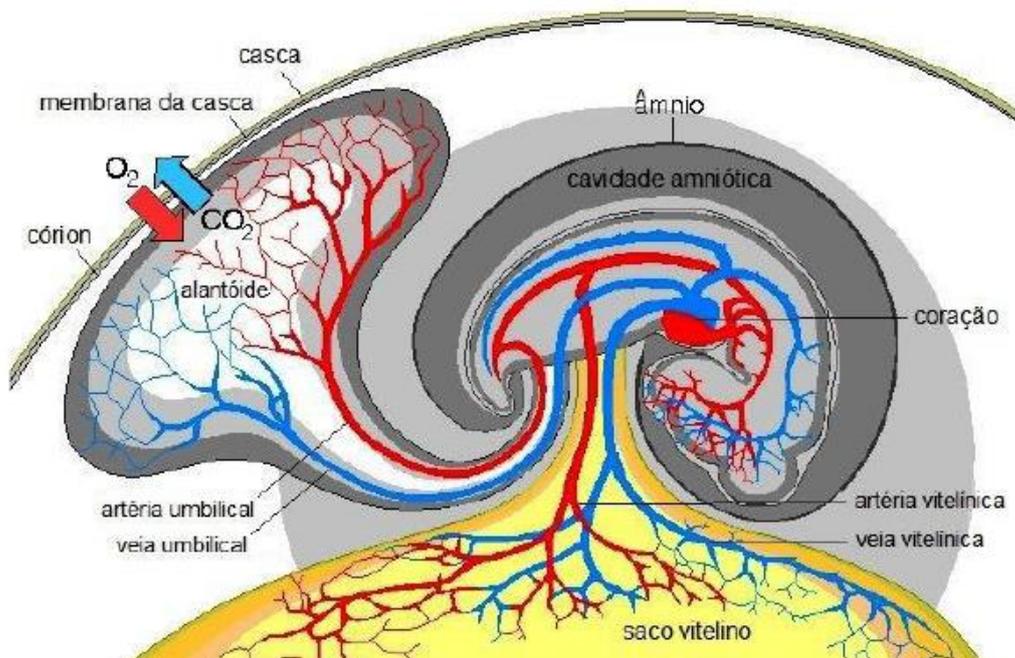


Figura 26. Desenho esquemático da circulação cardiovascular embrionária. Adaptado de Staveley (2011).

Em contraste com os padrões das variáveis circulatórias que aumentam com o crescimento embrionário, a frequência cardíaca se altera de forma diferente durante a incubação. A frequência dos batimentos cardíacos aumenta rapidamente e depois se estabiliza até o início da segunda semana de desenvolvimento do embrião. Durante a última metade de incubação, a variação diária da frequência cardíaca torna-se pequena. Quando os embriões bicam a casca e começam a respirar o ar, a frequência cardíaca aumenta significativamente, e após a eclosão reduz para os mesmos níveis pré-natais (TAZAWA et al., 1992; AUBERT et al., 2004; LIERZ et al., 2006).

Assim que os embriões crescem, o peso do coração também aumenta até que a taxa de crescimento é desacelerada durante os últimos estágios de desenvolvimento. O crescimento relativo do coração é maior do que o crescimento corporal no início do desenvolvimento embrionário quando comparado com os períodos posteriores. A relação de peso do coração/massa corporal total cai de 1,8% no 4º dia para 0,7%, no dia 18º de incubação (TAZAWA & WHITTOW, 2000).

A influência da idade da matriz pesada sobre os parâmetros sanguíneos e cardíacos da progênie foi estudada por Luquetti et al. (2004). Foram utilizados pintos recém-eclodidos provenientes dos ovos das aves com 30, 45 e 60 semanas de idade. O hematócrito, concentração de hemoglobina e a viscosidade sanguínea não revelaram diferenças significativas entre as idades.

Barbosa et al. (2008) estudaram a relação peso do coração/peso do pinto dos descendentes de matrizes leves de diferentes idades. Esta relação nos pintos das matrizes com 56 semanas tiveram maior percentual (0,81%) do que aqueles descendentes das matrizes com idades de 26 e 41 semanas (0,78%) que foram estatisticamente semelhantes.

Comparando pintos recém-eclodidos de matrizes pesadas com 29 e 60 semanas, Morita et al. (2009) avaliaram os parâmetros de peso absoluto do coração e sua relação percentual com o peso do pinto, hematócrito e concentração de hemoglobina. Todas as variáveis foram semelhantes entre as duas idades das aves.

2.4.3. Função digestiva

No início do desenvolvimento embrionário, o acesso ao oxigênio é limitado à difusão simples auxiliada por hemoglobina ainda primitiva. A energia gasta neste momento decorre em grande parte por glicólise através de glicose prontamente acessível ou por um aumento transitório de lactato que ocorre até a corioalantóide se tornar funcional (CIROTTO & ARANGI, 1989).

Conforme descrito por Patten (1951), o início da formação do trato gastrointestinal se dá nas primeiras horas de incubação, porém, até o final do primeiro dia, o intestino primitivo ainda não sofreu diferenciação entre regiões. Os embriões de 50 a 55 horas estabelecem o intestino anterior, sendo reconhecidas as regiões esofágicas e faríngeas. Aos três dias de incubação, os embriões já têm o intestino anterior, médio e posterior definidos, com estas porções ampliando seu comprimento ao dia seguinte (BARBOSA, 2011).

Já no quinto dia de incubação, verifica-se diferenciação considerável da cavidade oral e formação das cavidades estomacais (pró-ventrículo e moela). O sexto dia encontra-se marcado pelo início da formação do bico e até o 14º dia o alojamento do intestino na cavidade abdominal (BARBOSA, 2011).

Morfologicamente, considera-se que as funções do sistema gastrintestinal dos frangos começam a se desenvolver quando o fluido amniótico é oralmente consumido por volta do 16º ao 17º dia de incubação (FERKET & UNI, 2006). A inoculação de nutrientes no líquido amniótico permite, portanto, a introdução de nutrientes específicos em contato com o enterócito antes da eclosão, direcionando sua diferenciação e melhorando a capacidade de digerir alimentos pelos embriões (VIEIRA, 2005). A inoculação de nutrientes in ovo também eleva o nível de nutrientes disponível ao embrião, principalmente glicose, evitando assim a gliconeogênese de proteínas endógenas. Por outro lado, quando em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar desequilíbrio osmótico, resultando na morte imediata do embrião (CAMPOS et al., 2011).

Outrora, durante os últimos dias de incubação, o trato gastrintestinal é uma das regiões que mais se desenvolve, passando de 1% do peso do embrião aos 18 dias de incubação para 3,5% no momento da eclosão. Segundo Uni et al. (1999), esse aumento do peso pode ser atribuído ao rápido desenvolvimento dos vilos na fase final de incubação, estando diretamente relacionado com a ingestão do líquido amniótico nos últimos dias de incubação.

Após a eclosão, o trato gastrintestinal continua a se desenvolver rapidamente, e de acordo com Dror et al. (1977), os órgãos do aparelho digestivo de pintos de corte atingem o peso relativo máximo entre 3 e 8 dias de idade. Todavia, conforme Akiba e Murakami (1995), e Noy e Sklan (1999), logo após a eclosão, o peso do intestino delgado aumenta mais rapidamente do que o peso corporal.

Quanto ao desenvolvimento intestinal, especificamente, este não apresenta um padrão de crescimento uniforme em seus diferentes segmentos, sendo que o duodeno apresenta desenvolvimento mais precoce que o jejuno e o íleo (UNI et al., 1999). A mucosa intestinal apresenta desenvolvimento mais lento que o aumento do diâmetro intestinal até, aproximadamente, 14 dias de idade (NOY & SKLAN, 1997). Ao nascimento, os enterócitos e as vilosidades encontram-se pouco desenvolvidos e reduzidas criptas são observadas. Estas criptas aumentam em número e tamanho e se proliferam rapidamente nos primeiros dias após o nascimento (GEYRA et al., 2001).

E apesar de no momento da eclosão, os pintos estarem aptos a consumir dietas exógenas, seu trato gastrointestinal ainda não encontra-se plenamente desenvolvido. E a adaptação à ingestão de alimentos depende do rápido desenvolvimento dos mecanismos de digestão e absorção de nutrientes, que por sua vez dependem diretamente do estímulo dado pela passagem de alimento no trato digestivo (VIEIRA & POPAL, 2000).

A maturidade da mucosa intestinal é representada pelo aumento na produção e atividade das enzimas digestivas, dos transportadores de membrana e pelo desenvolvimento dos enterócitos das criptas (NISTAN et al., 1991). Estudos demonstraram que a maturidade intestinal pode ser influenciada por agentes tróficos, que estimulam o processo mitótico das células intestinais, e estão relacionados com a ingestão e digestão dos alimentos, bem como com as propriedades químicas dos nutrientes presentes no lúmen intestinal. O atraso no fornecimento de ração resultou em retardo no desenvolvimento da mucosa (UNI et al., 1998).

À medida que o embrião cresce, o saco vitelino regride no tamanho e vai sendo interiorizado na linha do intestino médio embrionário, até que, finalmente, à eclosão, seja incorporado ao pequeno intestino do pintainho onde estará presente ainda, por várias horas, após a eclosão (MICHEL & SCHWARZE, 1970).

Estudos prévios demonstraram que a alimentação imediatamente a pós-eclosão aumenta o desenvolvimento morfológico do intestino delgado (NOY & SKLAN, 1998), enquanto que o fornecimento tardio prejudica o desenvolvimento da mucosa intestinal (GEYRA et al., 2001; UNI et al., 1998; UNI et al., 2003).

Nesse contexto, verificou-se que pintos não alimentados nas primeiras 48 horas após a eclosão tendem a apresentar menor comprimento de vilos (YAMAUCHI et al., 1996) e menor tamanho de cripta (GEYRA et al., 2001).

Estes ocorrem devido o desenvolvimento do sistema gastrintestinal ser retardado sob condições de jejum, podendo estar relacionado com o atraso na utilização da gema. Além disso, o atraso no fornecimento de alimento leva a alterações na morfologia dos microvilos e mudanças fisiológicas, tais como profundidade de cripta (MAIORKA et al., 2003), sendo que esses defeitos podem contribuir ao baixo desempenho dos frangos (PINCHASOV & NOY, 1993).

2.5. Características do pintainho recém-nascido

A qualidade do pintainho após a eclosão é definida de acordo com o padrão de julgamento imposto por distintos especialistas (RAGHAVAN, 1999; DEEMING, 2000). De acordo com Schmidt et al. (2002), um pintainho de boa qualidade deve ser limpo, seco, livre de contaminações, com olhos brilhantes, atento e interessado pelo ambiente ao redor, respondendo ao som, livre de deformidades e com o umbigo limpo, bem cicatrizado, sem saco vitelino (deve encontrar-se já absorvido ao meio interno) ou membrana seca ao redor do mesmo. O corpo deve ser firme ao toque e sem sinais de estresse respiratório. As pernas devem ser normais, sem inchaço e sem deformação e lesão de pele. Os bicos devem ser bem formados, firmes e retos.

É importante salientar que a qualidade do pintainho está estritamente relacionada com as características do ovo incubado. Neste sentido, é fundamental a manutenção de suas propriedades reprodutivas para a produção de pintainhos viáveis e com alta qualidade (ROSA & ÁVILA, 2000).

Vale ressaltar ainda que o peso do pintainho ao nascer tem forte correlação com o peso do ovo de origem (WILSON, 1991; SILVERSIDE & SCOTT, 2001; SCHMIDT et al., 2003) e varia de 62% a 76% do peso deste ovo (SHANAWANY, 1987; YANNAKOPOULOS & TSERVENI-GOUSHI, 1987).

Por outro lado, Decuypere e Michels (1992) e Borzemska et al. (1998) afirmaram que uma boa taxa de eclosão não está necessariamente correlacionada de modo positivo com alta porcentagem de pintainhos de boa qualidade. A variação do peso do pintainho ao nascimento ocorre em função da perda de peso do ovo (MAIORKA et al., 2003).

Em levantamento realizado por Shanawany (1987), em 110 trabalhos realizados com frangos de corte, o peso médio do pintainho foi de 40,6 g, enquanto o peso médio do ovo foi de 59,4 g, determinando que o peso médio de eclosão (% peso do ovo) foi de 68,4%. Além disso, o autor sugere uma fórmula para prever o peso da ave na eclosão, como sendo: $\text{Peso eclosão} = 0,96 \times (\text{Peso do ovo}) 0,90$.

Elguera (1999) sugeriu a ideia de dimensionar o efeito negativo de incubar ovos não adequados, e com isso foi elaborada uma tabela a partir do informe mensal da AgriStats (Junho 99). Do grupo dos dez piores produtores, se elegeu ao acaso um deles identificado como complexo A. Ao se fazer o estudo dos rendimentos na área de reprodução, verificou-se que não só os frangos produzidos por este grupo tinham problemas, já que se comprovou também o baixo índice de produção, a alta porcentagem de ovos comerciais e a baixa eclosão nos lotes de onde se produziram os ovos. Isto confirma o fato que ovos de má qualidade produzem frangos com rendimentos inferiores. O autor concluiu que além da alta mortalidade inicial verificou-se que os frangos não desenvolveram nem converteram o alimento eficientemente, sendo provável que o ponto inicial de toda esta má trajetória seja a qualidade inferior dos ovos incubados utilizados para este grupo.

Por outro lado, Pinchasov (1991) afirmou que a vantagem do alto peso inicial atribuído a pintainhos provenientes de ovos grandes diminui rapidamente depois do nascimento e o principal fator que afeta o peso corpóreo final é o consumo de ração.

Tona (2003) observou que os ovos que ficaram armazenados por períodos maiores (18 dias) proporcionaram aves com pior qualidade quando comparados com os pintainhos provenientes dos ovos que foram armazenados por 3 dias. Além disso o mesmo autor afirmou ainda que, baseado nas informações de produtores, os pintainhos de pior qualidade resultavam em 200 a 300 g a menos de peso no abate do que pintainhos de boa qualidade.

O armazenamento dos ovos por 14 dias comparado com o armazenamento por 1 dia antes da incubação reduziu o peso do coração aos 12 dias de vida do embrião. O peso embrionário de linhagens com baixas taxas de viabilidade foi parecido entre os embriões de ovos armazenados por 1 e 14 dias, mas na linhagem com alta taxa de viabilidade, o armazenamento diminuiu o peso corporal e de órgãos (CHRISTENSEN, et al., 2002).

