

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ZOOTÉCNICAS DE PINTOS
VACINADOS *IN OVO***

LARISSA KIANA SANTOS AZEVEDO MARTINS

**SALVADOR - BA
ABRIL - 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ZOOTÉCNICAS DE PINTOS
VACINADOS *IN OVO***

LARISSA KIANA SANTOS AZEVEDO MARTINS
Zootecnista

**SALVADOR - BA
ABRIL - 2017**

LARISSA KIANA SANTOS AZEVEDO MARTINS

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ZOOTÉCNICAS DE PINTOS
VACINADOS *IN OVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção de não ruminantes

Orientador: Profa. Dr. Vanessa Michalsky Barbosa
Co-orientador: Prof. Dr. Lia Barreto Fernandes

**SALVADOR - BA
ABRIL - 2017**

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E ZOOTÉCNICAS DE PINTOS VACINADOS IN OVO

Larissa Kiana Santos Azevedo Martins

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Salvador, 28 de abril de 2017

Comissão examinadora:



Dra. Vanessa Michalsky Barbosa
UFBA
Orientadora / Presidente



Dr. Luiz Vitor Oliveira Vidal
UFBA



Dra. Juliana Cantos Faveri
UFBA

*“E de repente, num dia qualquer
Acordamos e percebemos que já podemos
Lidar com aquilo que julgávamos maior que nós mesmos.
Não foram os abismos que diminuíram, mas nós que crescemos...”*

Fabiola Simões

*Dedico este trabalho a humanidade,
pois sem o conhecimento não seríamos nada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela simples oportunidade de poder viver.

A toda minha família, em especial aos meus pais e meu irmão, por estarem sempre me apoiando e incentivando, me dando todos os dias força para seguir sempre em frente.

À minha orientadora Professora Vanessa Michalsky, quero agradecer do fundo do meu coração por tudo que tem feito por mim. Felizmente está em minha vida desde a graduação e nesses 4 anos de convivência eu só tenho a agradecer pelo carinho, confiança, ajuda, amizade e por sempre ter acreditado e incentivado minha carreira desde que nossos caminhos se cruzaram. O tempo passou e conquistamos juntas o NUPIA que hoje sem dúvidas é minha segunda casa. Sou muito grata por fazer parte desse grupo e ver junto com todos vocês essa conquista. Você é uma professora como poucas, e só quem te conhece verdadeiramente sabe disso. Por isso, eu só tenho a agradecer por ter essa oportunidade de poder conviver e aprender com você cada vez mais.

Ao meu grupo de pesquisa NUPIA, que se tornou uma família para mim. Quero agradecer pelos momentos de felicidades e confiança que são conquistados todos os dias. Pela força em diversos momentos e ajuda para conduzir esse experimento, sem vocês nada disso estaria sendo realizado. Cada um de vocês: Tayana, Dayana, Taís, Vítor, Nayana, Izabela, Vanessa, vocês fazem parte dessa minha conquista. Muito obrigada por tudo. Também quero agradecer a todos os alunos da graduação/Pibics que participaram de alguma forma na realização deste experimento.

Aos membros da comissão examinadora pela enriquecedora colaboração neste trabalho.

Aos professores da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA por me ajudarem nos momentos de dificuldade, em especial ao Professor José Esler pela paciência e enriquecedora colaboração nas análises estatísticas.

Aos meus novos amigos Nezas e Sebastião que tive a honra de poder conhecer durante a realização do experimento. Obrigada pela gentileza, preocupação e troca de conhecimento durante os dias no incubatório.

À patrocinadora deste trabalho, empresa BIOCAMP por financiar todo o experimento e me dar à oportunidade de realização do mesmo.

À empresa Asa Branca e ao Danilo, pela disponibilidade da condução e realização do experimento dentro do incubatório e pela oportunidade de conhecer diversos setores da Avicultura. E ao Nezas, por todo ensinamento dentro do incubatório.

Agradeço também a todos os funcionários da Granja Asa Branca, por me recepcionar com muito carinho e preocupação. Obrigada a todos vocês pela ajuda e colaboração.

Às minhas amigas, Deicy Magalhães, Priscila Costa e Camila Pimentel por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus grandes amigos de graduação e pós-graduação: Carine, Sylvania Dourado, Isabela, Tatiana Cortez, Taiana Cortez, Jamile, Priscila.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (CAPES), pela concessão do Auxílio Financeiro e bolsa de estudos.

A todos que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1.	Regiões do ovo embrionado (Embrex) para aplicação da vacina <i>in ovo</i>	4
Figura 2.	Caracterização cronológica da morfofisiologia embrionária de aves.....	10
Figura 3.	Distribuição dos ovos incubáveis de acordo com os tratamentos.....	18
Figura 4.	Avaliação do peso específico de acordo com cada densidade.....	19
Figura 5.	Peso do ovo e seus componentes.....	20
Figura 6.	Medição da espessura da casca.....	21
Figura 7.	Distribuição das bandejas dentro da máquina incubadora.....	22
Figura 8.	Mensuração da temperatura da casca do ovo.....	23
Figura 9.	Teste de injeção da vacinadora <i>in ovo</i>	24
Figura 10.	Preparação da vacina.....	25
Figura 11.	Bolsa térmica contendo gelo para preservação da qualidade da vacina.....	25
Figura 12.	Processo de vacinação <i>in ovo</i>	26
Figura 13.	Transferência dos ovos vacinados das bandejas de incubação para a bandeja de eclosão.....	27
Figura 14.	Distribuição das bandejas dentro do nascedouro.....	28
Figura 15.	Análise do comprimento de pintinho.....	31
Figura 16.	Órgãos separados para pesagem individual.....	34
Gráfico 1	Dispersão de eclosão de acordo com os tempo de nascimento para tratamento controle.....	38
Gráfico 2	Dispersão de eclosão de acordo com os tempo de nascimento para tratamento vacina <i>in ovo</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição, peso específico dos ovos e espessura da casca de matrizes de corte com 35 semanas de idade, utilizados em ambos os tratamentos do experimento.....	35
Tabela 2.	Parâmetros do rendimento de incubação de ovos submetidos ou não ao processo de vacinação <i>in ovo</i>	36
Tabela 3.	Parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos não vacinados ou vacinados <i>in ovo</i>	40
Tabela 4.	Peso de órgãos em valores absolutos (g) e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino (%) de recém-eclodidos que foram submetidos ou não à vacinação <i>in ovo</i>	41
Tabela 5.	Parâmetros sanguíneos de pintos recém-eclodidos não vacinados ou vacinados <i>in ovo</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- HDL High Density Lipoproteins/ lipoproteínas de alta densidade
LDL Low Density Lipoproteins/ lipoproteínas de baixa densidade
VLDL Very low density lipoprotein/ Lipoproteína de muito baixa densidade
TGA Triglycerides/Triglicerídeos

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 A técnica de Vacinação <i>In ovo</i>	2
2.2 Fisiologia do desenvolvimento embrionário	6
2.3 Parâmetros bioquímicos sanguíneos em aves.....	11
2.3.1 Glicose.....	11
2.3.2 Ácido úrico	12
2.3.3 Lactato	13
2.3.4 Albumina	14
2.3.5 Triglicérides.....	14
2.3.6 Colesterol Total.....	15
2.3.7 HDL, LDL, VLDL	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Primeira fase experimental	16
3.1.1. Local.....	17
3.1.2. Ovos.....	17
3.1.2.1 Variáveis analisadas em ovos	18
3.1.2.2 Peso específico dos ovos.....	19
3.1.2.3 Peso do ovo e seus componentes.....	19
3.1.3 Pré-incubação e incubação dos ovos.....	21
3.1.4 Ovos inférteis e embriões com mortalidade inicial observada na ovoscopia ...	23
3.1.5 Vacinação <i>in ovo</i>	23
3.1.6 Transferência para o nascedouro.....	27
3.1.7. Dispersão do nascimento	28
3.1.8. Nascimento dos pintos.....	29
3.1.9 Análises de rendimento de incubação	29
3.1.9.1 Perda de peso dos ovos durante o período de incubação.....	29

4.1.9.2 Mortalidade embrionária e fertilidade	30
4.1.9.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis	30
4.1. Segunda fase experimental	31
4.1.1 Variáveis Analisadas	31
4.1.1.1 Peso dos pintos no momento da eclosão.....	31
4.1.1.2 Comprimento do pintinho	31
4.1.1.3 Escore de umbigo	31
5.1.1.4 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia.....	32
4.1.1.5. Peso dos órgãos e Peso do pinto sem o saco vitelino	33
5. Análise Estatística	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Características Fisiológicas e Zootécnicas de pintos vacinados *in ovo*

RESUMO

A técnica de vacinação *in ovo* é uma ferramenta utilizada com o intuito de otimizar o processo de produção de pintos de um dia e apesar de ser uma metodologia bastante difundida, há relatos sobre a baixa eclodibilidade na rotina dos incubatórios industriais. Para melhor entendimento do processo, foi realizado em incubatório de escala comercial, um estudo sobre as características fisiológicas e zootécnicas de pintos provenientes de matrizes Cobb® com 35 semanas de idade, submetidos ou não à vacinação *in ovo*. O estudo foi dividido em duas fases experimentais, na primeira fase foram realizadas avaliações da qualidade dos ovos incubáveis e do processo de incubação. A segunda fase experimental compreendeu as análises de qualidade e dos parâmetros fisiológicos dos pintos. A eclodibilidade sobre os ovos férteis não foi afetada pela vacinação *in ovo* ($P > 0,05$), apesar de o percentual de ovos bicados ser mais elevado quando o método foi utilizado ($P \leq 0,05$). Pintos vacinados *in ovo* tiveram seu peso médio e comprimento, peso do pinto sem o saco vitelino, peso de saco vitelino residual e peso relativo de órgãos, semelhantes aos não vacinados ($P > 0,05$), indicando que a técnica de vacinação *in ovo* não prejudica o desenvolvimento embrionário e a qualidade do pintinho. Además, a qualidade do umbigo foi mais elevada nos pintos vacinados ($P \leq 0,001$). As concentrações de glicose, albumina, ácido úrico e LDL foram menores no sangue de pintos vacinados, assim como foram maiores as concentrações de colesterol total e HDL ($P \leq 0,05$) nesses mesmos pintos. Os parâmetros sanguíneos indicaram que o maior aporte de O_2 causado pela perfuração da casca na vacinação *in ovo* pode ter proporcionado uma otimização da eficiência de utilização de energia por meio dos lipídeos da gema e menor degradação protéica. As principais vias metabólicas utilizadas pelo embrião na fase perinatal necessitam ser melhor investigadas para a implantação de outras inovações em larga escala, como é o caso da nutrição *in ovo*.