Lijla e Olsson (1987) sugeriram que entre os embriões de aves selecionados para rápido crescimento após a eclosão, a organogênese é caracterizada por crescimento preferencial dos órgãos de fornecimento (coração, fígado e intestinos) ao invés dos órgãos de demanda (músculos e sangue). Assim, os efeitos das condições do armazenamento podem aumentar fatores internos, tais como a habilidade do embrião de produzir energia e obter nutrientes do ovo (LIJLA & OLSSON, 1987; CHRISTENSEN et al., 2001). Conseqüentemente, o potencial de crescimento de cada tecido nos vários estágios de diferenciação pode também ser afetado (RICKLEFS, 1987).

Capítulo 3
BIOTECNOLOGIAS
REPRODUTIVAS NA AVICULTURA

3.1. Biotecnologia aplicada a reprodução de aves

Dentre as ferramentas que auxiliaram no desenvolvimento da reprodução animal de maneira geral, a biotecnologia destaca-se pelo seu poder de ampliação de possibilidades e de manipulação de recursos genéticos e biológicos com resposta em curto prazo.

De acordo com Brillard (2006), esta pode ser aplicada desde a inseminação artificial até a manipulação de embrião, transferência de genes e sexagem de embriões. Entretanto, o rápido desenvolvimento destas tecnologias em mamíferos contrasta com aplicações relativamente limitadas em aves. Isto pode ser explicado pela dificuldade em acessar o ócito e o embrião de aves. Além disso, a transferência embrionária, comumente realizada em mamíferos, não pode ser considerada de interesse prático em aves devido a condições inerentes a sua própria fisiologia reprodutiva. Apesar das restrições supracitadas, o desenvolvimento de técnicas ligadas a inseminação artificial e de criopreservação de sêmen são uma realidade. Este trabalho visa abordar aspectos ligados a fisiologia reprodutiva, aplicações biotecnológicas e condições práticas de campo dentro da avicultura (RUTZ et al., 2007).

A conservação da variabilidade genética em espécies de animais domésticos é um desafio para a produção sustentável de recursos alimentares para os humanos, para o manejo animal e muito mais para a preservação da biodiversidade (BLESBOIS et al., 2007).

Os pioneiros na biotecnologia de reprodução avícola são Burrows e Quinn (1937), que desenvolveram o método de massagem abdominal e pressão na região da cloaca, para coletar sêmen de galos. Com a técnica de coletar sêmen de aves, o rápido manuseio e o transporte desse sêmen de um lote de machos para onde se encontram as fêmeas, permitiu flexibilidade para quem trabalha com inseminação artificial e propiciou o desenvolvimento de procedimentos eficientes para preservar o sêmen de aves em condições *in vitro* por algumas horas (RUTZ et al., 2007).

Metade das raças de aves domésticas está sendo considerada em risco de extinção (DOHNER, 2001). Por exemplo, na França, um total de 154 raças e linhagens de galinhas foram descritas (TIXIER-BOICHARD et al., 2001), representando uma grande diversidade de populações. Pequenas populações também estão expostas ao fracasso, mas estes recursos poderiam ser

preservados através de programas de conservação (PISENTI et al., 1999; HIEMSTRA, 2003; BLACKBURN; 2004, BLACKBURN, 2006; WOELDERS et al., 2006).

Enquanto as populações diminuem de tamanho (na natureza ou em cativeiro), a endogamia pode ocorrer que, por sua vez, pode reduzir a aptidão reprodutiva (NEI et al., 1975), incluindo a fecundidade e a sobrevivência (RALLS & BALLOU, 1986). Quando a variação genética é mantida ou aumentada, o vigor da população e a capacidade de adaptação às mudanças ambientais são reforçadas.

Desafios no manejo de aves aquáticas incluem a hibridação do cruzamento entre espécies (ANKNEY et al. 1986), que pode resultar em uma perda de singularidade das espécies, em especial adaptação, em características de aptidão, e em fracasso de reprodução no cativeiro devido a problemas comportamentais associados ao confinamento (HEDIGER, 1965).

Uma solução para estes desafios de manejo é a utilização de técnicas de reprodução assistida, incluindo a preservação de espermatozoides juntamente com a inseminação artificial. Tais estratégias podem complementar os programas de reprodução em cativeiro, preservando genes valiosos de indivíduos para infundir as gerações futuras; reduzindo o risco de transmissão de doenças através do transporte de material genético, em vez de transporte de aves entre os bandos, e fornecendo uma reposição de material genético para as espécies ainda não ameaçadas, mas que podem ser ameaçadas, eventualmente, por hibridização inesperada (com espécies comuns) ou por uma catástrofe natural (LAVOR & CÂMARA, 2012).

Embora existam informações disponíveis sobre a fisiologia básica do espermatozoide de aves zootecnicamente importantes, em especial galos (*Gallus gallus*) e perus (*Meleagris gallopavo*) (BAKST, 1990), existe escassez de informações sobre as aves não domésticas. Se a inseminação artificial é para ser uma ferramenta eficaz no manejo e conservação de espécies raras, as pesquisas em reprodução devem ser prioridade se concentrando na coleta adequada e consistente de sêmen e na adequação da sensibilidade espermática ao resfriamento e congelamento-descongelamento (LAVOR & CÂMARA, 2012).

Vários estudos têm abordado a questão das técnicas de desenvolvimento de criopreservação para aves domésticas (POLGE, 1951) e cisnes doméstico

(*Cygnus olor*) (TAI et al, 1983; TSELUTIN et al, 1995; WATANABE et al, 1981).
Todavia, pouco tem sido estudado sobre as espécies de aves não-domésticas
(SEXTON & GEE, 1978; GEE, 1983) e menos ainda sobre as aves aquáticas
não-domésticas (GEE & SEXTON, 1990).

3.2. Inseminação artificial em aves

Os pioneiros nesta biotecnologia da reprodução avícola são Burrows e
Quinn (1937 e 1939), que desenvolveram o método de massagem abdominal e
pressão na região da cloaca, para coletar sêmen de galos. Com a técnica de
coletar sêmen de aves, o rápido manuseio e o transporte desse sêmen de um
lote de machos para onde se encontram as fêmeas, permitiu flexibilidade para
quem trabalha com inseminação artificial e propiciou o desenvolvimento de
procedimentos eficientes para preservar o sêmen de aves em condições *in vitro*
por algumas horas (RUTZ et al., 2007).



Figura 27. Aplicação da técnica de coleta de sêmen do galo (A) e do peru (B)
(Figura publicada por Burrows e Quinn, 1939).

A inseminação artificial nessas condições é utilizada com sêmen fresco. Esta técnica é utilizada em criações de perus por dificuldades de acasalamento por monta natural e em galinhas d'angola (vulgo capotes ou picotes) pela sazonalidade da monta natural. Neste contexto, espermatozoides de aves criopreservados produzem baixa fertilidade de ovos e seu uso ainda é experimental (Gill et al., 1999). A inseminação artificial é aplicada em aves e a coleta de sêmen e seu processamento, foram amplamente revisados por Sexton e Gee (1978), Lake (1986) e por Donoghue e Wishart (2000).



Figura 28. Técnica de inseminação artificial em aves aplicada em perus (Figura publicada por Burrows e Quinn, 1939).



Figura 29. Aplicação da técnica de reversão da cloaca e deposição de sêmen no oviduto de galináceos e perus (Figura publicada por Burrows e Quinn, 1939).

Basicamente, na inseminação os galos são submetidos ao processo de coleta de sêmen, a qual consta de suave massagem no abdômen, movimentos rítmicos na sua parte ventral e nas penas da cauda do reprodutor. Quando a tumescência fálica é atingida, as mãos do técnico são colocadas ao redor da cloaca e os seus dedos polegar e indicador pressionam levemente a cloaca ventralmente.



Figura 30. Coleta de sêmen do galo para uso na inseminação artificial.

As estruturas da cloaca não devem ser tocadas para evitar a disseminação de agentes patogênicos, sendo que a coleta deve ser realizada pelo mesmo técnico para evitar variação nos resultados. Logo em seguida o mesmo procedimento deve ser aplicado na reversão da cloaca das fêmeas e o

sêmen ser introduzido no oviduto através da utilização de uma pipeta de volume fixo com graduação entre 0,025 à 0,100 ml, obedecendo assim metodologias propostas por Burrows e Quinn (1939), Etches (1996) e Bakst e Bahr (1995).

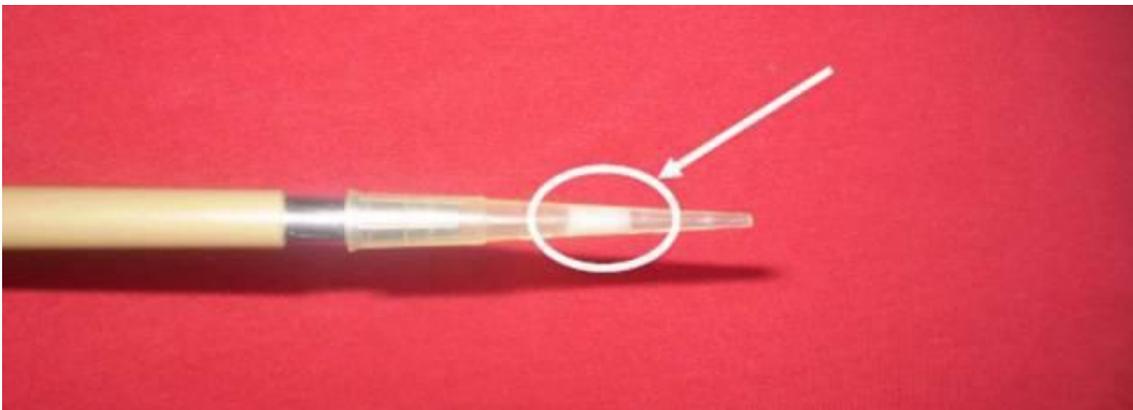


Figura 31. Ponta de pipeta com alíquota de sêmen a ser utilizada em destaque.



Figura 32. Deposição do sêmen diretamente no oviduto da galinha (inseminação propriamente dita).

Porém, para que a inseminação apresente resultados positivos deve-se levar em consideração diversos fatores como a escolha do reprodutor e as características seminais do mesmo que podem ser evidenciadas através do exame andrológico (análise de características seminais).

Na avaliação do exame andrológico, o volume é determinado em seringa ou recipiente graduados no momento da coleta, evitando assim que haja perdas. Imediatamente após a coleta, uma gota de sêmen deve ser colocada sobre lâmina e lamínula, sendo visualizada em microscópio óptico com aumento de

pelo menos 400x para avaliação das características dos espermatozoides, conforme as seguintes análises (CBRA, 1998; CBRA, 2013):

- A motilidade é determinada pela porcentagem de espermatozoides em movimento (0 a 100%);
- O vigor é estimado pelo movimento progressivo retilíneo e uniforme dos espermatozoides, em uma escala de zero à cinco, sendo o escore zero equivalente à ausência total de movimento dos espermatozoides e o escore cinco à movimentação intensa, vigorosa e progressiva;
- A densidade é mensurada a partir do escore de espaçamento entre os espermatozoides de zero à quatro, sendo o escore zero amplo espaço entre os espermatozoides e o escore quatro, ausência total de espaço entre os espermatozoides;
- O turbilhonamento é avaliado pelo movimento progressivo de massa dos espermatozoides, em uma escala de zero à cinco, sendo o escore zero equivalente ao movimento de massa com pouquíssima motilidade e desuniforme dos espermatozoides e o escore cinco à motilidade aumentada e em movimentação progressiva e em ondas.
- A textura é atribuída em escala de zero à três, onde zero representa textura aquosa e três representou textura cremosa;
- A coloração é avaliada em escore de zero à três, onde zero representou coloração branca aquosa e três representou coloração branca cremosa;
- Para determinação da concentração espermática, o sêmen é diluído na proporção de 1:800 em solução de azul de metileno e os espermatozóides contados em lâmina específica denominada câmara de Neubauer, sob microscopia óptica com aumento de 400x.

Na avaliação da morfologia espermática, o sêmen é colocado em tubo tipo eppendorf, devidamente identificado, contendo citrato de sódio formolado à 4%. Uma gota deste é colocada em lâmina de microscopia e emergida em procedimento de kit panótico realizado em três passos. Após este processo, são contadas 200 células espermáticas por amostra de sêmen em aumento de 640x, anotando-se as formas anormais. Os defeitos espermáticos geralmente são classificados em defeitos de cabeça (enrolada, turmeifeita (inchada), dobrada e

isolada), defeitos de cauda (turmefeita (inchada), dobrada e isolada), presença de gota e taxa de normalidade.



Figura 33. Realização de exame do sêmen de galos (exame andrológico).

Além disso, deve-se avaliar continuamente os resultados obtidos através da inseminação, incubando os ovos e avaliando o desempenho dos pintos gerados a partir destes.

Algumas vantagens da inseminação artificial em aves (BURROWS & QUINN, 1939; BAKST & BAHR, 1995; ETCHES, 1996; CBRA, 1998; CBRA, 2013; RUFINO et al., 2014) são:

- Eliminação de acasalamento preferencial;
- Reprodução de linhagens comerciais e espécies de monta difícil ou impossível;

- Menor número de machos pelo mesmo de fêmeas (redução de 7-10% para 2-3%);
- Aumento da descendência dos machos de alto valor genético;
- Elevação nos níveis de fertilidade (é possível compensar quedas na qualidade espermática e na capacidade de armazenamento da fêmea pelo aumento de concentração da dose inseminante e do número de inseminações, além da garantia de que todas as fêmeas foram inseminadas);
- Redução nos custos de alimentação em 10 a 20% (menor necessidade de energia para a atividade sexual);
- Possibilidade de aumentar a capacidade produtiva das instalações já existentes (pode-se dobrar a densidade de criação no galpão ao sair do piso para a gaiola);
- Aumento na porcentagem de ovos incubáveis próximo de 2% (devido ao aumento de ovos limpos).

Quanto as desvantagens da inseminação artificial em aves (BURROWS & QUINN, 1939; BAKST & BAHR, 1995; ETCHESS, 1996; CBRA, 1998; CBRA, 2013; RUFINO et al., 2014), podemos citar:

- Investimentos iniciais em instalações, equipamentos e treinamento de mão-de-obra;
- Demanda e custo de mão-de-obra especializada;
- Possível incidência de pododermatite em aves alojadas em gaiolas (especialmente as de linhagens pesadas).

3.3. Criopreservação de sêmen

O transporte e o manuseio de sêmen de um lote de machos para onde se encontram as fêmeas permitiu uma certa flexibilidade ao pessoal que trabalha com inseminação e propiciou o desenvolvimento de procedimentos eficientes que objetivam preservar o sêmen de aves em condições *in vitro* por determinados períodos de tempo (RUTZ et al., 2007). Assim, técnicas de preservação do sêmen são importantes para manutenção de maior número de espermatozoides viáveis (SAUVEUR, 1988).

Durante a década de 80 foram desenvolvidas várias técnicas de preservação de sêmen em aves (SEXTON & GIESEN, 1982; VAN WAMBEKE & HUYGHEBAERT, 1989; SURAI & WISHART, 1996), mas somente recentemente estas têm sido empregadas em operações comerciais. Estas técnicas permitem preservar o sêmen de galos e perus até por 12 horas. É importante salientar um declínio progressivo na viabilidade espermática durante o armazenamento *in vitro*. Neste sentido, um melhor entendimento do metabolismo espermático e da proteção de membrana contra a peroxidação, conforme supramencionado, são fundamentais (BRILLARD, 2006).

A criopreservação representa ainda um excelente suporte complementar de conservação e pode também ser usada em programas de seleção (HIEMSTRA, 2003; DANCHIN-BURGE & HIEMSTRA, 2003). O único método corrente praticável no manejo de populações de aves é a criopreservação de sêmen, que tem sido estudada especialmente com exemplares da espécie *Gallus gallus*. Alguns experimentos com sucesso têm sido executados em outras espécies de aves domésticas e silvestres, com grandes diferenças efetivas de acordo com a espécie e condições de criação (MASSIP et al., 2004; BLESBOIS et al., 2005).

Na avicultura, especificamente, a criopreservação do sêmen é a única técnica acessível para preservar o germoplasma de aves durante um período prolongado de tempo (CHALAH et al., 1999; TSELUTIN et al., 1999), pois condições de congelamento e de descongelamento ideais e demais metodologias ainda não foram elucidadas de forma eficiente (SURAI & WISHART, 1996).

Neste contexto, apesar do intenso investimento da comunidade científica em pesquisas de criopreservação do sêmen avícola, esses métodos ainda têm sido pouco utilizados em produções avícolas de larga escala. Uma das razões para isso é o fato da inseminação artificial não ser amplamente usada em muitas espécies de aves domésticas (LAVOR & CÂMARA, 2012).

É extensiva a lista de diluidores, conservantes, crioprotetores e de protocolos diferentes usados para melhorar o desempenho do sêmen de diversas espécies de aves, tentando otimizar a produção de proteína animal para o consumo humano e também otimizar a preservação da diversidade de espécies ainda existentes. Dentre esses diluidores, soma-se a água de coco que,

transformada em material pulverizado (água de coco em pó - ACP®), e mantida as suas propriedades fundamentais do líquido in natura com estabilidade e longevidade, pode ser empregada em processos biotecnológicos, substituindo produtos importados, quimicamente constituídos e com preços elevados (MOREIRA-NETO et al., 2009).

E por ser uma solução natural estéril, ligeiramente ácida, composta de proteínas, sais, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, a água de coco fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e a viabilidade dos gametas masculinos e femininos criopreservados (LAVOR & CÂMARA, 2012).

3.4. Nutrigenômica

A genômica pode ser definida como a área das ciências que estuda e analisa milhares de genes simultaneamente, utilizando técnicas aliadas à bioinformática e possibilitando a análise de um expressivo volume de informações com o objetivo de armazenar, manejar, integrar e interpretar estes dados em prol de uma ou mais características (GONÇALVES et al., 2009).

Considerando que a variação genética pode alterar a expressão dos genes, é importante compreender melhor os genes associados ao controle da ingestão de alimento, balanço energético, imunidade, reprodução dentre outros aspectos que influenciam direta ou indiretamente a produção e saúde animal com o objetivo de maximizar a expressão fenotípica destes genes. Neste caso, a compreensão de como a expressão gênica é regulada pelo estímulo nutricional e hormonal oferece novas perspectivas na nutrição de aves, além de práticas de acasalamento e manejo (CAETANO et al., 2004; GONÇALVES et al., 2009).

Na avicultura, especificamente, estas modernas tecnologias foram enriquecidas pelos dados obtidos através do projeto de sequenciamento do genoma dos galináceos (*Gallus gallus*). A primeira versão completa deste estudo revelou um genoma com tamanho relativamente pequeno de 1 bilhão de pares de bases, como das aves em geral, e a presença de aproximadamente 20-23.000 genes (HILLIER et al., 2004). A disponibilização deste genoma levou a comunidade de pesquisa em avicultura a um novo patamar, possibilitando uma

abordagem mais integrada do metabolismo visando a exploração do papel da dieta na produção e nas doenças desta espécie (CAETANO et al., 2004).

Essa grande quantidade de informações possibilitou não apenas o desenvolvimento ativo de plataformas analíticas completas, mas também programas apropriados para armazenamento, organização e análise dos dados, além de revolucionar a nossa abordagem para compreensão da saúde e das características de desempenho de aves.

Neste contexto, encontra-se a nutrigenômica, que é a ramificação das pesquisas em genômica que objetiva estudar a influência da nutrição sobre as alterações na expressão gênica e como estas afetam as características de desempenho e saúde (Figura 33).

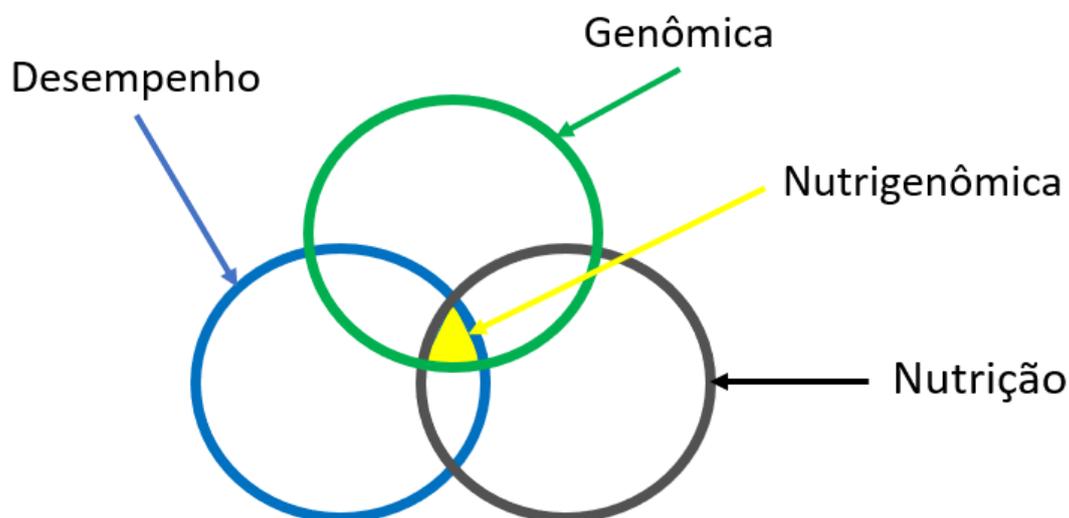


Figura 34. Representação esquemática da formação da nutrigenômica a partir da interação com os principais enfoques da produção animal.

Nesta área de estudo, o enfoque encontra-se no efeito dos componentes bioativos dos alimentos no genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma. Através da determinação do mecanismo, do efeito do nutriente ou efeito do regime nutricional, a nutrigenômica busca definir a relação entre estes componentes específicos ou dietas e características de desempenho.

A utilização das ferramentas para a pesquisa em nutrigenômica permite estudar os mecanismo de nutrientes ou alimentos bioativos sobre a expressão (transcrição e tradução) e sobre o metabolismo de genes, especialmente sobre

o mecanismo molecular e requerimento de nutrientes (TRUJILLO et al., 2006), bem como sobre a forma em que alimentos bioativos podem interagir entre si.

As novas tecnologias como a PCR tempo real e os micro arranjos tornam possível mensurar a expressão gênica desde um único gene até um genoma inteiro. Entretanto, a nutrigenômica ainda é um campo de estudo relativamente novo, que se apresenta numa constante crescente e necessita de muitas informações básicas a serem investigadas a fim de fornecer um subsídio referencial e metodológico capaz de aplicá-la na indústria de larga escala.

Outrora, a nutrigenômica apresenta algumas premissas básicas que ditam o seu estudo (TRUJILLO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2009):

- A dieta e os componentes dietéticos podem alterar o risco de desenvolvimento de doenças, modulando os processos múltiplos envolvidos com o início, a incidência, a progressão e/ou severidade;
- Os componentes do alimento podem agir no genoma, direta ou indiretamente, alterando a expressão dos genes e dos produtos destes;
- A dieta pode potencialmente compensar ou acentuar efeitos de polimorfismos genéticos;
- As consequências de uma dieta são dependentes do estado da saúde ou da doença e da genética de cada indivíduo;
- Intervenções na dieta baseadas fundamentalmente no conhecimento das necessidades nutricionais e no genótipo, podem ser utilizadas para o desenvolvimento de planos nutricionais individualizados que otimizem a saúde e previnam ou minimizem os efeitos das doenças crônicas.

A partir destes preceitos, houve o surgimento dos estudos em nutrigenômica e em nutrigenética, dois campos com diferentes abordagens para a elucidação da interação entre dieta e genes, possui um objetivo final em comum: otimizar a saúde através de uma dieta equilibrada e fornecer poderosa aproximação para decifrar a complexa relação entre moléculas nutricionais, polimorfismo genético e o sistema biológico por inteiro (MUTCH et al., 2005; GONÇALVES et al., 2009).

Todavia, enquanto a nutrigenômica descreve o uso de ferramentas para investigar um sistema biológico em particular, de acordo com um estímulo nutricional que irá permitir o conhecimento de como nutrientes influenciam mecanismos metabólicos e de controles homeostáticos. A nutrigenética, por

outro lado, objetiva compreender como o tipo genético de um indivíduo coordena a resposta deste a uma dieta considerando o polimorfismo genético. Neste caso, o polimorfismo genético é reconhecido como um fator que pode alterar a resposta a componentes da dieta (efeito da transcrição nutricional) por influenciar a absorção, metabolismo ou sítio de ação (KUSSMANN et al., 2006; GONÇALVES et al., 2009).

3.5. Sexagem in ovo

Esta tecnologia foi desenvolvida por cientistas da Universidade de Tecnologia de Dresden e da Universidade de Leipzig, ambas da Alemanha, com o objetivo de modernizar e implantar novos meios de identificação de sexo de pintos no incubatório, visando especialmente substituir a metodologia mais utilizada (sexagem por escore de cloaca) e evitar o descarte maciço de pintos machos com um dia em incubatórios que objetivam a produção de fêmeas, ação que gera protestos de diversos órgãos governamentais ou não.

Esta metodologia usa a espectroscopia para determinar o sexo do embrião ainda em desenvolvimento no ovo. No caso, é utilizado um feixe de laser para cortar um pequeno orifício circular na parte superior do ovo (hemisfério basal), onde a Espectroscopia de Infravermelho Aproximada (NIR) é usada para determinar o sexo do embrião com base no seu teor de DNA, que é de cerca de 2% maior em pintos machos. Assim, este método permite a determinação do gênero dos embriões de ovos fertilizados apenas 72 horas após o início do processo de incubação, apresentando uma exatidão de até 95% nos resultados.

Este processo permite identificar o sexo e verificar como as células masculinas e femininas reagem à luz. O orifício na casca, em seguida, é selado, e os embriões femininos são novamente incubados e os masculinos aproveitados para outras finalidades.

Uma das vantagens apresentadas neste método encontra-se relacionada ao fato do uso de lasers e luz não envolver contato direto e, portanto, não necessitar de desinfecção e peças de reposição. Porém, ao desenvolver o processo, os pesquisadores verificaram diversos pontos a serem melhorados, especialmente como reduzir o tempo necessário para condução do processo, e conseqüentemente, proporcionar a sua aplicação na indústria de larga escala.

Capítulo 4

TECNOLOGIAS IN OVO

4.1. Vacinação in ovo

Já fazem praticamente três décadas que a tecnologia in ovo foi disponibilizada pela primeira vez para vacinação em incubatórios de frangos de corte. Antes desse período, a tríplice vacina contra as doenças de Marek, Gumboro e Bouda Suave eram administradas a pintinhos de corte via injeção subcutânea manual na base do pescoço. É importante destacar que a máquina Inovoject R©, fabricada pela Embrex, Inc., foi o primeiro sistema automatizado a ser introduzido nos Estados Unidos (RICKS et al., 1999), sendo pioneira neste segmento em termos de tecnologia aplicada a indústria.

Estudos conduzidos para investigar a potencial eficácia e uso comercial de vacinas, culturas e suplementos nutricionais envolvem o uso de aplicações manuais (injeção de mão) e automatizadas (inoculação de ovo único e máquina multi-injetora comercial). Além das vacinas aplicadas comercialmente, outras vacinas testadas experimentalmente incluem as da gripe aviária (STONE et al., 1997) e *Mycoplasma gallisepticum* (ELLIOTT et al., 2017).

Peebles (2018) comentou que no ano de 2018, máquinas de vacinação in ovo fabricadas por quatro grandes empresas diferentes atendem à mais de 90% dos incubatórios dos EUA, com capacidade de administrar vacinas de 25.000 a 62.000 ovos por hora. Williams e Zedek (2010) publicaram um relatório comparando os efeitos de dois diferentes sistemas de vacinação in ovo fabricados nos EUA sobre os resultados de eclodibilidade e eclosão, considerando a idade do lote de matrizes e o dia da transferência. Estes verificaram que dentre as vantagens da vacinação in ovo, observa-se a capacidade de vacinar mais rapidamente um número maior de ovos, uma redução nos custos de mão de obra e os riscos de erro humano, e a indução mais precoce de uma resposta imune eficiente. Estes comentam ainda que o processo de vacinação in ovo normalmente ocorre rapidamente em um intervalo de tempo limitado durante a transferência de ovos do incubatório para o nascedouro, prática comum entre 17,50 e 19,20 dias de incubação, dependendo do protocolo de incubação adotado (RICKS et al., 1999; WILLIAMS, 2011).

O uso da vacinação in ovo em embriões de última geração já comprovou ser seguro, apresentando efeitos mínimos sobre a eclodibilidade. Entretanto, verificou-se que vários fatores podem influenciar a eficácia do procedimento de vacinação in ovo. Entre estes estão o local (AVAKIAN et al., 2002; WAKENELL

et al., 2002; WILLIAMS, 2007; WILLIAMS & HOPKINS, 2011), estágio de desenvolvimento do embrião (RICKS et al., 1999; AVAKIAN, 2006; SOKALE et al., 2017) e o nível de controle sanitário mantido no incubatório, no equipamento destinado a vacinação in ovo (vacinadora), e na preparação das vacinas (RICKS et al., 1999). Wakenell et al. (2002) afirmaram que, quando depositada na câmara de ar ou na região do alantóide, a vacina contra doença de Marek foi ineficaz. No entanto, quando a deposição desta foi no corpo do embrião ou no âmnio, proporcionou proteção eficaz contra a doença.