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário, eclodibilidade, frangos de corte, metabolismo

1. INTRODUÇÃO

do A técnica de vacinação *in ovo* idealizada por Sharma e Burmester (1982) é uma ferramenta utilizada com o intuito de otimizar o processo de produção de pintos de um dia. Dentre os benefícios método, pode-se citar a obtenção de imunidade das aves ainda na fase embrionária, inoculações precisas e uniformes, redução de contaminações e estresse do pinto recém-eclodido, além da diminuição dos custos com mão-de-obra (RICKS et al., 1999; BERNARDINO e DAGA, 2013).

Apesar da vacinação ser uma prática de rotina bastante difundida nos incubatórios industriais, ainda são relatados baixa eclodibilidade e atrasos de nascimento nas empresas que utilizam este procedimento. Pesquisas evidenciaram a queda significativa de eclosão, mas não relataram uma explicação para o aumento da mortalidade durante a incubação (SARMA et al.,1995; GACIC et al.,1999). Raros são os trabalhos encontrados na literatura que fazem menção às mudanças causadas por esta técnica na organogênese, sua interferência sobre os parâmetros sanguíneos dos embriões e consequentemente sobre o rendimento de incubação e qualidade do pintinho.

No momento da vacinação *in ovo*, uma agulha perfura a casca na região da câmara de ar e membrana interna, modificando o ambiente no qual encontra-se o embrião. Molennar et al. (2010) hipotetizaram que a produção de um orifício nestas regiões podem promover maior suprimento de oxigênio ao embrião, o que poderia causar alterações fisiológicas na fase final da incubação. Este período que antecede o nascimento, ocorre exatamente após a vacinação *in ovo*, e é caracterizado pela finalização do consumo oral do âmnion pelo embrião, acúmulo de reservas de glicogênio nos músculos e tecido hepático, início da respiração pulmonar, internalização do saco vitelino residual, bicada de casca e emergência (MEIJERHOF e VAN BEEK, 1993). Desta forma, esta fase é marcada por intensa atividade metabólica e utilização de energia para a eclosão e qualquer distúrbio durante este período pode afetar marcadamente a sobrevivência do embrião e sua performance pós-eclosão (LOURENS et al., 2006).

Diante dos fatores relatados, torna-se imprescindível o estudo das características fisiológicas e zootécnicas de pintos vacinados *in ovo*, tanto com o intuito de aprimorar

a técnica de vacinação durante a incubação, assim como para a implantação de outras inovações em larga escala, como é o caso da nutrição *in ovo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A técnica de Vacinação *In ovo*

O aumento da produtividade na cadeia avícola brasileira e mundial, deve-se em grande parte à evolução do melhoramento genético, nutrição e consequente precocidade dos frangos de corte ou poedeiras comerciais. Entretanto, a baixa resistência das novas linhagens aos agentes infecciosos é ainda uma grande barreira decorrente do sistema intensivo de produção. Dessa forma, a busca de meios para tornar as aves menos susceptíveis a infecções é constante, principalmente pela elaboração de programas vacinais que possam ser compatíveis com os desafios encontrados no campo. Neste contexto, a técnica de vacinação *in ovo* surgiu como uma ferramenta para os incubatórios com o intuito de aperfeiçoar o processo de produção de pintos de um dia e a eficácia da proteção das aves ainda na fase embrionária, estimulando precocemente o sistema digestivo e imunológico destes animais (BERNARDINO e DAGA, 2013).

A vacinação *in ovo* teve início na década de 80, por meio de pesquisas realizadas no Departamento de Agricultura dos EUA (USDA). Os pesquisadores Sharma e Burmester (1982) demonstraram pela primeira vez a viabilidade da aplicação da vacina *in ovo* contra o vírus de Marek, quando aplicada entre 18º a 19º dias de incubação nos embriões de galinha, uma vez que a vacina HVT sorotipo 3 ofereceu maior proteção do que a vacinação neonatal nas aves aos 3 dias após a eclosão. A descoberta estimulou o mercado avícola a desenvolver um dispositivo automatizado que pudesse injetar vacinas em ovos, de forma rápida, precisa e segura para os embriões.

No ano de 1992, surgiu pela primeira vez o sistema automatizado de inoculação *in ovo*, conhecido como Inovoject®. Esse sistema foi inicialmente introduzido nos Estados Unidos pela empresa Embrex, Inc, permitindo que os operadores dos incubatórios utilizassem com sucesso as vacinas contra a doença de Marek, Boudouville e doença de Gumboro (AVAKIAN et al., 1999; WINANS e NEWMAN, 1997; GIAMBRONE et al. 2001; SARMA et al., 1995). Desde então, a vacinação *in ovo* e as

máquinas vacinadoras passaram por uma grande evolução e difusão nos incubatórios em todo o mundo. As vacinadoras *in ovo* estão presentes em mais de 90% dos incubatórios dos Estados Unidos e mais de 34 países em cinco continentes, destacando-se o Brasil, pela sua alta produtividade (BERNARDINO e DAGA, 2013; OLIVEIRA, 2013).

A técnica tornou-se uma opção mais eficiente para a aplicação das vacinas, substituindo o tradicional método mecânico por injeção subcutânea em pintos recém-eclodidos ou o uso de seringas manuais, que requerem maior mão-de-obra e apresentam maior incidência de erros durante o processo (GILDERSLEEVE et al., 1993; GILDERSLEEVE e FLUKE, 1995). Atualmente, podemos encontrar equipamentos capazes de injetar até 50.000 ovos por hora (WILLIAMS, 2009; BERNARDINO e DAGA, 2013), conferindo aos embriões vacinados *in ovo* um grau considerável de proteção no terço final da incubação (NEGASH et al., 2004; WILLIAMS e ZEDEK, 2010).

Uma das características que se destacam na vacinação *in ovo*, é a padronização da quantidade de vacina em um ponto definido em todas as vacinações. A agulha atravessa a casca e suas membranas até alcançar o compartimento desejado. Devido às diferenças dos formatos e tamanho dos ovos incubados, as máquinas vacinadoras possuem um sistema de cabeçotes flutuantes com uma matriz de tubagem expansível que, em uma fração de segundos, recebe um sopro de ar para ajustar individualmente cada cabeçote na posição correta, assegurando a trajetória adequada da agulha no seu ovo (JOHNSTON et al., 1997; WILLIAMS e ZEDEK, 2010).

Conforme preconizado por Sharma e Burmester (1982), a técnica é comumente realizada no momento da transferência dos ovos para os nascedouros, que ocorre entre 18 dias a 19 dias de incubação (LI et al., 2005). Nesse período, o embrião encontra-se fisiologicamente iniciando a penetração do saco vitelino na cavidade abdominal, a cabeça está debaixo da asa direita e o bico projetado em direção à câmara de ar (BARBOSA, 2011; WILLIAMS, 2009). A injeção *in ovo* pode acessar cinco áreas distintas do ovo embrionado, sendo elas: câmara de ar, cavidade alantóide, cavidade amniótica, corpo do embrião e saco vitelino (Figura 1).

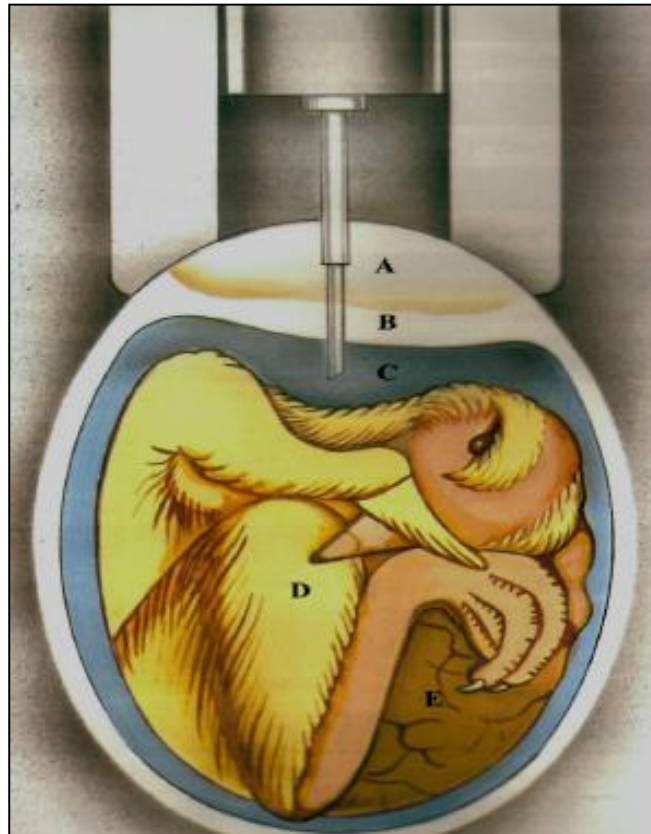


Figura 1- Regiões do ovo embrionado (Embrex) para aplicação da vacina *in ovo*. A) Câmara de ar; B) Alantóide; C) Líquido Amniótico; D) Embrião; E) Saco vitelino.

Várias pesquisas foram realizadas (ISLAM et al., 2001; JOCHEMSEM e JEURISSEN, 2002; WAKENELL et al., 2002) no intuito de definir a região do ovo embrionado onde é mais efetiva a inoculação dessas substâncias. Wakenell et al. (2002) estudando os diferentes locais de aplicação *in ovo* da vacina de Marek, demonstraram que quando a mesma foi aplicada na câmara de ar, não houve resposta eficaz. Por outro lado, excelentes resultados foram encontrados quando a vacina foi aplicada na cavidade amniótica (com um índice de proteção de 94,4%) e no corpo do embrião (com um índice de proteção de 93,9%).

Na prática, as vacinas são injetadas no líquido amniótico ou no tecido subcutâneo do embrião (GILDERSLEEVE et al, 1993; UNI e FERKET, 2003; WILLIAMS, 2005). Quando a vacina é depositada no fluido amniótico, a substância vai ser consumida oralmente pelo embrião antes da eclosão para que possa estimular a adequada resposta imunológica (FERKET, 2006; SOUZA, 2008). Williams (2011) relatou que além de estimular precocemente o trato gastrointestinal dos embriões, após

ser administrada no fluido amniótico, a vacina também apresenta replicação viral que se espalha rapidamente para as vias respiratórias, para as vísceras e a Bursa de Fabricius, tornando-se fundamentais para o desenvolvimento da imunidade contra doenças antes da eclosão e da exposição do pintinho recém-eclodido ao ambiente.

Com a expansão deste processo, muitos estudos têm investigado a eficácia da inoculação de outras substâncias juntamente com as vacinas, como por exemplo, nutrientes, antibióticos ou outros produtos capazes de melhorar as respostas fisiológicas e zootécnicas das aves. O procedimento patenteado por nutrição *in ovo* (UNI e FERKET, 2004, 2010), visa melhorar o desenvolvimento do embrião, prover aporte nutricional para o momento da eclosão, além de aumentar a capacidade funcional de digestão e absorção de nutrientes, com consequente melhorias no desempenho das aves durante a criação (FOYE et al., 2006). No entanto, apesar de demonstrar alguns resultados cientificamente promissores, a nutrição *in ovo* ainda não é uma técnica difundida nos incubatórios comerciais. Para o uso concomitante com as vacinas, um dos fatores a serem considerados é que, grande parte das pesquisas realizadas nos últimos anos com suplementação *in ovo*, recomenda-se a utilização de um volume de 1 mL, enquanto que as máquinas vacinadoras estão programadas para injeção de volumes entre 0,05 e 0,10 mL (ROCHA e MAIORKA, 2013; ZHAI et al., 2011b). Ainda existem também questões importantes que devem ser melhor investigadas e definidas, como a osmolaridade das soluções e o equilíbrio osmótico dos embriões, o melhor momento durante a incubação para a inoculação, quais nutrientes e quais concentrações podem ser injetados sem que haja quedas de eclodibilidade ou danos às aves.

Apesar do sucesso da vacinação *in ovo*, ainda são relatados quedas de eclosão e atrasos de nascimento nos incubatórios industriais que utilizam este método. Algumas pesquisas evidenciam a queda significativa de eclosão mas não relatam uma explicação para o aumento da mortalidade durante a incubação (SARMA et al., 1995; GACIC et al., 1999). Considerada metodologia recente, ainda é necessário aprofundamento dos conhecimentos sobre fisiologia e metabolismo do embrião, além do estudo das mudanças que essas práticas podem ocasionar durante a incubação, desde o momento que ocorre a perfuração da casca pela agulha até o nascimento do pintinho (ROCHA e

MAIORKA, 2013), tanto com a finalidade de aprimoramento da técnica de vacinação *in ovo* como para a implantação da nutrição *in ovo* em larga escala.

2.2 Fisiologia do desenvolvimento embrionário

A compreensão das características fisiológicas associadas ao desenvolvimento embrionário se torna essencial para alcançar um desempenho zootécnico satisfatório na incubação e determinar o período correto para a realização de inoculações *in ovo*. Além disso, fatores como a estrutura do ovo e o manejo durante a incubação influenciam diretamente a qualidade final dos pintinhos (WILLIER, 1954; DEEMING, 2002; MORAN, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Everaert e Decuypere (2013) afirmam que, quando o ovo é submetido às condições de incubação, ou seja, temperaturas médias entre 37.5 a 37.8°C, umidade relativa média de 55%, viragem e ventilação adequadas, o desenvolvimento do embrião e sua formação completa se darão em aproximadamente 504 horas (± 21 dias).

O ovo de galinha é denominado cleidóico, pois quando é posto representa um sistema autossuficiente, visto que, além dos fatores físicos externos, o desenvolvimento do embrião é dependente somente dos componentes presentes no ovo. Macroscopicamente, o ovo fértil é composto por três partes: a casca, a gema e o albúmen. Limitações na disponibilidade desses nutrientes, seja por quantidade ou pela forma em que se apresentam, comprometem o crescimento ou causam a morte do embrião (BARBOSA, 2011).

A casca dos ovos representa a proteção externa do embrião e é a fonte principal de cálcio para o seu desenvolvimento. Os principais componentes da casca são: cálcio (98,2%), magnésio (0,9%) e fósforo (0,9%), podendo-se encontrar também, cobre, manganês e ferro, que são minerais importantes para o metabolismo embrionário (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949). A casca é composta por uma fina cutícula, que envolve o ovo externamente; uma camada espessa de calcário e internamente duas membranas (FREEMAN e VINCE, 1974). Além disso, os poros da casca possuem a função de promover a troca de gases entre o embrião e o meio ambiente, transferindo

oxigênio para o interior do ovo e retirando o dióxido de carbono produzido (VIEIRA, 2007; NASCIMENTO e SALLE, 2003). A gema é a principal fonte de energia para as demandas fisiológicas do crescimento embrionário. Possui como componentes principais os lipídeos e as proteínas, estas que estão presentes em grande parte na forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs). O principal componente empregado na produção de energia são os triglicerídeos, que correspondem à cerca de 67% dos lipídeos da gema, seguidos dos fosfolipídios (23,3%) e colesterol (5,2%). Os principais ácidos graxos componentes da gema são o palmítico e o esteárico (30 e 38%, respectivamente) (VIEIRA, 1999, 2007). Na gema, são encontrados apenas 0,3% de glicose livre, os demais carboidratos estão ligados às proteínas e lipídeos (ZHAI, 2011). O albúmen é composto por proteínas de alto valor biológico, sendo 54% representadas por ovoalbumina. O albúmen tem como seu principal componente a água (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949). Lipídios, carboidratos e minerais são encontrados em frações inferiores (SOLOMON, 1991; JOHNSON, 2000).

De acordo com Moran (2007), os processos fisiológicos dos embriões de aves são dependentes de reações bioquímicas, ou seja, transformações de nutrientes em energia para o desenvolvimento e eclosão do pintinho. Os principais processos fisiológicos que acontecem durante a incubação podem ser divididos em três fases metabólicas principais. Uma série de eventos ocorre na transição de cada fase, e a importância é destacada devido ao número significativo de mortes nestas transições (Figura 2).

A primeira fase inclui a primeira semana de incubação, que é caracterizada pela formação dos compartimentos do ovo que dão suporte a sobrevivência do embrião em crescimento (âmnion, córion, alantoide e saco vitelino) (BARBOSA, 2011). A segunda fase é marcada por intenso crescimento embrionário e compreende o período de maturação da corioalantóide, que assegura a troca gasosa e fornece o oxigênio necessário para a produção de energia até o momento em que o embrião inicia a transição da respiração corioalantóide para pulmonar (WILSON, 1997). A terceira fase corresponde ao período final da incubação (19º até o 21º dia de incubação), quando o embrião inicia sua preparação para a eclosão, realiza a bicagem da casca e estabelece a respiração pulmonar. Esta última fase é caracterizada por intensa demanda energética (GONZALES, 2005).

Na primeira fase, aproximadamente entre 0 a 96 horas, o embrião restabelece seu desenvolvimento com intensa multiplicação celular, diferenciação das estruturas e desenvolvimento dos órgãos (GONZALES, 2005). De acordo com Moran (2007), durante os primeiros dias de incubação, as células sanguíneas encontram-se ainda imaturas e apresentam reduzido desenvolvimento do sistema vascular, tornando o fornecimento de oxigênio para o embrião limitado. Dessa forma, a principal via metabólica energética para essa fase é através da glicólise anaeróbica. O ovo apresenta baixas quantidades de glicose no albúmen, tornando essa via metabólica limitada (UNI et al., 2005; MORITA, 2009). Nesse período, ocorre um aumento da produção de ácido láctico, podendo este ser utilizado para a produção de glicose por meio da gliconeogênese, até que a membrana corioalantóide torna-se funcional (DE OLIVEIRA et al., 2008).