Levando em consideração diversos estudos, o âmnion atestou ser o local ideal para a deposição de vacinas durante o processo de vacinação in ovo, pois permite que esta seja aspirada e digerida para uma assimilação sistêmica mais completa pelo embrião. Ao utilizar os sistemas de incubação NatureForm e Jamesway, o âmnio pode ser efetivamente acessado aos 18,5 dias de incubação, o que corresponde a um estágio intermediário e final do desenvolvimento embrionário (AVAKIAN, 2006; ELLIOTT et al., 2017; SOKALE et al., 2017), que é anterior à punção interna e quando a cabeça do embrião é posicionada medialmente em relação às suas pernas. Para atingir o âmnio, uma profundidade de injeção de aproximadamente 2,49 cm do topo da extremidade maior do ovo para incubação de frangos de corte tem sido comumente usada (KERALAPURATH et al., 2010a,b; ZHAI et al., 2011).

Quanto ao volume apropriado da solução usada para vacinação in ovo, parâmetro extremamente importante, McGruder et al. (2011a) sugeriram que os volumes de solução para uma variedade de eletrólitos igual ou maior que 2.000 μL devem ser evitados, e Zhai et al. (2011) defendem que, para atingir um nível de 90% de eclodibilidade de ovos fertilizados, os volumes de injeção de carboidratos não devem exceder 700 μL . No entanto, o volume de solução comumente utilizado para a administração comercial da vacina contra a doença de Marek (mais utilizada) é de 50 μL .

4.2. Administração de soluções in ovo

A partir da constatação de que era possível administrar vacinas através da tecnologia in ovo com comprovada eficiência, ou seja, sem causar prejuízos aparentes ao desenvolvimento embrionário e aos parâmetros de incubação,

abriu-se a possibilidade da inoculação de outras substâncias com diferentes objetivos e visando atingir outros sistemas além do sistema imunológico.

Neste contexto, McGruder et al. (2011b) testaram os efeitos da inoculação in ovo dos estimulantes cafeína e teofilina aos 16 dias de incubação sobre o desenvolvimento e utilização do saco vitelino de embriões de frangos de corte. As variáveis analisadas aos 18 dias de incubação incluíram a mortalidade, a porcentagem de perda de peso do ovo, o peso corporal e o peso do saco vitelino como porcentagens do peso do ovo, e as concentrações de umidade do embrião e do saco vitelínico. Neste estudo, os ovos foram inoculados com um volume de 200 µL de cafeína em água deionizada nas concentrações de $1,1 \times 10^{-3}$, 1×10^{-6} ou 1×10^{-9} mM. E quando comparados aos controles inoculados com 117 mM de NaCl, a concentração de cafeína a 1 mM diminuiu o peso corporal do embrião em porcentagem do peso do ovo e aumentou a mortalidade e o teor de umidade dos embriões aos 18 dias de incubação.

Foram realizados ainda estudos para avaliar os efeitos da inoculação in ovo de hormônios como a testosterona e a tiroxina para embriões de frangos de corte, do hormônio liberador de tirotropina (TRH) e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) em embriões de perus e frangos, respectivamente, além de estudos para avaliar os efeitos da inoculação do hormônio de crescimento do frango (GH) e do fator de crescimento insulina-I (IGF-I) no desenvolvimento de embriões de frangos de corte (PEEBLES, 2018).

Em outra abordagem, Cox et al. (1992) testaram os potenciais efeitos protetores da inoculação in ovo de uma cultura de exclusão competitiva indefinida e anaerobicamente cultivada. Um volume de 100 µL em diluições de 1:1.000 e 1:1.000.000 da cultura, derivada do ceco de galinhas adultas saudáveis, foi inoculada aos 18 dias de incubação na câmara de ar dos ovos utilizando agulhas hipodérmicas calibre 22. Com a eclodibilidade se aproximando dos níveis comercialmente aceitáveis em alguns dos testes conduzidos e a evidência de resistência ao desafio de *S. Typhimurium* nas aves que receberam a cultura, foi sugerido que a inoculação in ovo de culturas competitivas de exclusão pode ser utilizada a fim de conferir proteção contra uma infecção por salmonelas a pintos em um ambiente contaminado.

Já Meijerhof e Hulet (1997) relataram os resultados de três experimentos sobre a possível influência da inoculação in ovo de uma cultura competitiva de

exclusão contendo uma mistura de várias espécies de bactérias selecionadas não reveladas, como uma medida de proteção contra *Salmonella Panama* em ovos férteis de frangos de corte. Todavia, a inoculação desta na câmara de ar reduziu a eclodibilidade, enquanto a inoculação no corpo propriamente dito causou uma queda quase total neste parâmetro. Este aumento na mortalidade durante a primeira semana do período pós-eclosão, em resposta à inoculação na câmara de ar, foi associada à redução da absorção da gema. E embora técnicas assépticas tenham sido empregadas, os autores afirmaram que a redução na absorção da gema durante a primeira semana ocorreu devido ao aumento da contaminação bacteriana embrionária.



Figura 35. Representação da inoculação de culturas, probióticos e prebióticos in ovo (PEDROSO, 2009).

Outrora, Teague et al. (2017) testaram uma cultura probiótica definida proveniente do conteúdo gastrointestinal de aves contendo várias cepas proprietárias de bactérias de ácido láctico (FloraMax®-B11), pela sua capacidade de aumentar a eficácia protetora de uma vacina HVT contra doença de Marek e *S. Enteritidis* em ovos de White Leghorn e frangos de corte. Verificou-se que, sem afetar a eclodibilidade, o probiótico reduziu os níveis de bactérias gram-negativas positivas para lactose e a incidência de infecção de *S. Enteritidis*.

4.3. Nutrição in ovo

A tecnologia de inoculação de nutrientes in ovo, ou “nutrição in ovo”, ou mesmo “alimentação in ovo”, deriva da tradução da terminologia em inglês “in egg feeding” ou “in ovo feeding”, e é considerada uma prática recente na ciência e na indústria avícola (RUFINO, 2018).

Esta tecnologia de suplementação de nutrientes, com patente registrada nos EUA (registro nº 6.592.878) em nome de Uni e Ferket (2003), consiste na administração de nutrientes exógenos através do líquido amniótico ou da cavidade alantoide (Figura 36) para galináceos ou perus com idade de incubação aproximada entre 17 e 23 dias, respectivamente (FOYE et al., 2006), com a finalidade de aumentar o estado nutricional ou disponibilizar nutrientes ao embrião, objetivando maior eficiência digestiva; redução da mortalidade e da morbidez pós-eclosão, além de melhor desenvolvimento do sistema imunológico (UNI & FERKET, 2004; LEITÃO et al., 2005).

Uni e Ferket (2004) afirmaram ainda que a mortalidade dos embriões durante o período crítico pós-nascimento, quando eles estão tendo que se ajustar a novos ambientes e fontes de nutrientes, pode ser aliviada pela administração in ovo de nutrientes quando estes encontram-se no estágio final de desenvolvimento embrionário. Porém, o uso de alguns desses vários nutrientes necessita ter sua eficácia comprovada para que haja uma ampla aplicação pela indústria avícola.

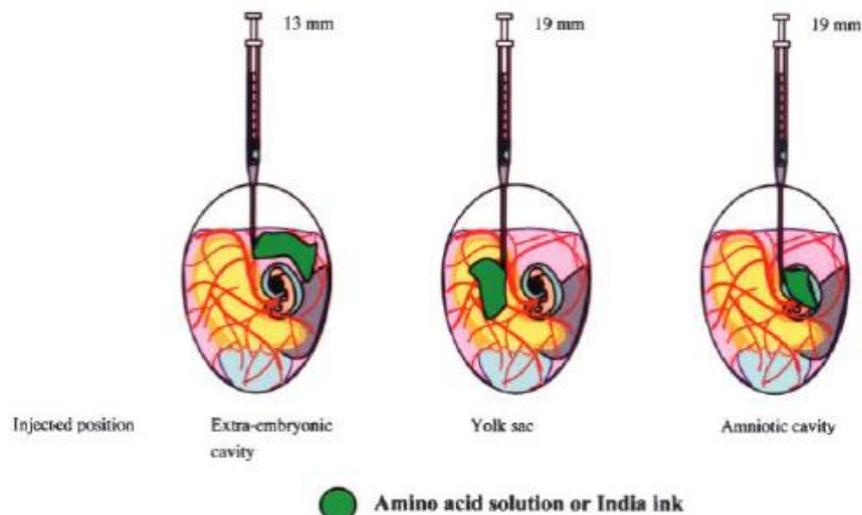


Figura 36. Representação gráfica do procedimento de inoculação in ovo utilizando variações na metodologia de aplicação (OHTA & KIDD, 2001).

Todavia, estas respostas positivas não só dependem da composição da solução, mas também do volume e osmolaridade da solução injetada no âmnio (FERKET et al, 2005). Em altas concentrações, a solução nutritiva pode causar um desequilíbrio osmótico resultando no óbito do embrião (DAMASCENO et al., 2017) em fase intermediária (pintos e/ou embriões mortos entre 16 e 18 dias de incubação), tardia (pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, sem bicagem da casca do ovo) ou pós-bicagem (pintos e/ou embriões mortos entre 19 e 21 dias de incubação, após a inoculação, com bicagem da casca do ovo) (Figura 37).



Figura 37. Escalas da mortalidade embrionária: a) embrião morto em período intermediário; b) embrião morto em período tardio; e c) embrião morto pós-bicagem da casca do ovo.

A disponibilização destas substâncias como suplementos nutricionais na fase de pré-incubação visa melhorar o desenvolvimento inicial do trato digestivo, a fim de impulsionar as enzimas digestivas e um maior crescimento das vilosidades intestinais (GEYRA et al., 2001). Além disso, o acesso rápido do pintainho aos alimentos pode auxiliar na melhora do seu desempenho, do desenvolvimento intestinal e, conseqüentemente, do crescimento de outros órgãos do corpo (LEITÃO et al., 2005).

Durante o período de incubação e nas primeiras horas após a eclosão, as aves possuem limitadas funções digestivas, o que, conseqüentemente, reduz a disponibilidade de nutrientes para o seu metabolismo de crescimento, e restringe sua capacidade digestiva, que começa a se desenvolver quando o líquido amniótico é consumido por via oral à 17 dias de incubação (UNI et al., 2005).

Do 15º ao 19º dia de incubação o líquido amniótico é totalmente consumido oralmente e, conseqüentemente, as substâncias presentes também são ingeridas, criando a possibilidade de ingestão de nutrientes exógenos antes do nascimento (UNI, 2003; CAMPOS et al., 2010). Além disso, tem-se demonstrado que o embrião possui enzimas digestivas (SKLAN et al., 2003) que tornam possível a nutrição na fase pré-eclosão. Assim, o embrião pode consumir naturalmente nutrientes pela via oral antes de nascer (FERKET & UNI, 2006).

Já se comprovou que os embriões avícolas apresentam em suas reservas fisiológicas uma quantidade limitada de nutrientes disponíveis para seu desenvolvimento. E o fornecimento de nutrientes exógenos intra ovo durante o desenvolvimento embrionário pode funcionar como uma fonte extra de nutrientes para esse desenvolvimento, resultando em um maior peso ao nascimento, maior viabilidade, maior vigor, entre outros. Para tanto, é necessário definir quais nutrientes utilizar, o período e local da administração, a forma de fazer esta administração entre outros fatores (RUFINO, 2018).

De acordo com Kidd (2004), as pesquisas com alimentação in ovo precisam ser desenvolvidas com o objetivo de avaliar o seu impacto sobre o crescimento do pintainho, buscando sempre um aumento da viabilidade econômica. Para isso, é necessária a disponibilidade dessa tecnologia de forma prática para as empresas em uma base comercial. Atualmente, a alimentação in ovo já é uma realidade em centros de incubação de alguns países como Estados Unidos, Japão, França, Holanda e outros, sendo utilizada principalmente para a

vacinação de embriões no ovo (JOICHEMSEN & JEURISSEN, 2002), e mais recentemente, para disponibilização de nutrientes exógenos in ovo.

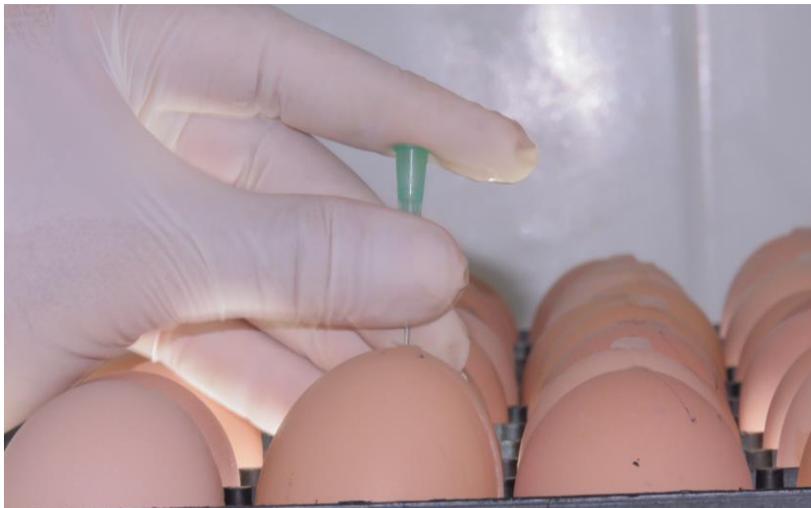


Figura 38. Perfuração da casca do ovo com agulhas de 7 x 2,5 mm para inoculação das soluções.



Figura 39. Inoculação de soluções nutritivas no processo de alimentação in ovo.



Figura 40. Ovos com os orifícios vedados com parafina fundida pós-inoculação.

Os pesquisadores afirmam que, dependendo de fatores como a fase de desenvolvimento do embrião e a composição da solução, pode ser determinado o volume ideal a ser aplicada em diferentes locais de ovo, em diferentes concentrações, em diferentes osmolaridades e outros parâmetros. No entanto, a falta de informação sobre os efeitos da inoculação de diversas substâncias sobre a fisiologia do embrião, continua impedindo o pleno desenvolvimento de tecnologias voltadas para a industrialização do processo de inoculação (GEYRA et al., 2001; JOCHEMSEN e JEURISSEN, 2002; LEITÃO et al., 2014).