A partir do quinto dia de incubação, a membrana corioalantóide inicia sua função respiratória, aumentando a circulação de oxigênio para o embrião, através dos poros da casca. A membrana corioalantóide torna-se completa por volta do sétimo dia (SATO et al., 2006). A partir desse momento, que compreende a segunda fase do desenvolvimento embrionário, a oxidação dos lipídeos da gema torna-se a principal fonte de energia para os embriões até o momento da bicagem interna (DECUYPERE, 1991). A oxidação dos lipídeos, além de gerar duas vezes mais energia por grama que os carboidratos e proteínas, contribuem também com a produção de água metabólica (CALIL, 2007). Com a mobilização e hidrólise dos componentes da gema, ocorre liberação dos ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos, principalmente os não essenciais, são utilizados na β -oxidação para a produção de energia (SPEAKE e DEANS, 2004). Os ácidos graxos essenciais são conservados para a constituição das membranas celulares dos embriões. O glicerol pode ser encaminhado para a via metabólica da gliconeogênese, ocorrendo a produção glicose (DE OLIVEIRA et al., 2008). Nessa fase, os carboidratos presentes estão sendo conservados para posterior utilização.

De acordo com Yoshizaki (2002) e Uni e Ferket (2004), entre o 14º e 15º dia de incubação, o albúmen e o âmnio formam uma conexão seroamniótica, na região mais fina do ovo. Após essa junção, o albúmen juntamente com o fluido amniótico, será consumido via oral (BOHORQUEZ, 2010), sendo absorvidos pelos enterócitos (sistema gastrointestinal) que são capazes de absorver macromoléculas presentes no duodeno e

jejuno. Esse consumo oral, além de promover o desenvolvimento do sistema gastrointestinal, fornece proteção para o embrião pela presença das IgA presentes no albúmen (UNI et al., 2003; FERKET e UNI, 2006). Os carboidratos ligados a essas proteínas (glicoproteínas ou proteínas glicosadas) são usados na gliconeogênese, resultando em um aumento na concentração de glicose sanguínea, e posteriormente deposição de reservas de glicogênio no fígado e músculos (MORAN JR, 2007). O consumo do albúmen e fluido amniótico estende-se até que a mistura desapareça e comece o processo de bicagem interna pelo embrião em torno do 18 a 19º dia de incubação (EVERAERT e DECUYPERE, 2013).

Zhai et al. (2011) relata que a glicose estocada na forma de glicogênio, alcança sua concentração máxima no fígado dos embriões até o 19º dia de incubação. Neste período inicia-se a terceira fase do desenvolvimento embrionário, onde os embriões começam a se preparar para o processo de eclosão e necessitam de uma alta demanda de energia, ocasionando redução das reservas de glicogênio.

No período final da incubação, entre o 18º a 19º dia, o embrião rompe a membrana interna e a corioalantóide, tendo acesso à câmara de ar. Nessa fase, o embrião inicia a transição da respiração corioalantóide para pulmonar (MORAN, 2007). Após consumir todo o oxigênio presente nesse compartimento do ovo, a demanda por oxigênio volta a ser limitada. Dessa forma, o embrião começa a metabolizar carboidratos por meio de mecanismos anaeróbicos. Um dos mecanismos é a liberação da glicose a partir das reservas de glicogênio por meio da glicogenólise, e a partir das proteínas do líquido amniótico e tecido muscular. Um outro mecanismo é a utilização do glicerol proveniente do metabolismo lipídico por meio da gliconeogênese (UNI et al., 2005). No momento da bicagem interna até a alimentação pós-eclosão, a gliconeogênese hepática e muscular são importantes por serem uma das principais vias metabólicas responsáveis pelo fornecimento rápido de glicose ao embrião (Christensen et al., 2001). O aumento do ácido láctico é reduzido quando o pulmão fornece quantidade suficiente de O₂ para as funções metabólicas necessárias para a produção de ATP (YADGARY e UNI, 2012).

A alta demanda de energia nessa fase, principalmente quando a deposição de glicogênio não é suficientemente adequada, provoca a produção de energia a partir da

degradação de proteína musculares pelo embrião (CHRISTENSEN et al., 2001; ZHAI et al., 2011). O músculo peitoral (pectoralis major) é metabolicamente importante, pois representa uma fonte de aminoácidos para gliconeogênese como também pela sua capacidade de estocar glicogênio (YAHAV, 2010). No caso da diminuição da proteína corporal nos músculos de embriões, a consequência é o menor desenvolvimento dos pintos na fase de criação.

O processo de vacinação in ovo é realizado durante a terceira fase de desenvolvimento embrionário. Durante este período dramáticas mudanças fisiológicas e metabólicas acontecem e qualquer distúrbio durante este período pode afetar marcadamente a sobrevivência do embrião e sua performance pós-eclosão.

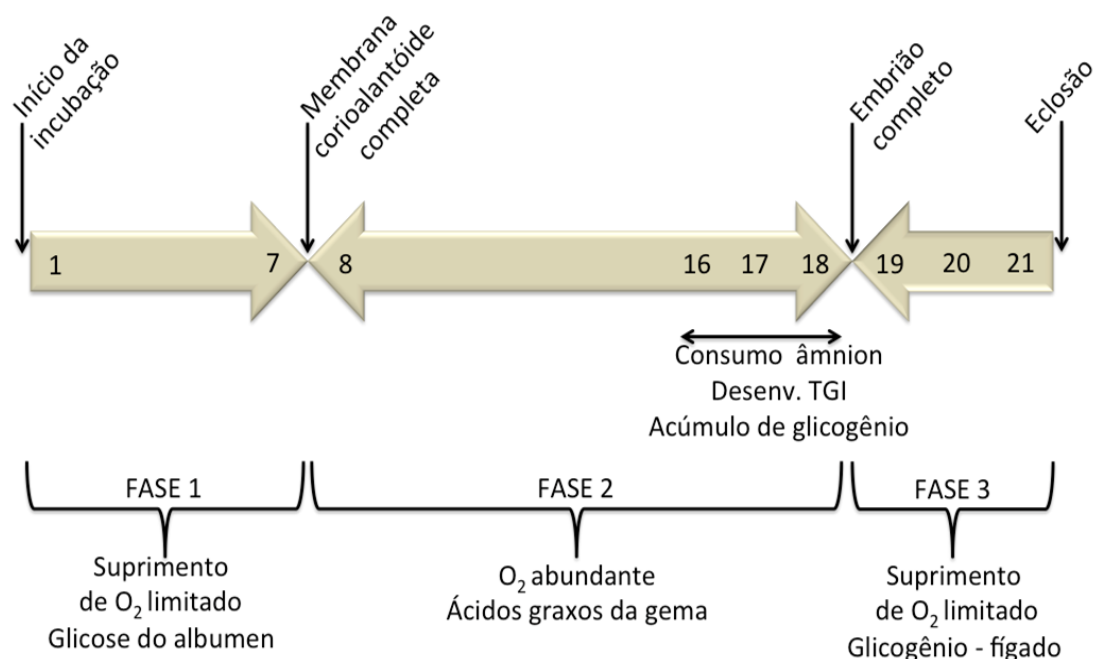


Figura 2 – Caracterização cronológica da morfofisiologia embrionária de aves. Adaptado de Nangsuay (2016).

2.3 Parâmetros Bioquímicos Sanguíneos em Aves

Devido às modificações drásticas na fisiologia e metabolismo embrionário que acompanham o processo de nascimento, o estudo dos parâmetros sanguíneos dos embriões é um componente essencial para a compreensão dos efeitos que a técnica da vacinação *in ovo* pode ocasionar na incubação, entretanto, não foram encontrados trabalhos na literatura com este objetivo.

2.3.1 Glicose

A glicose é a principal fonte de energia dos organismos vivos. Os teores normais de glicose sanguínea são mantidos pela ação dos hormônios insulina (induz o catabolismo da glicose nas células) e glucagon (induz glicogenólise e gliconeogênese). Normalmente os valores de glicose circulantes costumam estar baixos em pintinhos logo após a eclosão. Essa ocorrência é devido a baixa concentração de glicose no ovo, que não excede 1% e também pela utilização da glicólise anaeróbia pelo embrião, bastante comum no fim da incubação devido à hipóxia (WILLEMSSEN et al., 2010; MAATJENS et al., 2014). Portanto, a glicose naturalmente disponível nos ovos pode não ser suficiente para atender às demandas metabólicas imediatas do embrião. Em frangos de corte jovens (1 a 14 dias) ocasionalmente pode-se observar alta mortalidade com sinais nervosos. Estes casos na maioria das vezes estão relacionados com a doença conhecida como Síndrome do Incremento Súbito da Mortalidade Associada com Hipoglicemia (DAVID, 2008).

De acordo com o trabalho realizado por Salmanzadeh et al., 2011, avaliando os efeitos da injeção *in ovo* de glicose e magnésio em ovos de reprodutoras de corte sobre as características de eclosão, desempenho, rendimento de carcaça e parâmetros sanguíneos, foram encontrados valores para glicose plasmática de pintinho de um dia de 177 mg/dL (9,84 mmol/L).

Nangsuay et al. (2015) pesquisando diferenças na disponibilidade de nutrientes do ovo, desenvolvimento e metabolismo de embriões de frangos e poedeiras encontraram valores médios de 10,94 mmol/L de glicose, às 6 horas após o nascimento. Maatjens et al. (2016), avaliando o efeito de diferentes temperaturas da casca do ovo

durante a fase de incubação (36,7; 37,8 ou 38,9 ° C) e duas concentrações de CO₂ (0,2 ou 1%) sobre os efeitos da fisiologia dos embriões de galinha, relataram valores médios de 7.90 mmol/L de glicose.

2.3.2 Ácido úrico

O ácido úrico é o principal produto catabólico de proteínas, de nitrogênio protéico e das purinas em aves, constituindo aproximadamente 60 a 80% do total de nitrogênio excretado pela urina. As análises de ácido úrico têm como objetivo principal avaliar a função renal de aves adultas (BERTECHINI, 2013), porém, é preciso um comprometimento de 75% da função renal para a detecção do aumento de ácido úrico no sangue. Os níveis de ácido úrico podem ser aumentados a partir da libertação de ácidos nucleicos causados por danos graves ao tecido ou por degradação da proteína em casos de jejum prolongado, como também em casos de alta demanda energética, observado em embriões de frangos de corte no período final da incubação (SAKOMURA et al., 2014). Desse modo, quando as aves mobilizam proteínas para a utilização de energia, ocorre um aumento na concentração de ácido úrico plasmático.

A síntese ocorre principalmente no fígado e pode ocorrer também nos rins, e são transportados no sangue e excretados por filtração glomerular e secreção tubular. Os níveis normais de ácido úrico no sangue podem variar entre 1 até 2 mg/dL (0,059 a 0,1189 mmol/L) para aves jovens e entre 2 até 15 mg/dL (0,1189 a 8,922 mmol/L) para aves adultas. Esses valores são modificados de acordo com a espécie, idade e dieta (nível de proteína, principalmente) (BARBOSA et al., 2011; BERTECHINI, 2013).

Nangsuay et al. (2015) observaram valores médios de 0,23 mmol/L, 6 horas após o nascimento, quando comparou esta variável em embriões de frangos e poedeiras comerciais. Maatjens et al. (2016), encontraram valores médios de ácido úrico de 2,71 mmol/L, ao estudarem os efeitos de diferentes temperaturas e concentrações de CO₂ (0,2 ou 1%) na incubação de ovos de frango de corte.

2.3.3 Lactato

O lactato é produzido no músculo durante o metabolismo anaeróbico e metabolizado no fígado. O aumento ocorre quando, na ausência de oxigênio, há um acúmulo de piruvato, que supera a utilização pela mitocôndria. O piruvato será então oxidado pela via anaeróbica produzindo lactato (BURGDORF-MOISUK et al., 2012). Este composto é um indicativo de hipóxia celular, seu aumento no plasma pode ocorrer tanto pelo aumento da produção, como também pela redução do metabolismo do fígado, rins e coração. O aumento do lactato é comum no embrião na fase inicial de incubação e no período de transição entre a respiração cório-alantóidea e pulmonar, onde há baixa disponibilidade de oxigênio para a realização da beta-oxidação. Desta forma o embrião utiliza glicólise anaeróbia, além da quebra do glicogênio, que é a principal fonte de lactato. O glicogênio libera moléculas de glicose que serão oxidadas até piruvato, que por sua vez em aerobiose é transformado em lactato (WILLEMSSEN et al., 2010; MAATJENS et al., 2014).

O lactato é considerado um importante metabólito intermediário, pois libera energia mais rapidamente, é facilmente transportado para dentro das membranas e não requer insulina para seu transporte. Além disso, o lactato é considerado um bom indicador de esforço físico, situação na qual os embriões enfrentam ao final da incubação, quando grande quantidade de energia é utilizada nos movimentos para rotação do corpo e quebra da casca (CHRISTENSEN et al., 2001).

Em suas pesquisas, Nangsuay et al. (2015) encontraram valores médios de lactato de 2,27 mmol/L, 6 horas após o nascimento dos pintos, e Maatjens et al. (2016), relataram valores médio de 1,81 mmol/L. Segundo os autores, o aumento dos níveis de lactato indica aumento do metabolismo da glicose pela via glicolítica e pode ser causado pelo aumento da taxa metabólica. A atividade muscular é alta e a disponibilidade de O₂ é baixa durante o processo de eclosão, favorecendo o aumento de lactato (DE OLIVIERA et al., 2008).

2.3.4 Albumina

A albumina é uma proteína de alta densidade produzida no fígado e a queda nos seus valores sanguíneos pode indicar insuficiência hepática, carência de proteínas na dieta, parasitismo ou doenças, como Newcastle. É a proteína mais abundante no sangue (40-60%) sendo responsável pelo transporte de ácidos graxos, ácido úrico, vitaminas A e C, cálcio, magnésio, zinco, cobre, bilirrubina e hormônios tireoidianos no caso específico das aves adultas (MELILLO, 2013).

Em embriões de galinha, as altas concentrações de albumina no sangue podem ser causadas pelo aumento da degradação de proteínas, quando estas são utilizadas como fonte de energia, principalmente no terço final da incubação. Adicionalmente, é relatado que animais desidratados podem apresentar aumento nos níveis de albumina no sangue (LAGANÁ, 2007; SCHMIDT et al., 2007). Os baixos níveis de albumina podem levar à ascite ou edemas pela redução da atividade osmótica do plasma e consequente extravasamento de líquidos. Resultados abaixo de 3,0 g/dl significam hipoalbuminemia, pois a albumina representa a maior fração proteica do plasma de aves. De acordo com Kaneko et al. (2008) os níveis de albumina devem encontrar-se na faixa de 1,6 a 2,9 g/dL.

2.3.5 Triglicérides

Os triglicérides são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo de embriões, tanto do ponto de vista qualitativo, por acumular grandes quantidades no organismo animal, como também pelo ponto de vista quantitativo, por apresentar grande quantidade de energia quando comparado a outros grupos, como os carboidratos e proteínas. O saco vitelino dos embriões de frangos de corte, apresentam cerca de 65% de triglicérides. O metabolismo dos triglicérides, seja ele proveniente da dieta ou daqueles armazenados no próprio organismo, se inicia pela hidrólise através das enzimas lipases, liberando o glicerol e ácidos graxos (BERTECHINI, 2013). O aumento dos triglicérides no sangue pode estar relacionado à alta mobilização dos lipídeos para a utilização de energia pelos embriões de frangos de

corte. Os triglicerídeos são sintetizados na mucosa intestinal e no fígado a partir dos componentes da digestão e absorção de ácidos graxos. Suas concentrações podem variar em função de vários fatores. Por meio dos valores de triglicerídeos, é possível estimar os valores de VLDL, que representam 1/5 de seu valor total.

2.3.6 Colesterol Total

O colesterol total é uma substância de caráter lipídico, podendo ser adquirido por fontes endógenas ou pela dieta. O colesterol total é determinado normalmente pela soma do colesterol livre no plasma e sua forma esterificada. De acordo com Schmidt et al. (2007) são fundamentais na formação das membranas celulares, síntese de hormônios (testosterona, estrogênio, cortisol e aldosterona), produção de bile (digestão de lipídios), formação da mielina e metabolismo das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K).

A concentração também pode depender do estado fisiológico dos embriões, pois os mesmos podem mobilizar o colesterol para a produção de energia, causando oscilações na sua concentração (CATALAN et al., 2013). Em função de sua natureza hidrofóbica, o colesterol necessita ser transportado por lipoproteínas no sangue (HDL - lipoproteína de alta densidade, LDL - lipoproteína de baixa densidade e VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade).

2.3.7 HDL, LDL, VLDL

As lipoproteínas consistem em um composto de proteínas e lipídeos, organizados de modo a facilitar o transporte dos lipídeos pelo plasma sanguíneo. A estrutura básica das lipoproteínas é idêntica, variando somente de tamanho e proporção entre os seus componentes (BERTECHINI, 2013). De acordo com Noble (1986), a fração proteica é composta por apoproteínas, enquanto a parte lipídica é formada por colesterol, triglicerídeos (TGA) e fosfoglicerídeos. As principais frações medidas no plasma são: VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade). As lipoproteínas são sintetizadas principalmente no fígado e podem ser produzidas no intestino delgado, que transportam

o colesterol e os triglicerídeos por meio da corrente sanguínea. A principal forma cujo lipídeo é absorvido e transportado nas aves é na forma de VLDL (SAKOMOURA et al., 2014).

As VLDL transportam triglicerídeos do fígado para os tecidos periféricos. O sistema linfático das aves é pouco desenvolvido, e conseqüentemente, as VLDL são absorvidas diretamente na veia porta. À medida que as VLDL vão depositando seus triglicerídeos nas células, acontece um aumento da densidade do VLDL por liberação dos ácidos graxos da molécula de triglicerídeos, que constitui sua principal fonte de ácidos graxos. Os ácidos graxos entram na célula e são reesterificados, sendo depositados nas reservas do embrião ou utilizados em processos metabólicos (via β -oxidação). O glicerol dos triglicerídeos não entram nas células e retornam diretamente para o fígado, órgão onde é metabolizado pela via gliconeogênica (DRACKLEY, 2002; SATO et al., 2005). De acordo com Behr et al. (1981), a liberação de TGA pelas VLDL de origem hepática transforma gradualmente parte destas lipoproteínas em LDL. O HDL é responsável pelo transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas fases experimentais. Na primeira fase foram realizadas avaliações da qualidade dos ovos incubáveis e do processo de incubação dos ovos submetidos ou não a técnica de vacinação *in ovo*. A segunda fase experimental compreendeu as análises de qualidade e dos parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia.