4.4. Principais nutrientes utilizados na alimentação in ovo

Ainda que o ovo seja considerado completo em termos nutricionais, os percentuais de aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e lipídeos, são suficientes no terço inicial da incubação, estando aquém dos níveis desejáveis no terço final e durante a eclosão (GONÇALVES et al., 2013). Conforme Abed et al. (2011), o acesso imediato ao alimento logo após a eclosão, asseguram um ótimo desempenho de frangos de corte na idade de abate, visto que estas aves não possuem potencial compensatório para crescimento retardado devido a um longo período de privação nutricional durante o período neonatal. Contudo, o acesso a nutrientes poderá ocorrer já na fase embrionária, antecipando este período de privação.

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

Neste contexto, pouco se sabe também acerca dos tipos de nutrientes que podem ser utilizados na nutrição do embrião. Muitas vezes, são omitidos os níveis e a composição dos nutrientes inoculados in ovo (UNI, 2003). Uma linha que pode nortear a busca de nutrientes a serem utilizados é o estudo específico da composição e suplementação do saco vitelino. O saco vitelino, naturalmente, é a fonte primária de nutrição do pinto (BURNHAM et al., 2001) e contém, aproximadamente, 51,7% de PB, 32,6% de EE, 4,8% de cinzas e pequena quantidade de carboidratos (VIEIRA & MORAN, 1998). E embora os aminoácidos presentes na gema possam ser suficientes durante o processo de eclosão, após o nascimento, as reservas do saco vitelino da ave são insuficientes para o processo de crescimento (OHTA et al., 2004).

Os carboidratos estão sendo amplamente testados na nutrição embrionária, por serem componentes importantes do ovo e de grande importância para a fase final do desenvolvimento embrionário (UNI et al., 2005). Esses são utilizados como fonte para produção de glicose, que é crucial para o desenvolvimento embrionário (MORAN, 1985), além de elevar as atividades das enzimas produzidas no intestino aumentando a capacidade de digestão e absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, o desempenho do animal. Entre os carboidratos mais utilizados estão a glicose, sacarose, maltose e dextrina.

Pesquisas com a utilização de aminoácidos na alimentação in ovo são escassas na literatura. Entretanto, alguns ensaios e trabalhos de pesquisa já realizados verificaram que os aminoácidos podem ser administrados tanto sozinhos como conjuntamente em soluções, com destaque para a glutamina e a β -hidroxi-metil-butirato (metabólico da leucina), podendo ainda ser utilizada a arginina. O objetivo principal de se fornecer estes aminoácidos seria o papel importante desses no metabolismo da proteína muscular e sua relação positiva com a síntese protéica e com o hormônio do crescimento (glutamina) (OHTA et al., 1999; CAMPOS et al., 2010).

Nestes trabalhos, a utilização de aminoácidos já se mostrou viável para uso na alimentação in ovo (OHTA et al., 1999), proporcionando melhora no peso ao nascer do pintainho por meio do aumento no conteúdo de aminoácidos do embrião (OHTA et al., 2001) e da gema para consumo pelo mesmo (AL-MURRANI, 1982).

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

Já as deficiências de minerais específicos também podem ser rapidamente induzidas em embriões em desenvolvimento quando as reprodutoras recebem quantidades insuficientes destes, levando a reduzido crescimento, desenvolvimento anormal de todos os órgãos e em casos extremos à morte do embrião (SAVAGE, 1968).

Referências

ABDEL-SALAM, Z.A.; ABDU, A.M.; HARITH, M.A. Elemental and ultrastructural analysis of the eggshell: Ca, Mg and Na distribution during embryonic development via LIBS and SEM techniques. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.35-42, 2006.

ABED, F.; KARIMI, A.; SADEGHI, G.; SHIVAZAD, M.; DASHTI, S.; SADEGHI-SEFIDMAZGI, A. Do broiler chicks possess enough growth potential to compensate long-term feed and water deprivation during the neonatal period?. **South African Journal of Animal Science**, v. 41, p. 33-39, 2011.

ACKERMAN, R.A.; RAHN, H. In vivo O₂ and water vapor permeability of the hen's eggshell during early development. **Respiration Physiology**, v.45, p.1-8, 1981.

AGRISTATS. **Definitions and calculations agristats**, Inc., 5401 Keystone Dr. Suite 218, fort wayne INC 46825, 1993.

AGRISTATS. **Live production /1998 annual agristats report**. Agristats, INC, 5401 Keystone Dr. Suite 218 fort wayne INC 46825 Feb, 1999.

AKIBA, Y.; MURAKAMI, H. **Partitioning of energy and protein during early growth of broiler chicks and contribution of vitelline residue**. In: Proceedings of the World Poultry Science Conference; Antalya, Turkey, p. 42-52, 1995.

ALBINO, L.F.T. **Criação de Frango e Galinha Caipira: Avicultura Alternativa**. 2ª ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, p. 94-109, 2005.

ALDA, T.R.B.L. **Causa de mortalidade embrionária e deformidades do embrião**. In: Manejo da Incubação. Campinas: Facta, p. 169-176, 1994.

ALLEN, T.E.; GRIGG, G.W. Sperm transport in the fowl. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 788-789, 1957.

ALMEIDA, J.G. **Efeito do intervalo do tempo entre o nascimento e o alojamento no desempenho, característica de carcaça e viscerais de frangos de corte provenientes de matrizes de diferentes idades.** Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2002.

AL-MURRANI, W.K. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 23, n. 2, p. 171-174, 1982.

ANKNEY, C. D.; DENNIS, D. G.; WISHARD, L. N.; SEEB, J. E. Low genetic variation between black ducks and mallards. **Auk**, v. 103, p. 701–709, 1986.

ANTUNES, R.; ÁVILA, V. S. Do Incubatório à Granja. **Revista Avicultura Industrial**, n. 09, ed. 1131, p. 34-37, 2005.

AR, A.; PAGANELLI, C.V.; REEVES, R.B., GREENE, D.G.; RAHN, H. The avian egg: water vapor conductance, shell thickness, and functional pore area. **The Condor**, v. 76, n. 2, p. 153-158, 1974.

AR, A. Egg water movements during incubation. In: TULLET, S.G. (ed). **Avian Incubation**. Buterworth-Heinemann: London, p. 157-173, 1991.

ARAÚJO, W.A.G.; ALEBRANTE, L.; CASTRO, A.D. Fatores capazes de afetar os índices de eclosão. **Revista Eletrônica NUTRITIME**, v. 6, n. 5, p. 1072-1087, 2009.

ARORA, K.L.; KOSIN, I.L. Developmental responses of early turkey and chicken embryos to pre-incubation holding of eggs: inter and intra-species differences. **Poultry Science**, v. 45, n. 5, p. 958-970, 1966.

AUBERT, A.E.; BECKERS, F.; RAMAEKERS, D.; VERHEYDEN, B.; LERIBAU, C.; AERTS, J.M.; BERCKMANS, D. Heart rate and heart variability in chicken

embryos at the end of incubation. **Experimental Physiology**, v. 89, n. 2, p. 199-208, 2004.

AVAKIAN, A.; WAKENELL, P.S.; BRYAN, T.; SCHAEFFER, J.L.; WILLIAMS, C.J.; WHITFILL, C.E. **In ovo administration of Marek's disease vaccine: Importance of vaccine deposition site in the fertile egg**. Proc. 51st Western Poultry Disease Conf., Puerto Vallarta, Mexico. Veterinary Software Publishing Inc., O'Fallon, Illinois, USA, 2002.

AVAKIAN, A.P. Understanding in ovo vaccination. **International Hatchery Practice**, v. 20, p. 15-17, 2006..

BAHR, J.M.; JOHNSON, P.A. Reproduction in poultry. In: CUPPS, P.T. (Ed.). **Reproduction in domestic animals**. 3rd ed. New York: Academic Press, p. 555-575, 1991.

BAIÃO, N.C.; CANÇADO, S.V. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 21, p. 1-82, 1997.

BAIÃO, N.C.; CANÇADO, S.V. Efeito do intervalo entre nascimento e o alojamento de pintos sobre o desempenho dos frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, p. 191-194, 1998.

BAKST, M.R. Preservation of avian cells. In: CRAWFORD, R.D. (Ed.). **Poultry Breeding and Genetics**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 91-108, 1990.

BAKST, M.R.; WISAHRT, G.; BRILLARD, J.P. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. **Poultry Science**, v. 5, p. 117-143, 1994.

BAKST, M.R.; BAHR, J.M. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6ª ed. São Paulo: Manole, p. 390-407, 1995.

BARBOSA, V.M.; CANÇADO, S.V.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C.; SANTOS, G.C.; LANA, A.M.Q. **Influência da umidade na incubação e idade da matriz leve**

sobre a eclosão e parâmetros de ovos e pintos. In: Suplemento da Revista Brasileira de Ciência Avícola. Campinas: FACTA, v. 7, p. 13, 2005.

BARBOSA, V.M.; CANÇADO, S.V.; BAIÃO, N.C.; LANA, A.M.Q.; LARA, L.J.C.; SOUZA, M.R. Efeitos da umidade relativa do ar na incubadora e da idade da matriz leve sobre o rendimento da incubação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 741-748, 2008.

BARBOSA, V.M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário.** Belo Horizonte: FEP MVZ, 2011. 124p.

BARBOSA, V.M.; ROCHA, J.R.S.; POMPEU, M.A.; FERNANDES, M.N.S.; MACHADO, A.C.; CUNHA, C.E.; CARDEAL, P.C.; RUIZ, L.E.A.; LARA, L.C.; BAIÃO, N.C. Efeitos do horário de postura de matrizes pesadas sobre o rendimento de incubação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1261-1264, 2013.

BARRETO, S.L.T.; FERREIRA, W.M.; GONÇALVES, T.M. Níveis de proteína e de vitamina E para matrizes de frango de corte. 1. Efeito sobre o desempenho das matrizes, composição do ovo e desempenho da progênie. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, P. 183-192, 1999.

BARROT, H.G. **Effect of temperature, humidity and other factors on hatch of hens' eggs and on energy metabolism of chick embryos.** USDA Technical Bulletin 553, 1937. 46p.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development.** 2^a ed. San Diego: Editora Elsevier Academic Press, 2005. 470p.

BERNARDINO, A. Vacinação a nível de Incubatório. In: **Manejo da Incubação.** Campinas: Facta, p. 149- 154, 1994.

BLACKBURN, H.D. Development of national animal genetic resource programs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 27-32, 2004.

BLACKBURN, H.D. The national animal germplasm program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. **Poultry Science**, v. 85, p. 210-215, 2006.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; SEIGNEURIN, F. Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. **Reproduction**, v. 129, p. 371-378, 2005.

BLESBOIS, E. Current status in avian semen cryopreservation. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, p. 213-222, 2007.

BOERJAN, M.L. Incubação em estágio único para melhorar a uniformidade. In.: Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos. São Paulo, Brasil, p. 325-333, 2006.

BORZEMSKA, W.A.; MALEC, H.; NIEDZIOALKA, J.; LIX, M.; PIJARSKA, I. Evaluation of hen hatch in incubators with different synchronization of incubation time. **Roczniki Naukowe Zootechniki**, v. 25, p. 223-229, 1998.

BRILLARD, J.P.; BAKST, M.R. Qualification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 271-275, 1990.

BRILLARD, J.P. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. **Poultry Science**, v. 72, p. 923-928, 1993.

BRILLARD, J.P. **Biotechnologies of reproduction in poultry: dreams and reality**. In: Proceedings of WPSA Scientific Day, Pretoria, South Africa, 2006.

BRITO, A.B. **Problemas microbiológicos na incubação artificial**, 2006. Disponível em: <www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_agosto_06>. Acesso em: 20 de março de 2018.

BUHR, R.J. Incubation relative humidity effects on allantoic fluid volume and hatchability. **Poultry Science**, v. 74, p. 874-884, 1995.

BURNHAM, M.R.; PEEBLES, E.D.; GARDNER, C.W.; BRAKE, J.; BRUZUAL, J.J.; GERARD, P.D. Effects of incubation humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. **Poultry Science**, v. 80, p. 1444-1450, 2001.

BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. The Collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**, v. 16, p. 19-24, 1937.

BURROWS, W.H.; QUINN, J.P. **Artificial insemination of chickens and turkeys**. U.S. Dept. Agr. Cir. 525, p. 1-12, 1939.

CAETANO, A.R.; JOHNSON, R.K.; FORD, J.J.; POMP, D. Microarray profiling for differential gene expression in ovaries and ovarian follicles of pigs selected for increased ovulation rate. **Genetics**, v. 168, p. 1529-1537, 2004.

CALIL, T.A.C. **Princípios básicos de incubação**. In: Simpósio sobre incubação da Conferência APINCO, Santos, São Paulo, Brasil, 2007.

CAMPOS, J.E. **Avicultura razões, fatos e divergências - Incubação Industrial**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, p. 203-303, 2000.

CAMPOS, A.M.A.; GOMES, P.C.; ROSTAGNO, H.S. Nutrição in ovo de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 7, n. 4, p. 1304-1313, 2010.

CAMPOS, A.M.A.; ROSTAGNO, H.S.; GOMES, P.C.; SILVA, E.A.; ALBINO, L.F.T.; NOGUEIRA, E.T. Efeito de inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e no desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1712-1717, 2011.

CANÇADO, S.V.; BAIÃO, N.C. Efeitos do período de jejum entre o nascimento e o alojamento de pintos de corte e da adição de óleo à ração sobre o

desenvolvimento do trato gastrointestinal e concentração de lipase. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 623-629, 2002.

CARDOZO, J.P.; NAKAGE, E.S.; PEREIRA, G.T.; BOLELI, I.C. **Efeito da idade da matriz e peso dos ovos, sobre os componentes do ovo em frangos de corte**. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, Campinas, São Paulo, Brasil, p. 16, 2002.

CASANOVAS, P. **Aspectos gerais do manejo para melhorar a fertilidade dos machos**. In: Anais da Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, São Paulo, Brasil, p. 41-62, 2004.

CASTRO, A. L. **Higiene e controle de qualidade no Incubatório. Manejo da Incubação**. Campinas: FACTA, p. 155-168, 1994.

CEROLINI, S.; KELSO, K.A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K.; PIZZI, F.; CAVALCHINI, L.G. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chicken. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p. 976-980, 1997.

CHALAH, T.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E.; BRILLARD, J.P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology**, v. 39, p. 185-191, 1999.

CIROTTA, C.; ARANGI, I. How do avian embryos breath? Oxygen transport in the blood of early chick embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 607-613, 1989.

CLULOW, J.; JONES, R.C. Studies of fluid and spermatozoa transport in the extratesticular genital ducts of the Japanese quail. **Journal of Anatomy**, v. 157, p. 1-11, 1988.

CHRISTENSEN, V.L.; WINELAND, M.J.; FASENKO, G.M.; DONALDSON, W.E. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, n. 12, p. 1729-1735, 2001.