Os protocolos experimentais utilizados estão de acordo com as diretrizes da Universidade Federal da Bahia e do Comitê de Ética do Uso de Animais – CEUA.

3.1 Primeira fase experimental

3.1.1. Local

A primeira fase experimental foi realizada no Incubatório da Granja Asa Branca localizada no município de São Cristovão - SE e a segunda fase experimental foi conduzida no Núcleo de Pesquisa em Incubação Artificial de Ovos (NUPIA-UFBA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, localizado no município de Salvador-BA, no período de Janeiro a Março de 2017.

3.1.2. Ovos

Foram obtidos 1536 ovos de matrizes pesadas da linhagem Cobb® com idade de 35 semanas, provenientes do Matriseiro da Granja Asa Branca, localizado no município de Estância-SE. Utilizou-se ovos de dois galpões, pertencentes à segunda coleta do mesmo dia. Imediatamente após a coleta, ainda na granja, os ovos destinados à incubação foram desinfetados pelo método de fumigação com paraformaldeído na concentração de 10g/m^3 e posteriormente transportados para o Incubatório em veículo climatizado, com temperatura inferior ao ponto zero fisiológico, considerado aproximadamente 21°C .

Na chegada ao incubatório realizou-se a seleção dos ovos, eliminando aqueles considerados não incubáveis (sujos, trincados, quebrados, pequenos e deformados). Em seguida os ovos incubáveis foram colocados em bandejas de incubação com capacidade para 96 ovos cada. 30 bandejas foram selecionadas e identificadas aleatoriamente, sendo 15 bandejas identificadas como tratamento V (Vacinação *in ovo*) e 15 bandejas foram identificadas como tratamento C (Controle). Uma bandeja por tratamento foi selecionada ao acaso para análise dos ovos e as 14 restantes para incubação.

Nestas condições, os ovos dos respectivos tratamentos permaneceram na sala de armazenamento por três dias, com médias de temperatura e umidade relativa do ar (UR) de 20°C e 80% respectivamente (Figura 3).



Figura 3 – Distribuição dos ovos incubáveis de acordo com os tratamentos. Tratamento V (Vacina - etiqueta Azul) correspondente aos embriões que receberam vacinação *in ovo* contra a doença de Marek; Tratamento C (Controle - etiqueta Preta) embriões que não receberam nenhum tratamento no momento da transferência. Arquivo Pessoal.

3.1.2.1 Variáveis analisadas em ovos

40 ovos de uma bandeja por tratamento foram selecionados ao acaso para análises de peso dos ovos e seus componentes, espessura de casca e peso específico. Estas análises foram realizadas com o objetivo de conferir a homogeneidade dos ovos incubados em ambos os tratamentos e assegurar que as características estruturais eram compatíveis com a idade da matriz.

3.1.2.2 Peso específico dos ovos

O peso específico foi determinado por meio de soluções com cinco diferentes densidades, de acordo com Olsson (1934) (Figura 5). No preparo das soluções, foram utilizados cinco baldes graduados com 10 L de água em temperatura ambiente. Em cada um destes baldes foi adicionado cloreto de sódio em quantidades para se obter as soluções com as densidades de 1.070, 1.075, 1.080, 1.085 e 1.090. As densidades das soluções foram confirmadas com um densímetro de massa específica (Incoterm® 1,000/1,100:0,001) e monitoradas a cada 10 minutos. Os dados de peso específico foram registrados em números absolutos.



Figura 4 – Avaliação do peso específica. Arquivo pessoal

3.1.2.3 Peso do ovo e seus componentes

Para as avaliações de peso dos ovos, gema, albúmen e casca, os ovos foram pesados em balança analítica digital (0,001g) Mater® modelo AY200 e, após a quebra dos mesmos, foram separados o albúmen, a gema e a casca. A separação da gema foi realizada manualmente e o resíduo da clara, aderida à gema, foi removido com o auxílio

de papel absorvente. Após este procedimento, as gemas foram pesadas individualmente. As cascas, depois de lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de albúmen, secaram a temperatura ambiente durante 24 horas, e foram pesadas individualmente. O peso do albúmen foi obtido pela diferença entre o peso dos ovos inteiro e o peso da gema mais o peso da casca:

$$\text{Peso do albúmen} = \text{Peso do ovo inteiro} - (\text{Peso da gema} + \text{Peso da casca})$$



Figura 5- Peso do ovo e seus componentes. Arquivo pessoal.

4.1.2.1.3 Espessura de casca

A mensuração da espessura da casca dos ovos foi realizada por meio de um micrômetro digital (Digimess® resolução 0.001mm, 0-25mm) em fragmentos retirados das regiões apical, equatorial e basal, a partir dos quais se obteve a espessura média por

ovo. Para toda as mensurações foram retirados as membranas. Os ovos utilizados nesta análise foram os mesmos utilizados nas análises anteriores (Figura 6).



Figura 6 – Medição da espessura da casca. Arquivo pessoal.

3.1.3 Pré-incubação e incubação dos ovos

Após o período de armazenamento e antes do início da incubação, realizou-se um pré-aquecimento dos ovos durante 5 horas. A sala de pré-aquecimento foi mantida em temperatura média de 28°C e UR média de 55%. Após este período e imediatamente antes da entrada dos ovos na incubadora, cada bandeja com 96 ovos foram pesadas de acordo com os tratamentos.

No período de incubação foi utilizada uma máquina incubadora modelo CASP CM 125 HD de estágio múltiplo, com capacidade para 124.416 ovos e controle digital de temperatura, umidade e viragem.

A máquina de incubação foi regulada para manter a temperatura de bulbo seco em 37,8°C (100,04°F) e temperatura de bulbo úmido em 28,9 °C (84 °F) correspondendo ao teor de UR de % durante toda a incubação.

A distribuição das bandejas do experimento dentro da incubadora foi realizada conforme (Figura 7). Foi preconizado que todas as bandejas de todos os tratamentos fossem distribuídas aleatoriamente somente do lado esquerdo da máquina para que

todas as bandejas recebessem as mesmas condições ambientais. As bandejas dos tratamentos foram colocadas na parte superior, no meio, e inferior, desprezando as duas primeiras e as duas últimas fileiras da máquina. Os demais espaços da máquina foram preenchidos com ovos que não fizeram parte do experimento, porém de idades de matrizes e lotes semelhantes para assegurar o equilíbrio da incubadora.



Figura 7 – Distribuição das bandejas dentro da máquina incubadora. Arquivo pessoal.

Para controle da temperatura embrionária, entre o 10º e o 18º dia de incubação, foram realizadas uma vez ao dia, mensurações da temperatura da casca dos ovos através do aparelho Thermoscan® Braun modelo IRT 4520. Foram selecionados dois ovos no centro de cada bandeja do experimento, após confirmação da fertilidade dos mesmos por meio de ovoscopia. As leituras foram realizadas no mesmo horário, localizando-se o termômetro na região equatorial de acordo com a figura abaixo (Figura 8).



Figura 8 – Mensuração da temperatura da casca do ovo. Arquivo Pessoal.

3.1.4 Ovos inférteis e embriões com mortalidade inicial observada na ovoscopia

No 12º dia de incubação, todos os ovos do experimento foram analisados em um ovoscópio. Os ovos claros foram retirados e quebrados, sendo identificados os ovos inférteis e aqueles com embriões mortos. Os dados foram registrados para posteriormente serem incluídos na análise final de mortalidade embrionária e fertilidade.

3.1.5 Vacinação *in ovo*

Ao final do 18º dia de incubação, todas as bandejas do experimento foram novamente pesadas, e posteriormente foram encaminhadas para a sala de vacinação *in ovo*. Nas bandejas identificadas como tratamento V, o processo de vacinação *in ovo* ocorreu conforme rotina normal do incubatório (Figura 9). Foi utilizada máquina

vacinação *in ovo* modelo Embrex Inc NO. IOM. 007, porte médio, sem ovoscopia. Antes de iniciar a vacinação *in ovo*, a máquina foi lavada e desinfetada com 4 etapas diferentes sendo: a primeira, foi utilizado detergente neutro para remoção de resíduos, logo após foi colocado desinfetante. Em seguida a máquina foi enxaguada com água e álcool e por último água destilada, para remover qualquer resíduo dos produtos utilizados. Após a lavagem e desinfecção, foi realizado o teste das injetoras, para garantir que todos os bicos de injeção estivessem funcionando normalmente (Figura 10)



Figura 9 – Teste de injeção da vacinadora *in ovo*. Arquivo pessoal

Após o teste de injeção, ocorreu a preparação da vacina na sala de vacinação. Foi utilizado um diluente especial de um litro da marca Biovet® composta por soluções de minerais e açúcar. As vacinas eram armazenadas em temperatura de 180° abaixo de zero, dentro de um botijão contendo nitrogênio líquido. As ampolas de vacina, antes de serem injetadas dentro do diluente, foram colocadas em banho-maria até obter temperatura ambiente.

Foram utilizados 8 ampolas de Vacina de Marek (HVT) associada com Gumboro da marca Biovet®. Ao atingir temperatura ambiente, as vacinas foram injetadas no

diluyente por meio da utilização de uma seringa e em seguida foram transportadas para a sala de vacinação *in ovo* em uma bolsa térmica contendo gelo (Figura 11).



Figura 10 – Preparação da vacina. Arquivo pessoal



Figura 11 – Bolsa térmica contendo gelo para preservação da qualidade da vacina. Arquivo pessoal.

Ao iniciar a vacinação, foram desprezados os primeiros jatos, com a finalidade de eliminar qualquer resíduo de produtos que ainda estejam na máquina, a fim de evitar contaminação nos ovos a serem vacinados. Através de uma agulha acoplada em cada bocal injetor, cada ovo recebeu a solução (Diluyente + Vacina) em quantidade de 0,5 ml, que foi programada para ser injetada diretamente na cavidade amniótica dentro do ovo (Figura 12).



Figura 12 – Processo de vacinação *in ovo*. Arquivo pessoal.

Após o processo de vacinação, os ovos foram transferidos para bandejas de eclosão, identificadas de acordo com os tratamentos e as suas respectivas bandejas de incubação. Os ovos das bandejas de incubação que foram identificados como tratamento C não foram vacinados, mas permaneceram na sala de vacinação por igual período e foram transferidos para as bandejas de eclosão previamente identificadas, da mesma forma que descrito em relação ao tratamento V (Figura 13).



Figura 13 – Transferência dos ovos vacinados das bandejas de incubação para a bandeja de eclosão. Arquivo pessoal.

3.1.6 Transferência para o nascedouro

No nascedouro, as bandejas de eclosão foram distribuídas aleatoriamente conforme os tratamentos (Figura 14). O carrinho pertencente ao experimento foi posicionado na parte da frente do nascedouro, para facilitar o manejo durante a contagem de pintos na janela de nascimento. O carrinho e a máquina utilizada para o experimento foram preenchidos com ovos dos mesmos lotes de matrizes e com a mesma idade de incubação, os quais não fizeram parte desta pesquisa.



Figura 14 – Distribuição das bandejas dentro do nascedouro. Arquivo pessoal.

Os ovos dos tratamentos foram colocados em um nascedouro modelo CASP 125 HT 21, com capacidade para 20.736 ovos. Nesta máquina o termostato foi programado para manter a temperatura do bulbo seco em 36,8°C (98,2°F) e a temperatura do bulbo úmido em 25,8°C (78,4°F), correspondendo ao teor de UR de 65%. A temperatura média da sala de nascedouro manteve-se em 24,9 °C e a UR em 67,7%.

3.1.7. Dispersão do nascimento

O momento em que os ovos foram colocados na incubadora, foi denominado hora zero. A partir de 462 horas de incubação, com intervalo de 6 em 6 horas, os pintos nascidos em cada bandeja dos tratamentos foram registrados para posterior avaliação da

janela de nascimento, que compreendeu o momento entre os primeiros e os últimos pintos nascidos.

3.1.8. Nascimento dos pintos

A retirada dos pintos dos nascedouros ocorreu com 516 horas (21 dias) de incubação. No final da incubação os pintos nascidos foram colocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos. Todas as caixas foram encaminhadas para sala de pintos, onde foi contabilizado o total de pintos mortos, o escore de umbigo, presença de canela vermelha, ponto vermelho no bico, desidratado, balofo, aleijado, caixa craniana aberta e cavidade abdominal aberta. Após a contagem de pintos nascidos, foram retirados ao acaso uma amostra de 28 pintos por tratamento (2 pintos por bandeja) para as análises posteriores.

3.1.9 Análises de rendimento de incubação

3.1.9.1 Perda de peso dos ovos durante o período de incubação

A perda de peso dos ovos foi determinada por pesagem individual de todas as bandejas (menos a tara) de cada tratamento antes dos ovos serem colocados na incubadora e no momento em que foram transferidos para os nascedouros; quando foram calculados os pesos médios dos ovos. O percentual de perda de peso dos ovos foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Perda de peso} = \frac{(\text{Peso dos ovos na incubação} - \text{Peso dos ovos na transferência})}{\text{Peso dos ovos no início da incubação}} \times 100$$

4.1.9.2 Mortalidade embrionária e fertilidade (%)

O número de ovos não eclodidos de cada máquina foi registrado, sendo os mesmos examinados para se determinar o percentual de ovos inférteis, ovos bicados (pintos que não conseguiram eclodir) e a fase em que ocorreu a mortalidade embrionária, incluindo a observação sobre mau-posicionamento e anormalidades morfológicas e conformacionais, de acordo com Barbosa (2011). A caracterização dos ovos não eclodidos foi a seguinte:

- Ovos inférteis;
- Ovos com embriões mortos no início da incubação (0 a 7 dias);
- Ovos com embriões mortos entre 8 a 18 dias de incubação;
- Ovos com embriões que morreram entre 19 a 21 dias;
- Ovos bicados com embriões vivos ou mortos;
- Ovos contaminados (ovos nos quais os embriões morreram devido à contaminação microbiana);
- Ovos desidratados (devido a trincas da casca ocorridas durante o processo).

Após esta análise, os dados de mortalidade inicial e infertilidade obtidos aos 10 dias na ovoscopia foram somados, e então o percentual total de mortalidade embrionária foi calculado sobre o número de ovos férteis. A fertilidade do lote foi obtida através da fórmula (100% - % de ovos inférteis). As alterações observadas nos embriões mortos, como por exemplo, mal-posicionamento, caixa craniana aberta, duplicação de membros posteriores e inferiores foram registrados.

4.1.9.3 Taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis (%)

Os ovos inférteis foram identificados no momento da ovoscopia e no embriodiagnóstico. A taxa de eclosão total em relação ao número de ovos férteis foi determinada, dividindo-se o número total de pintos nascidos pelo número de ovos férteis, e multiplicando-se por 100.

4.1. Segunda fase experimental

4.1.1 Variáveis Analisadas

4.1.1.1 Peso dos pintos no momento da eclosão

Os pintos nascidos foram colocados em caixas devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e repetições. Dois pintos de cada caixa (repetição por tratamento) foram selecionados aleatoriamente e pesados individualmente em balança eletrônica, com sensibilidade de 0,001kg (Toledo® 9094) para obtenção do peso médio.

4.1.1.2 Comprimento do pintinho (cm)

Todos os pintinhos de cada tratamento foram medidos por uma régua considerando a ponta do bico até o dedo do membro inferior direito (a escolha do membro inferior é de acordo com o avaliador, portando todos os animais tiveram as medidas pela perna esquerda) desconsiderando a unha (Figura 15).



Figura 15 – Análise do comprimento de pintinho. Arquivo pessoal

4.1.1.3 Escore de umbigo

Cada pintinho por tratamento foi classificado quanto à cicatrização do umbigo, onde receberam escores: escore 1- umbigo fechado e área do umbigo limpa; escore 2- botão negro até 2 mm no umbigo ou presença de fio negro; escore 3- botão negro maior que 2 mm ou umbigo aberto.

5.1.1.4 Parâmetros fisiológicos dos pintos de um dia

Para avaliar o status fisiológico dos pintos de um dia, as mesmas amostras de 28 pintos por tratamento foram utilizadas. Os pintinhos foram eutanasiados por deslocamento cervical e as amostras de sangue coletadas. Oito amostras de cada tratamento foram coletadas para a produção de soro e 20 amostras para a separação do plasma. Imediatamente após a coleta, para a separação do soro ou plasma, as amostras de sangue foram acondicionadas em tubos tipo Vacutaner®, sendo que aqueles tubos destinados a coleta de plasma eram heparinizados. Em seguida as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade de 3000rpm. As alíquotas com soro ou plasma foram transferidas através de micropipetas para novos tubos *ependorff* devidamente identificados de acordo com os tratamentos e foram conservadas a -20°C até ser iniciado o processamento das amostras.

As determinações de Glicose¹, lactato², ácido úrico³, triglicerídeos⁴ (medidos no plasma e soro), albumina⁵, colesterol total⁶ e suas frações colesterol HDL⁷, LDL⁸ e VLDL⁹ (medidos no soro), foram realizadas em espectrofotômetro modelo GT 7220 da marca GlobalTechnology, utilizando-se kits comerciais em comprimento de onda apropriados.

¹ Glicose K082. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

² Lactato K084. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: UV enzimático.

³ Ácido úrico K139. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

⁴ Triglicérides K117. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

⁵ Albumina K040. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico.