CHRISTENSEN, V.L.; WINELAND, M.J.; FASENKO, G.M.; DONALDSON, W.E. Egg storage alters weight of supply and demand organs of broiler chicken embryos. **Poultry Science**, v. 81, n. 11, p.1738-1743, 2002.

COBB VANTRESS. **Guia de Manejo de Incubação**, 2008. Disponível em: https://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Guia_incuba%C3%A7%C3%A3o_Cobb.pdf. Acesso em: 03 de abril de 2018.

CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

COLVILLE, T.; BASSERT, J.M. **Anatomia e Fisiologia Clínica para Medicina Veterinária**. 2ª Ed. São Paulo: Elsevier Editora Brasil, 2010. 543p.

COSTA, A.C. **Manual de embriologia**. Lisboa: Luso Espanhola, 1950. 318p

COX, N.A.; BAILEY, J.S.; BLANKENSHIP, L.C.; GILDERSLEEVE, R.P. In ovo administration of a competitive exclusion culture treatment to broiler embryos. **Poultry Science**, v. 71, p. 1781-1784, 1992.

CROSSLEY II, D.A.; BURGGREN, W.W.; ALTIMIRAS, J. Cardiovascular regulation during hypoxia in embryos of the domestic chicken *Gallus gallus*. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, p. R219-R226, 2003.

DALANEZI, J.A.; MENDES, A.A.; GARCIA, E.A.; GARCIA, R.G.; MOREIRA, J.; TAKITA, T.S.; ALMEIDA, I.C.L. Efeito da idade da matriz sobre o rendimento e qualidade da carne de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 24, n. 4, p. 685-690, 2004.

DANCHIN-BURGE, C.; HIEMSTRA, S.J. **Cryopreservation of domestic animal species in France and Netherlands: Experience, similarities and differences**. In: In ERFP, ed. Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe, Paris, França, p. 15-28, 2003.

DAMASCENO, J.L.; CRUZ, F.G.G.; MELO, R.D.; FEIJO, J.C.; RUFINO, J.P.F.; VALENTIM, F.M.; OLIVEIRA, J.P.C. Inoculação de proteína isolada de soja em ovos embrionados oriundos de matrizes semipesadas com diferentes idades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1259-1266, 2017.

DECUYPERE, K.; MICHELS, H. Incubation temperature as management tool: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 48, n. 1, p. 27-38, 1992.

DECUYPERE, K.; MALHEIROS, R.D.; MORAES, V.M.B.; et al. Fisiologia do embrião. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.). **Manejo da incubação**. 2ª ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, p. 65-94, 2003.

DEEMING, D.C. Characteristics of unturned eggs: critical period, retarded embryonic growth and poor albumen utilization. **British Poultry Science**, v. 30, p. 239-249, 1989.

DEEMING, D.C. Storage of hatching eggs. Arbor Acres Service Bulletin. **Indústria Avícola**, p. 14-22, 2000.

DIECKERT, J.W.; DIECKERT, M.C.; CREGER, C.R. Calcium reserve assembly: a basic structural unit of the calcium reserve system on the hen egg shell. **Poultry Science**, v. 68, p. 1569-1584, 1989.

DOHNER, J. V. **The encyclopaedia of historic and endangered livestock and poultry breeds**. New Haven: Yale Univ. Press, 2001.

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

DROR, Y.; NIR, I.; NITSAN, Z. The relative growth of internal organs in light and heavy breeds. **British Poultry Science**, v. 18, p. 493-496, 1977.

ELGUERA, M.A. **Relação entre o manejo de reprodutoras de carne e a qualidade dos ovos incubáveis**. In: Anais do 2º Simpósio Técnico sobre Matrizes de Frangos de Corte, Chapecó, Santa Catarina Brasil, p. 17-27, 1999.

ELLIOTT, K.E.C.; BRANTON, S.L.; EVANS, J.D.; GERARD, P.D.; PEEBLES, E.D. Layer chicken embryo survival to hatch when administered an in ovo vaccination of strain F Mycoplasma gallisepticum and locations of bacteria prevalence in the newly hatched chick. **Poultry Science**, v. 96, p. 3879-3884, 2017.

ETCHES, R.J. **Reproduction in poultry**. Wallingford: CAB International, 1996.

ETCHES, R.J. **Manipulating the avian genome**. In: Proceedings of International Congress on Bird Reproduction, INRA, Tours, France, p. 169-173, 1999.

EYAL-GILADI, H. The early embryonic of the chick, as an epigenetic process. **Critical Reviews in Poultry Biology**, v. 3, n. 3, p. 143-166, 1991.

FASENKO, G.M.; ROBINSON, F.E.; ARMSTRONG, J.G.; CHURCH, J.S.; HARDIN, R.T.; PETITTE, J.N. Variability in preincubation embryo development in domestic fowl: Effects of nest holding time and method of egg storage. **Poultry Science**, v. 70, n. 9, p. 1876-1881, 1991.

FASENKO, G.M. **Factors influencing embryos and poult viability and growth in stored turkey eggs**. Thesis (Ph.D. in Agricultural, Food and Nutritional Science), North Caroline State University, North Caroline, USA, 1996. 114p.

FASENKO, G.M.; ROBINSON, F.E.; CHRISTENSEN, V.L. How long-term hatching egg storage affects the egg, the embryo and the chick. In: DEEMING, D.C. **Practical aspects of commercial incubation in poultry**. Oxford: Ratite Conference Books, p. 33-39, 2002.

FERKET, P, DE OLIVEIRA, J., GHANE, A., UNI, Z. Effect of in ovo feeding solution osmolality on hatching turkeys. **Poultry Science**, v. 84, n. 1, p. 118, 2005.

FERKET, P., UNI, Z. **Early feeding - in ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry**. In: 12th Conference European Poultry, Verona, Italy, 2006.

FIUZA, M.A.; LARA, L.J.C.; AGUILAR, C.A.L.; RIBEIRO, B.R.C.; BAIÃO, N.C. Efeitos das condições ambientais no período entre a postura e o armazenamento de ovos de matrizes pesadas sobre o rendimento de incubação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 408-413, 2006.

FOYE, O.T.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-1192, 2006.

FRANCISCO, N.S. **Idade da matriz e tempo de estocagem dos ovos no desenvolvimento de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2011. 72p.

FRAPS, R.M. Twenty-four hour periodicity in the mechanism of pituitary gonadotropin release for follicular maturation and ovulation in the chicken. **Endocrinology**, v. 77, p. 5-18, 1965.

FREEMAN, B.M. The mobilization of hepatic glycogen in *Gallus domesticus* at the end of incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 28, p. 1169-1176, 1969.

FREITAS, E.B. MURAKAMI, V.Y.; RAINERI NETO, R.; FILADELPHO, A.L.; MONTANHA, F.P.; PEREIRA, R.E.P. Estudo anatomo-fisiológico do sistema reprodutivo feminino das aves na formação dos ovos - Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 17, ano IX, p. 1-12, 2011.

GARCIA, S.M.L.; FERNÁNDEZ, C.G. **Embriologia**. 2ª ed. São Paulo: Editora Artmed, 2001. 416p.

GEE, G. Avian artificial insemination and semen preservation. In: RISSER JR, A.C.; TODD, F.S. (Eds). **IFCB Symposium on Breeding Birds in Captivity**. International Foundation for the Conservation of Birds, Los Angeles, Califórnia, p. 375–398, 1983.

GEE, G.; SEXTON, T.J. Cryogenic preservation of semen from the Aleutian Canada Goose (*Branta canadensis leucopareia*). **Zoo Biology**, v. 9, p. 361-371, 1990.

GERACILDA, L.; FERREIRA, V.P.A. Fatores que afetam a qualidade dos pintos de um dia, desde a incubação até recebimento na granja. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 16, ano IX, p. 1-19, 2011.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 776-782, 2001.

GIBBS, C.S. **A guide to Sexing Chicks**. New York: Orange Judd Publishing Company, Inc., 1944.

GILL, S.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; AMANN, R.P. **Poultry artificial insemination: Procedures, current status and future needs**. In: Proceedings of Annual Meeting of Society for Theriogenology, Nashville, Tennessee, USA, p. 353-362, 1999.

GHANY, M.; KHEIR-ELDIN, M.; RIZK, W. The Native Egyptian Hatchery: Structure and Operation. **World's Poultry Science Journal**, v. 23, n. 4, p. 336-345, 1967.

GONÇALVES, F.M.; CORRÊA, M.N.; ANCIUTTI, M.A.; GENTILLI, F.P.; ZANUSSO, J.T.; RUTZ, F. Nutrigenômica: situação e perspectivas na alimentação animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 104 (569-572), p. 5-11, 2009.

GONÇALVES, F.M.; SANTOS, V.L.; CONTREIRA, C.L.; FARINA, G.; KREUZ, B.S.; GENTILINI, F.P.; ANCIUTI, M.A.; RUTZ, F. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, 45-55, 2013.

GONZALES, E. **Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico**. In: Anais do ZOOTEC, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 2005. 30p.

GONZALES, E.; CESARIO, M.D. **Desenvolvimento embrionário**. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.). **Manejo de incubação**. 2ª ed. Campinas: FACTA, p. 51-64, 2003.

GUSTIN, P. C. Cuidados com o pinto na expedição, transporte e alojamento. In: **Manejo da Incubação**. Campinas: FACTA, p. 109-147, 1994.

HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H. A series of embryonic chicken growth. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HAQUE, M.A.; PEARSON, J.T.; HOU, P.C.L.; TAZAWA, H. Effects of pre-incubation egg storage on embryonic functions and growth. **Physiology**, v. 103, p. 89-98, 1996.

HEDIGER, H. **Environmental factors influencing the reproduction of zoo animals**. In: BEACH, F.A. (Ed.). Sex and Behavior. New York: John Wiley and Sons, p. 319-354, 1965.

HESS, R.A.; THURSTON, R.J.; BIELLIER, H.V. Morphology of the epididymal region and ductus deferents of the turkey. **Journal of Anatomy**, v. 122, p. 241-252, 1976.

HIEMSTRA, S.J. (ed.). Guidelines for the Constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals. Lelystad/Netherlands: European Regional Focal Point/FAO, 2003. 55p.

HOCKING, P.M.; BERNARD, R. Effect of dietary crude protein content and food intake on the production of semen in two lines of broiler breeder males. **British Poultry Science**, v. 38, n. 2, p. 199-202, 1997.

HOIBY, M.; AULIE, A.; BJONNES, P.O. Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 91-94, 1987.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: USP Editora, 1925. 160p.

ILIO, K.Y.; HESS, R.A. Structure and function of the ductuli efferents: a review. **Microscopy Research and Technique**, v. 29, p. 432-467, 1994.

JANSSENS, K.; VAN BRECHT, A.; ZERIHUN DESTA, T.; BOONEN, C.; BERCKMANS, D. Modelling the internal dynamics of energy and mass transfer in an imperfectly mixed ventilated airspace. **Indoor Air**, v. 13, p. 1-13, 2003.

JOICHEMSEN, P.; JEURISSEN, S.H.M. The location and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. **Poultry Science**, v. 81, p. 1811-1817, 2002.

JOHNSON, A.L.; VAN TIENHOVEN, A. Plasma concentrations of six steroids and LH during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 386-393, 1980.

JOHNSON, A.L. Steroidogenesis and actions of steroids in the hen ovary. **CRC Critical Reviews in Poultry Biology**, v. 2, n. 4, p. 319-346, 1990.

JOHNSON, A.L. Regulation of follicle differentiation by gonadotropins and growth factors. **Poultry Science**, v. 72, n. 5, p. 867-873, 1993.

JONES, C.B. Egg hygiene: microbial contamination, significance and control. In: TULLET, S.G. **Avian incubation**. London: Butterworth-heinemann, p. 269-276, 1991.

JONES, R. **Manejo de Ovos Incubáveis**. In: International Poultry Consultants IPC Inc. Clínica de incubação. Brasília: Asa Alimentos Ltda., 1996. p.1-5.

KALTOFEN, R.S.; UBBELS, P. On the turning of eggs in artificial incubation. **Animal Breeding Abstracts**, v. 22(1175), n. 253, 1954.

KALTOFEN, R.S. Het bruederij—onderzoek te Beekbergen. **Landbouwvoorlichting**, v. 13, p. 544-550, 1956.

KERALAPURATH, M.M.; CORZO, A.; PULIKANTI, R.; ZHAI, W.; PEEBLES, E.D. Effects of in ovo injection of L-carnitine on hatchability and subsequent broiler performance and slaughter yield. **Poultry Science**, v. 89, n. 7, p. 1497-1501, 2010a.

KERALAPURATH, M.M.; KEIRS, R.W.; CORZO, A.; BENNETT, L.W.; PULIKANTI, R.; PEEBLES, E.D. Effects of in ovo injection of L-carnitine on

subsequent broiler chick tissue nutrient profiles. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 335-341, 2010b.

KIDD, M.T. Nutritional modulation of immune function in broilers. **Poultry Science**, v. 83, n. 4, p. 650-657, 2004.

KNIGHT, P.C.; GLADWELL, R.T.; CUNNINGHAM, F.J. Release of LHRH in vitro and anterior pituitary responsiveness to LHRH in vivo during sexual maturation in pullets (*Gallus domesticus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 145-151, 1985.

KÜHN, E.R.; DECUYPERE, E.; COLEN, L.M.; MICHELS, H. Post-hatch growth and development of a circadian rhythm for thyroid hormones in chicks incubated at different temperatures. **Poultry Science**, v. 61, n. 3, p. 540-549, 1982.

KUSSMANN, M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 4, p. 758-787, 2006.

LA CRUZ, M.V.; ARMAS, S.M.; CASTELLÁNOS, L.M. **Development of the chick heart**. Baltimore and London: Johns Hopkins University Press, 1972. 82p.

LAKE, P.E. **The male in reproduction**. In: **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. London: Academic, p. 1411-1447, 1971.

LAKE, P.E. The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. **Poultry Science**, v. 65, n. 1, p. 1-15, 1986.

LANCASTER, F.M.; JONES, D.R. Cooling of broiler hatching eggs during incubation. **British Poultry Science**, v. 29, n. 3, p. 597-604, 1988.

LATOUR, M.A.; PEEBLES, E.D.; DOYLE, S.M.; PANSKY, T.; SMITH, T.W.; BOYLE, C.R. Broiler breeder age and dietary fat influence the yolk fatty acid

profiles of fresh eggs and newly hatched chicks. **Poultry Science**, v. 77, n. 1, p. 47-53, 1998.

LAUVERS, G.; FERREIRA, V.P.A. Fatores que afetam a qualidade dos pintos de um dia, desde a incubação até recebimento na granja. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 16, ano IX, p. 1-19, 2011.

LAVOR, C.T.B.; CÂMARA, S.R. Biotecnologia do sêmen e inseminação artificial em aves. **Ciência Animal Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 66-81, 2012.

LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; PEDROSO, A.A.; STRINGHINI, J.H.; OLIVEIRA NETO, G.R.; CAFÉ, M.B. Efeito da suplementação de glicose in ovo sobre o desempenho inicial de pintos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. suppl., p. 69, 2005.

LEITÃO, R.A.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; MATOS, M.S.; ANDRADE, M.A. Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 55-63, 2014.

LIERZ, M.; GOOSS, O.; HAFEZ, H.M. Noninvasive heart rate measurement using a digital egg monitor in chicken and turkey embryos. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p.1 41-146, 2006.

LIJLA, C.; OLSSON, U. Changes in embryonic development associated with long-term selection for high growth rate in Japanese quail. **Growth**, v. 51, p. 301-308, 1987.

LILLIE, F.R. **Development of the chick**. 3rd ed. New York: Henry Holt, 1952. 624p.

LOURENS, A.; VAN DEN BRAND, H.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability and post-hatch development. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 914–920, 2005.

LUQUETTI, B.C.; GONZALES, E.; MACARI, M. Influência da idade da matriz sobre parâmetros sanguíneos cardíacos e pulmonares de pintos neonatos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 3, p. 13, 2001.

LUQUETTI, B.C.; BRUNO, L.D.G.; GIACHETTO, P.F.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E.; MACARI, M. Influência da idade da matriz sobre características da casca e parâmetros sanguíneos e cardíacos de pintos neonatos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 42, n. 1, p. 5, 2002

LUQUETTI, B.C.; GONZALEZ, E.; BRUNO, L.D.G.; FURLAN, R.L.; MACARI, M. Egg traits and physiological neonatal chick parameters from broiler breeder at different ages. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, p.13-17, 2004.

MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da Incubação**. Campinas: Editora FACTA, 2003. 537p.

MAIORKA, A. et al. Idade da matriz e qualidade do pintainho. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.). **Manejo de incubação**. 2ª ed. Campinas: FACTA, p. 361-377, 2003.

MAULDIN, J.M. Maintaining hatching egg quality. In: BELL, D.D.; WEAVER, W.D. **Commercial chicken meat and egg production**. 5th ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, p. 70-725, 2002.

MARTIN, S. A importância do embriodiagnóstico. **Ave World**, n. 5, p. 16-20, 2003.

MASSIP, A.; LEIBO, S.P; BLESBOIS, E. Cryobiology and the breeding of domestic animals. In: BENSON, E.; FULLER, B.; LANE, N. (ed.). **Life in the Frozen State**. London: Taylor and Francis Group, p. 371–392, 2004.

MATHER, M.C.; LAUGHIN, K.F. Storage of hatching eggs: the effect on total incubation period. **British Poultry Science**, v. 17, n. 5, p. 471-479, 1976.

MAY, K.N.; STADELMAN, W.J. Some factors affecting components of egg from adult hens. **Poultry Science**, v. 39, n. 3, p. 560-565, 1960.

McGRUDER, B.M.; ZHAI, W.; KERALAPURATH, M.M.; BENNETT, L.W.; GERARD, P.D.; PEEBLES, E.D. Effects of in ovo injection of electrolyte solutions on the pre- and post-hatch physiological characteristics of broilers. **Poultry Science**, v. 90, n. 5, p. 1058-1066, 2011a.

McGRUDER, B.M.; ZHAI, W.; KERALAPURATH, M.M.; GERARD, P.D.; PEEBLES, E.D. Effects of in ovo injection of stimulant solutions on growth and yolk utilization in broiler embryos. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 5, p. 338–343, 2011b.

McNAUGHTON, J.L.; DEATON, J.W.; REECE, F.N.; HAYNES, R.L. Effect of ages of parents and hatching eggs weight on broiler chick mortality. **Poultry Science**, v. 57, n. 1, p. 38-44, 1978.

MENNA, T.M.; MORTOLA, J.P. Metabolic control of pulmonary ventilation in the developing chick embryo. **Respiration, Physiology and Neurobiology**, v. 130, n. 1, p. 43-55, 2002.

MEIJERHOF, R.; NOORDHUIZEN, J.P.; LEENSTRA, F.R. Influence of pre-incubation treatment on hatching results of broiler breeder eggs produced at 37 and 59 weeks of age. **British Poultry Science**, v. 35, n. 2, p. 249-257, 1994.

MEIJERHOF, R.; HULET, R.M. In ovo injection of competitive exclusion culture in broiler hatching eggs. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 6, n. 3, p. 260-266, 1997.

MICHEL, G.; SCHWARZE, E. **Compêndio de anatomia veterinária. Tomo VI – Embriologia**. 1ª ed. Zaragoza: Acribia, 1970.

MORAN, E.T. Digestion and absorption in fowl and events through prenatal development. **The Journal of Nutrition**, v. 115, n. 5, p. 665–674, 1985.

MORAN Jr, E.T. Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1043-1049, 2007.

MOREIRA-NETO, J.J.S.; GONDIM, J.O.; RADDI, M.S.G.; PANSANI, C.A. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 9, p. 827-830, 2009.

MORITA, V.S.; BOLELI, I.C.; CARGNELUTTI FILHO, A. Hematological values and body, heart and liver weights of male and female broiler embryos of young and old breeder eggs. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 11, n. 1, p. 7-15, 2009.

MUAMBI, S.; DECUYPERE, E.; MICHELS, H. Influence de lá durée de conservation des oeufs sur la durée d'incubation, le taux d'éclosion et la croissance postnatale chez la race de volaille "Roche Island Red". **Revue Zairoise des Sciences Nucléaire**, v. 1, p. 65-83, 1980.

MURAKAMI, A.E.; GARCIA, E.R.M. **Importância da reprodução das aves no sistema produtivo brasileiro**. In: Anais do 16º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia, Goiás, Brasil, 2005.

MURAROLI, A.; MENDES, A.A. Manejo de incubação, transferência e nascimento do pinto. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.). **Manejo de incubação**. 2ª ed. Campinas: FACTA, p. 180-198, 2003.

MUTCH, D.M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 1602-1616, 2005.

NAKAGE, E.S. **Respostas fisiológicas de pintos submetidos a diferentes períodos de jejum: parâmetros hematológicos e intestinais**. Tese (Doutorado em Produção Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo, 2007. 100p.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v. 29, p. 1-10, 1975.

NEVES, A.C.R.S. **Maximização do Fluxo Operacional em Incubatório Comerciais**. In: VII Simpósio Goiano de Avicultura e II Simpósio Goiano de Suinocultura, Goiânia, Goiás, Brasil, 2005.

NIR, I.; LEVANON, M. Effect of post-hatch holding time on performance and on residual yolk and liver composition. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1994-1997, 1993.

NISTAN, Z.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Organ growth and digestive enzyme levels to fifteen days of age in lines of chickens differing in body weight. **Poultry Science**, v. 70, n. 10, p. 2040-2048, 1991.

NOBLE, R.C.; COCCHI, M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. **Progress in Lipid Research**, v. 29, n. 2, p.107-140, 1990.

NORTH, M.O. **Commercial chicken production manual**. 3rd ed. California: AVI Publishing Company, 1984. 710p.

NOY, Y.; PINCHASOV, Y. Effect of a single post-hatch incubations of nutrients of subsequent early performance of broiler chicks and turkey poults. **Poultry Science**, v. 72, p. 1861-1866, 1993.

NOY, Y.; SKLAN, D. Post-hatch development in poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 6, n. 24, p. 344-354, 1997.

NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk utilization in the newly hatched poult. **British Poultry Science**, v. 39, n. 3, p. 446-451, 1998.

NOY, Y.; SKLAN, D. Energy utilisation in newly hatched chicks. **Poultry Science**, v. 78, n. 12, p. 1750-1756, 1999.

OKUDA, A.; TAZAWA, H. Gas exchange and development of chicken embryos with widely altered shell conductance from the beginning of incubation. **Respiration Physiology**, v. 74, n. 2, p.187-198, 1988.

OHTA, Y.; TSUSHIMA, N.; KOIDE, K.; KIDD, M.T.; ISHIBASHI, T. Effects of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. **Poultry Science**, v. 78, n. 11, p. 1493-1498, 1999.

OHTA, Y.; KIDD, M.T. Optimum site for in ovo amino acid injection in broiler breeder eggs. **Poultry Science**, v. 80, n. 10, p. 1425–142, 2001.

OHTA, Y.; YOSHIDA, T.; TSUSHIMA, N. Comparison between broilers and layers for growth and protein use by embryos. **Poultry Science**, v. 83, n. 5, p. 783-787, 2004.

PATRÍCIO, I.S. Manejo do Ovo Incubável. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.). **Manejo de incubação**. 2ª ed. Campinas: FACTA, p. 75-93, 2003.

PATTEN, B.M. **Early embryology of the chick**. 4th ed. London: Lewis, 1951. 244p.

PEEBLES, E.D.; BURNHAM, M.R.; GARDNER, C.W.; BRAKE, J.; BRUZUAL, J.J.; GERARD, P.D. Effects of incubational humidity and hen age on embryo composition in broiler hatching eggs from young breeders. **Poultry Science**, v. 80, n. 9, p. 1299-1304, 2001.

PEEBLES, E.D. In ovo applications in poultry: A review. **Poultry Science**, v. 0, p. 1–17, 2018.

PEDROSO, A.A. Could in ovo probiotic be beneficial to chicks?. **The Poultry Informed Professional**, v. 109, p. 1-7, 2009.

PINCHASOV, Y. Relationship between the weight of hatching eggs and subsequent early performance of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 32, n. 1, p. 109-115, 1991.

PINCHASOV, Y.; NOY, Y. Effects of a single post-hatch incubation of nutrients on subsequent early performance of broiler chicks and turkey poults. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1861-1866, 1993.

PISENTI, J. M.; DELANY, M.E.; TAYLOR, R.L.; ABBOTT, U.K.; ABPLANALP, H.; ARTHUR, J.A.; BAKST, M.R.; BAXTER-JONES, C.; BITGOOF, J.J.; BRADLEY, F.A.; CHENG, K.M.; DIETERT, R.R.; DODGSON, J.B.; DONOGHE, A.M.; EMSLEY, A.B.; ETCHES, R.J.; FRAHM, R.R.; GERRITZ, R.J.; GOETINCK, P.F.; GRUNDER, A.A.; HARRY, D.E.; LAMONT, S.J.; MARTIN, G.R.; MCGUIRE, P.E.; MOBERG, G.P.; PIERRO, L.L.; QUALSET, C.O.; QURESHU, M.A.; SHULTZ, F.T.; WILSON, B.W. **Avian genetic resources at risk: An assessment and proposal for conservation of genetic stocks in the USA and Canada**. Report n. 20, University of California, Davis, California, USA, 1999. 120p.

POLGE, C. Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79 °C. **Nature**, v. 331, p. 70-72, 1951.

PROUDMAN, J.A. **Hormônios reprodutivos das aves**. In: Curso de Fisiologia da Reprodução de Aves da FACTA, Santos, São Paulo, Brasil, p. 30-42, 1993.

RAGHAVAN, V. Give day-old chicks the best start. **World Poultry**, v. 15, n. 1, p. 28-29, 1999.

RAHN, H.; AR, A. The avian egg: Incubation time and water loss. **The Condor**, v. 76, p. 147-152, 1974.

RAHN, H.; AR, A.; PAGANELLI, C.V. How Bird eggs breathe. **Scientific American**, v. 240, n. 2, p. 46-55, 1979.

RAHN, H.; MATALON, S.; SOTHERLAND, P. R. Circulatory changes and oxygen delivery in the chick embryo prior to hatching. In: **Cardiovascular Shunts. Phylogenetic, Ontogenetic and Clinical Aspects**. Copenhagen: Munksgaard, p. 199-215, 1985.

RALLS, K.; BALLOU, J. D. Preface to the proceedings of the workshop on genetic management of captive populations. **Zoo Biology**, v. 5, p. 81-86, 1986.

REECE, W.O. **Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 3^a ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. 468p.

RICCARDI, R.R.; MALHEIROS, E.B.; BOLELI, I.C. Efeito do jejum pós-eclosão sobre pintos de corte provenientes de ovos leves e pesados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

RICHARDS, M.P. Trance mineral metabolism in the avian embryo. **Poultry Science**, v. 76, n. 1, p. 152-164, 1997.

RICKS, C.A.; AVAKIAN, A.; BRYAN, T.; GILDERSLEEVE, R.; HADDAD, E.; ILICH, R.; KING, S.; MURRAY, L.; PHELPS, P.; POSTON, R.; WHITFILL, C.; WILLIAMS, C. In ovo vaccination technology. **Advances in Veterinary Medicine**, v. 41, p. 495-515, 1999.

RICKLEFS, R.E. Comparative analysis of avian embryonic growth. **The Journal of Experimental Zoology**, suplemento 1, p. 309-323, 1987.

ROBERTSON, I.S. The influence of turning on the hatchability of hens' eggs. I. The effect of rate of turning on hatchability. **The Journal of Agricultural Science**, v. 57, n. 1, p. 49-56, 1961.

ROBINSON, F.E.; WILSON, J.L.; YU, M.W.; FASENKO, G.M.; HARDIN, R.T. The relationship between body weight and reproductive efficiency in meat-type chickens. **Poultry Science**, v. 72, n. 5, p. 912-922, 1993.

ROCHA, J.S.R.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C.; CANÇADO, S.V.; BAIÃO, L.E.C.; SILVA, T.R. Efeito da classificação dos ovos sobre o rendimento de incubação e os pesos do pinto e do saco vitelino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 979-986, 2008.

ROCHA JUNIOR, J.M.; BAIÃO, N.C. Características físicas do sêmen de galos de matriz pesada com 35 e 68 semanas de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 683-685, 2001.

ROMANOFF, A.L.; ROMANOFF, A.J. **The avian egg**. New York: John Wiley and Sons, 1949. 918p.

ROMANOFF, A. L. **The avian embryo**. 1ª ed. New York: MacMillan Company, 1960. 1305p.

RONDÓN, E.O.O.; MURAKAMI, A.E. Fatores que interferem no desenvolvimento embrionário e seus efeitos nos problemas metabólicos pós-eclosão em frangos de corte. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 20, n. 3, p. 373-382, 1998.

ROSA, P.S.; ÁVILA, V.S. **Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frango de corte**. Comunicado Técnico EMBRAPA, n. 246, p. 1-3, 2000.

ROSENSTRAUCH, A.; EGEN, A.A.; FRIEDLÄNDER, M. Spermatozoa retention by Sertoli cells during the decline in fertility in aging roosters. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 1, p. 129-136, 1994.

RUFINO, J.P.F.; CRUZ, F.G.G.; MACHADO, N.J.B.; BRASIL, R.J.M.; PEREIRA, P.A.M.; FARIAS, E.G. Processos de incubação artificial associados à aplicação de diferentes métodos reprodutivos em matrizes semipesadas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, p. 765-773, 2014.

RUFINO, J.P.F. **Bioeficácia da inoculação de L-glutamina em ovos embrionados de matrizes avícolas.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, 2018. 55p.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; XAVIER, E.G.; ROLL, V.F.B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista de Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 307-317, 2007

SALES, M.N.G. **Criação de galinhas em sistemas agroecológicos.** Vitória: Incaper, 2005. 284p.

SANTANA, M.H.M.; GIVISIEZ, P.E.N.; FIGUEIREDO JUNIOR, J.P.; SANTOS, E.G. Incubação: principais parâmetros que interferem no desenvolvimento embrionário de aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 11, n. 2, p. 3387-3398, 2014.

SANTOS, G.C.F.; CAMPOS, E.J.; SILVA, P.L. **Efeito da linhagem e da idade de reprodutoras pesadas e leves sobre a perda de umidade dos ovos durante o período de incubação.** In: Conferência APINCO de Ciências e Tecnologias Avícolas, Campinas, São Paulo, Brasil, p. 21, 2005.

SANTOS, L.K.D.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; VIEIRA, R.C.; JACOMINI, J.O. Características do sêmen de galos Cobb 500 alojados em galpão semiclimatizado. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 89-95, 2006.

SATO, M.; TACHIBANA, T.; FURUSE, M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, n. 3, p.382-388, 2006.

SAUVEUR, B. Reproduction femelle formation d'ouef. In: SAUVEUR, B. **Reproduction des volailles et production d'oeufs.** Paris: INRA,1988. 357p.

SAVAGE, J.E. Trace minerals and avian reproduction. **Federation Proceedings**, v. 27, p. 927–931, 1968.

SBONG, S.; DZIALOWSKI, E. M. Respiratory and cardiovascular responses to acute hypoxia and hyperoxia in internally piped chicken embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, v. 148, p. 761-768, 2007.

SCALA JÚNIOR, N.L., Aspectos Físicos da Incubação. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds.). **Manejo da incubação**. 2ª ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, p. 98-124, 2003.

SCHEIDELER, S.E.; FRONING, G.W. The combined influence of dietary flaxseed variety, level, form, and storage conditions on egg production and composition among vitamin E-supplemented hens. **Poultry Science**, v. 75, n. 10, p. 1221-1226, 1994.

SCHMIDT, G.S.; FIGUEIREDO, E.A.P.; ÁVILA, V.S. Fatores que afetam a qualidade do pinto de corte. **Avicultura Industrial**, n. 9, ed. 1105, p. 14-18, 2002

SCHMIDT, G.S.; FIGUEIREDO, E.A.P.; ÁVILA, V.S. **Incubação: características dos ovos incubados**. Circular Técnica EMBRAPA, n. 35, 2003. 12p.

SESTI, L.A.C. Biosseguridade em granjas de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A.A. (Eds.). **Manejo de Matrizes de Corte**. Campinas: FACTA, p. 244-317, 2005.

SEXTON, T.J.; GEE, G. A comparative study on the cryogenic preservation of semen from the sandhill crane and the domestic fowl. In: WATSON, P.F. (Ed.). **Artificial insemination for breeding non-domestic birds**. London: Patuxent Wildlife Research Center, p. 89–95, 1978.

SEXTON T.J.; GIESEN, A.F. Beltsville poultry semen extender. 6. Holding turkey semen for six hours at 15 °C. **Poultry Science**, v. 61, n. 6, p. 1202-1208, 1982.

SHANAWANY, M.M. Hatching weight in relation to egg weight in domestic birds. **World's Poultry Science Journal**, v. 43, p. 107-115, 1987.

SHRADER, H.L.; BURROWS, W.H.; HAMMOND, J.C. **Sexing baby chicks**. Kansas City: International Baby Chick Association, 1935. 8p.

SILVA, E.N. **Biossegurança básica em incubação**. In: International Poultry Consultants IPC Inc. Clínica de incubação. Brasília: Asa Alimentos Ltda., p. 1-5, 1996.

SILVERSIDES, F.G.; SCOTT, T.A. Effect of storage and layer age on quality of egg from two lines of hens. **Poultry Science**, v. 80, n. 8, p. 1240-1245, 2001.

SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1986. 2000p.

SKLAN, D.; HEIFETZ, S.; HALEVY, O. Heavier chicks at hatch improves marketing body weight by enhancing skeletal muscle growth. **Poultry Science**, v. 82, n. 2, p.1778-1786, 2003.

SOKALE, A.O.; ZHAI, W.; POTE, L.; WILLIAMS, C.J.; PEEBLES, E.D. Effects of coccidiosis vaccination administered by in ovo injection on Ross 708 broiler performance through 14 days of posthatch age. **Poultry Science**, v. 96, n. 8, p. 2546-2551, 2017.

SOTHERLAND, P.R.; RAHN, H. On the composition of bird eggs. *The Condor*, v.89, p.48-65, 1987.

SPEAKE, B.K.; MURRAY, A.M.B.; NOBLE, R.C. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. **Progress in Lipid Research**, v. 37, n. 1, p. 1-32, 1998.

STAVELEY, B. E. **Developmental Biology**. Newfoundland, 2011. Disponível em: <www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_Ch02/DBNModel.html>. Acesso em: 06 de abril de 2018.

STONE, H.; MITCHELL, B.; BRUGH, M. In ovo vaccination of chicken embryos with experimental Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. **Avian Diseases**, v. 41, p. 856-863, 1997.

STURKIE, P.D.; OPEL, H. Reproduction in the male, fertilization and early embryonic development. In: STURKIE, P.D. (Ed.). **Avian physiology**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 1976.

SURAI, P.; WISHART, G.J. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. **World's Poultry Science Journal**, v. 52, n. 1, p. 27-43, 1996.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1996. 856p.

TAI, J. J.; SU, Y. M.; HUANG, H. H.; TERADA, T.; WATANABE, M. **Studies on the cryopreservation of drake semen. New strategies for improving animal production for human welfare**. In: Proceedings of the 5th World Conference on Animal Production, Tokyo, Japan, p. 183-184, 1983.

TAKAHASHI, T.; KAWASHIMA, M.; KAMIYOSHI, M.; TANAKA, K. Arginine vasotocin receptor binding in the hen uterus (shell gland) before and after oviposition. **European Journal of Endocrinology**, v. 130, p. 366-372, 1994.

TAZAWA, H.; MIKAMI, T.; YOSHIMOTO, C. Respiratory properties of chicken embryonic blood during development. **Respiration Physiology**, v. 13, p. 160-170, 1971.

TAZAWA, H.; TAKAMI, M.; KOBAYASHI, K.; HASEGAWA, J.; AR, A. Non-invasive determination of heart rate in newly hatched chicks. **British Poultry Science**, v. 33, n. 5, p. 1111-1118, 1992.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G.C. Incubation physiology. In: WHITTOW, G.C. (Ed.). **Sturkie's Avian Physiology**. 5th ed. Academic Press: Elsevier, p. 617-634, 2000.

TEAGUE, K.D.; GRAHAM, L.E.; DUNN, J. R.; CHANG, H.H.; ANTHONY, N.; LATORRE, J. D.; MENCONI, A.; WOLFENDEN, R. E.; WOLFENDEN, A.D.; MAHAFFEY, B.D.; BAXTER, M.; HERNANDEZ-VELASCO, X.; MERINO-GUZMAN, R.; BIELKE, L.R.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. In ovo evaluation of FloraMax R®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and Salmonella enteritidis infection in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 96, n. 7, p. 2074–2082, 2017.

TINGARI, M.D.; LAKE, P.E. Ultrastructural studies on the uterovaginal sperm host glands of the domestic hen, *Gallus domesticus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, n. 3, p. 423-431, 1973.

TIXIER-BOICHARD, M.; COQUERELLE, G.; DURAND-TARDIF, M.; PLANCHENAULT, D.; JAMILLOUX, V.; BLESBOIS, E.; BOULAY, M.; CHAPUIS, H.; REFFAY, M. Biodiversity of domestic birds. **British Poultry Science**. v. 42, p. 29-31, 2001.

TONA, K.; DECUYPERE, E.; COUCKE, W. Effects of strain, hen age and transferring eggs from turning to stationary trays after 15 to 18 days of incubation. **British Poultry Science**, v. 42, n. 5, p. 663-667, 2001.

TONA, K. **Effects of age of broiler breeders, incubation egg storage duration and turning duration during incubation on embryo physiology and broiler production parameters**. Tese (Doutorado), Faculteit Landbouwkundige en

Toegepaste Biologische Wetenschappen, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Bélgica, 2003.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.; DE KETELARE, B.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight, and chick posthatch growth to forty-two days. **Journal of Applied Poultry Research**, v.13, p, 10-18, 2004.

TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, Proteomics, Metabolomics and the Practice of Dietetics. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 106, p. 403-413, 2006.

TSELUTIN, K.; NARUBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v. 36, n. 5, 805–811, 1995.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation in fowl spermatozoa. **Poultry Science**, v. 78, n. 4, p. 586-590, 1999.

TUAN, R. S.; ONO, T. Regulation of extraembryonic calcium mobilization by the developing chick embryo. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 97, p. 63-74, 1986.

TULLETT, S.G.; DEEMING, D.C. The relationship between eggshell porosity and oxygen consumption of the embryo in domestic fowl. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 72, p. 529-533, 1982.

TULLETT, S.G. Science and the art of incubation. **Poultry Science**, v. 69, n. 1, p. 1-15, 1990.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, v. 77, n. 1, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Post-hatch development of small intestinal function in the poult. **Poultry Science**, v. 78, n. 2, p. 215-222, 1999.

UNI, Z. **Methods for early nutrition and their potential**. In: European Symposium of Poultry Nutrition: World Poultry Science Association; Lillehammer, Norway, p. 254-260, 2003.

UNI, Z.; FERKET, P.R. **Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding**. US Regular Patent US 6,592,878 B2. 2003. North Carolina State Univ., Raleigh and Yissum Res. Dev. Co., Hebrew Univ. Jerusalem, Israel.

UNI, Z., FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, n. 11, p. 101-111, 2004.

UNI, Z.; FERKET, R.P.; TAKO, E.; KEDAR, O. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, n. 5, p. 764-770, 2005.

VALLE, R. **Mortalidade de matrizes em produção**. In: Anais do 2º Simpósio Técnico sobre Matrizes de Frangos de Corte, Chapecó, Santa Catarina, Brasil, 1999. 15p.

VAN BRECHT, A.; AERTS, J.M.; DEGRAEVE, P.; BERCKMANS, D. Quantification and control of the spatiotemporal gradients of air speed and air temperature in an incubator. **Poultry Science**, v. 82, n. 11, p. 1677-1687, 2003.

VAN KREY, H.P. **Storage and transport of spermatozoa within the oviduct of the domestic fowl**. Davies: University of California, 1967.

VAN WANBEKE, E.F.; HUYGHEBAERT, G. Current role of semen storage and artificial insemination in the turkey industry. **British Poultry Science**, v. 30, n. 2, p. 461-469, 1989.

VIEIRA, S.L. Nutrição do embrião. **Ave World**, v. 18, n. 3, p. 66-71, 2005.

VIEIRA, S.L.; MORAN Jr, E.T. Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 2, p. 372-376, 1998.

VIEIRA, S.L.; POPHAL, S. Nutrição pós-eclosão de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 3, p. 189-199, 2000.

WAKENELL, P.S.; BRYAN, T.; SCHAEFFER, J.; AVAKIAN, A.; WILLIAMS, C.; WHITFILL, C. Effect of in ovo vaccine delivery route on herpesvirus of turkeys/SB-1 efficacy and viremia. **Avian Diseases**, v. 46, p. 274–280, 2002.

WANGENSTEEN, D.; WEIBEL, E. R. Morphometric evaluation of chorioallantoic oxygen transport in the chick embryo. **Respiration Physiology**, v. 47, p. 1-20, 1982.

WASHBURN, K.W. Incidence, causa and prevention of egg shell breakage in commercial production. **Poultry Science**, v. 61, n. 10, p. 2005-2012, 1982.

WATANABE, M.; MATSUMOTO, Y.; TAKESHITA, N.; TERADA T. Fertility of Muscovy semen frozen for about three years. **Journal of the Faculty of Applied Biological Science of Hiroshima University**, v. 20, p. 81-85, 1981.

WEBB, D.R. Thermal tolerance of avian embryos: a review. **The Condor**, v. 89, p. 874-898, 1987.

WILLIAMS, C.J. In ovo vaccination for disease prevention. **International Poultry Production**, v. 15, p. 7-9, 2007.

WILLIAMS, C.J.; ZEDEK, A.S. Comparative field evaluations of in ovo applied technology. **Poultry Science**, v. 89, n. 1, p. 189-193, 2010.

WILLIAMS, C.J. In ovo vaccination and chick quality. **International Hatchery Practice**, v. 19, p. 7-13, 2011.

WILLIAMS, C.J.; HOPKINS, B.A. Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available in ovo injection systems. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 223–226, 2011.

WILSON, H.R. Physiological requirements of the developing embryo: temperature and turning. In: TULLET, S.G. **Avian Incubation**. London: Butterworths, p. 145-156, 1991.

WHITTMANN, J.; KALTNER, H. Formation and changes of the subembrionic liquid from turned, unturned, and cultured Japanese quail eggs. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 10, p. 338-345, 1988.

WOELDERS, H.; ZUIDBERG, A.; HIEMSTRA, S.J. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. **Poultry Science**, v. 85, n. 2, p. 216-222, 2006.

YAMAUCHI, K.E.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structure of the intestinal villi and epithelial cells in white leghorn hens. **British Poultry Science**, v. 37, n. 5, p. 909-921, 1996.

YANNAKOPOULOS, A.L.; TSERVENI-GOUSHI, A.S. Research note: effect of breeder quail age and egg weight on chick weight. **Poultry Science**, v. 66, n. 9, p. 1558-1560, 1987.

ZAKARIA, A.H.; MIYAKI, T.; IMAI, K. The effect of aging on the ovarian follicular growth in laying hens. **Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 670–674, 1983.

ZHAI, W.; ROWE, D.E.; PEEBLES, E.D. Effects of commercial in ovo injection of carbohydrates on broiler embryogenesis. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1295-1301, 2011.