⁶ Colesterol total K082. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico

⁷ Colesterol HDL enzimático K015. Bioclin. Belo Horizonte, MG, BR. Metodologia: Enzimático colorimétrico

^{8, 9} Para a determinação das concentrações do Colesterol VLDL e LDL foram calculadas segundo a equação de Friedewald descrito na bula do ⁷ Colesterol HDL Enzimático, onde:

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicérides} / 5$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

4.1.1.5. Peso dos órgãos e Peso do pinto sem o saco vitelino

Os mesmos pintos que foram amostrados para análises sanguíneas, tiveram seus órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago, intestinos, bursa, baço e saco vitelino) coletados para que pudessem ser pesados individualmente em balança analítica de 0,001g (Figura 16). A abertura da cavidade abdominal se iniciou pelo orifício umbilical com exposição de todos os órgãos. Primeiramente se retirou o saco residual da gema. Os órgãos abdominais foram retirados em conjunto e depois separados, sendo coletado o fígado, o proventrículo + moela e depois os intestinos. O coração também foi coletado,

finalizando-se com a retirada dos pulmões e bursa. Esses órgãos foram expressos de forma absoluta e também de forma relativa em relação ao peso do corpo sem o saco vitelino (YFBM – yolk free body mass), que foi obtido pela subtração entre o peso do pinto e o peso do saco vitelino residual. O percentual de saco vitelino residual foi obtido em relação ao peso corporal.



Figura 16 – Órgãos separados para pesagem individual. Arquivo pessoal

5. Análise Estatística

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, onde na incubação a bandeja com 96 ovos era considerado a repetição. Para as análises de bioquímica sérica (glicose, ácido úrico, lactato, albumina) foram utilizadas 20 repetições por tratamento, as análises de triglicerídeos, colesterol total e suas frações (HDL, LDL e VLDL) foram utilizados 8 repetições por tratamento, sendo o pinto a repetição. Para as análises de

peso dos órgãos foram utilizados 28 animais por tratamento. Nas análises de rendimento de incubação, os ovos foram considerados a repetição.

Os dados normais e homogêneos foram submetidos às análises de variância e as médias comparadas pelo teste de F.

As variáveis foram analisadas com o procedimento MIXED do pacote de software SAS 9.2 (SAS Institute, 2009). Foi realizada a análise de Variância (ANOVA) em todos os procedimentos. O modelo utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu_i + \text{TRAT}_j + e_{ijkl},$$

Onde μ é a média geral, TRAT_i é o tratamento usado (CONTROLE e VACINA) e e_{ijkl} , é o erro. As medias foram obtidas por meio do LSMEANS. Para todas as variáveis foi considerado efeito significativo com o valor de probabilidade em $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados relativos ao peso dos ovos e seus componentes, seu peso específico e espessura da casca encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Composição, peso específico dos ovos e espessura da casca de matrizes de corte com 35 semanas de idade, utilizados em ambos os tratamentos do experimento

Variáveis	Ovos controle	Ovos a serem vacinados <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Peso ovo (g)	64.89	64.91	0.32	0.975
Peso da gema (g)	17.85	17.53	0.11	0.188
Peso do albumen (g)	41.68	42.13	0.24	0.367
Peso da casca (g) ¹	5.39	5.31	0.05	0.471
Peso específico (g/ml H ₂ O)	1.080	1.081	0.01	0.213
Espessura da casca (mm) ¹	360.81	372.41	3.59	0.107

n= 40 por tratamento. Sem membranas¹.

Não houveram diferenças significativas ($P > 0,05$) em nenhuma das variáveis analisadas. Como nesta fase os ovos ainda não haviam sido incubados, a apresentação destes resultados demonstra que houve uniformidade da amostra retirada nos galpões de mesma idade das galinhas. Uma desigualdade na proporção dos componentes dos ovos

entre os tratamentos comprometeria de forma expressiva a fisiologia da incubação, visto que casca, gema e albúmen são substratos para as reações bioquímicas responsáveis pelo desenvolvimento e eclosão do pintinho (ROMANOFF e ROMANOFF, 1949; NASCIMENTO e SALLE, 2003; VIEIRA, 2007; MORAN, 2007; NANGSUAY, 2016). A análise de peso específico e espessura da casca são indicadores da qualidade do ovo. Na prática dos incubatórios industriais é preconizado como meta que os ovos incubáveis tenham valores de peso específico ≥ 1.080 (ROQUE e SOARES, 1994), o que corresponde aos resultados encontrados neste experimento. Os valores médios do peso do ovo e seus componentes também estão de acordo com a literatura para esta idade da matriz (NANGSUAY et al., 2011, 2015a, 2015b, 2016) assegurando a natureza da matéria-prima empregada no experimento. Um outro fator a ser considerado é que, para os estudos em incubação artificial, aconselha-se a utilização de ovos após a primeira coleta do dia, garantindo assim a padronização do período de postura e evitando que a amostra contenha ovos que por ventura foram postos no dia anterior, pois as mesmas podem ter seu estágio de desenvolvimento embrionário modificado pelo período e/ou temperatura no galpão.

Tabela 2- Parâmetros do rendimento de incubação de ovos submetidos ou não ao processo de vacinação *in ovo*

Variáveis (%)	Incubação controle	Incubação com vacinação <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Perda de peso	11.96	11.88	0.33	0.904
Fertilidade	99.03	98.43	0.24	0.226
Eclosão de ovos férteis	91.74	90.98	0.56	0.568
Mortalidade embrionária total ¹	8.25	9.01	0.56	0.568
Mort. embrionária inicial (0 - 7d) ¹	4.35	3.48	0.42	0.314
Mort. embrionária média (8 - 18d) ¹	1.95	2.58	0.36	0.402
Mort. embrionária final (19 - 21d) ¹	1.20	1.36	0.21	0.717
Bicados ¹	0.52	1.57	0.25	0.035
Mort. embrionária final + bicados ¹	1.72	2.94	0.29	0.038

¹Expressos em percentagem de ovos férteis (n= 14 bandejas com 96 ovos incubados por tratamento).

De acordo com a Tabela 2, a perda de peso dos ovos durante os 18 primeiros dias de incubação foi semelhante para os dois tratamentos ($P > 0,05$). Tullett (1990) e Meijerhof e Van Beek (1993) relataram que a perda de peso dos ovos no período entre o

início da incubação e a transferência para o nascedouro é importante para permitir aumento da câmara de ar. Segundo Salazar (2000), no momento em que o pinto realiza a bicagem interna, necessita encontrá-la em tamanho adequado para efetuar com êxito a transição da respiração corioalantóidea para pulmonar. Os pesquisadores citados afirmaram que, ovos que perdem cerca de 11 a 12% de seu peso inicial têm melhores índices de eclosão e os valores obtidos no presente experimento encontram-se nesta faixa. Como esta variável foi mensurada antes que a vacinação *in ovo* fosse realizada, a adequação deste parâmetro é um indicativo de que os ovos dos diferentes tratamentos foram incubados em ambiente controlado e homogêneo, principalmente no que se refere à umidade relativa do ar.

A eclodibilidade sobre os ovos férteis não foi afetada pela vacinação *in ovo* (tabela 2). Sharma e Burmester (1982) relataram não haver diferenças significativas ($P>0,05$) em eclodibilidade quando compararam embriões vacinados *in ovo* manualmente contra Marek HVT aos 18 dias de incubação e não vacinados (70% x 66%, respectivamente). Da mesma forma, Stone et al. (1997) também não verificaram queda de eclosão ($P>0,05$) ao inocular manualmente vacinas contra a Doença de NewCastle e Influenza Aviária. Porém, em 1995, Sharma et al. utilizaram em três experimentos o método de vacinação *in ovo*, inoculando uma vacina bivalente contra a doença de Marek por meio de vacinadora mecânica e em escala comercial. Os pesquisadores encontraram maior eclodibilidade (85,80%) para ovos não vacinados e 85,23% de eclodibilidade para ovos vacinados, sendo estes diferentes estatisticamente ($P<0,05$). Os autores não esclareceram o motivo da queda de eclodibilidade causada pela vacinação *in ovo*. Em nosso estudo, as variáveis mortalidade embrionária total, mortalidade inicial, média e final não foram distintas estatisticamente ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 2). Porém, o percentual de ovos bicados foi elevado quando a vacinação *in ovo* foi utilizada ($P\leq 0,05$). Nota-se que, quando o percentual de ovos bicados foi somado à mortalidade final, esta também apresentou-se maior ($P\leq 0,05$) quando comparada ao tratamento controle.

Ao observar-se a curva de eclosão de ambos os tratamentos (Figura 1 e 2), verifica-se um desvio-padrão mais elevado no tratamento onde ocorreu o processo de vacinação, evidenciando uma maior dispersão do nascimento. Molennar et al. (2010)

investigaram os efeitos que um orifício realizado na casca do ovo na região da câmara de ar poderiam causar sobre o desenvolvimento perinatal de poedeiras. Foi constatado maior duração do período entre a bicagem interna e externa da casca ($P \leq 0,05$) em ovos que possuíam o orifício quando comparado aos ovos controle. De acordo com os pesquisadores, o furo realizado na casca promoveu maior pressão de O_2 na câmara de ar e consequentemente o estímulo para a bicagem externa diminuiu, visto que este é dado principalmente pela hipóxia causada no embrião nos momentos finais da incubação. Considerando que o processo de vacinação *in ovo* perfura a casca na região da câmara de ar, pode-se inferir que esta técnica pode ocasionar uma maior troca de gases entre o embrião e o meio ambiente. Com o aumento da disponibilidade de oxigênio, os embriões podem ter prolongado o momento da bicagem externa e eclosão. Avaliando o maior percentual de pintos bicados e a dispersão de nascimento do presente experimento, associada à queda de eclosão relatada nos estudos que utilizaram a vacinação *in ovo* em escala comercial, pressupõe-se que uma das razões da diminuição da eclosão nestes estudos seria o momento inadequado da retirada dos ovos dos nascedouros, pois o processo de vacinação *in ovo* pode prolongar o processo de nascimento.

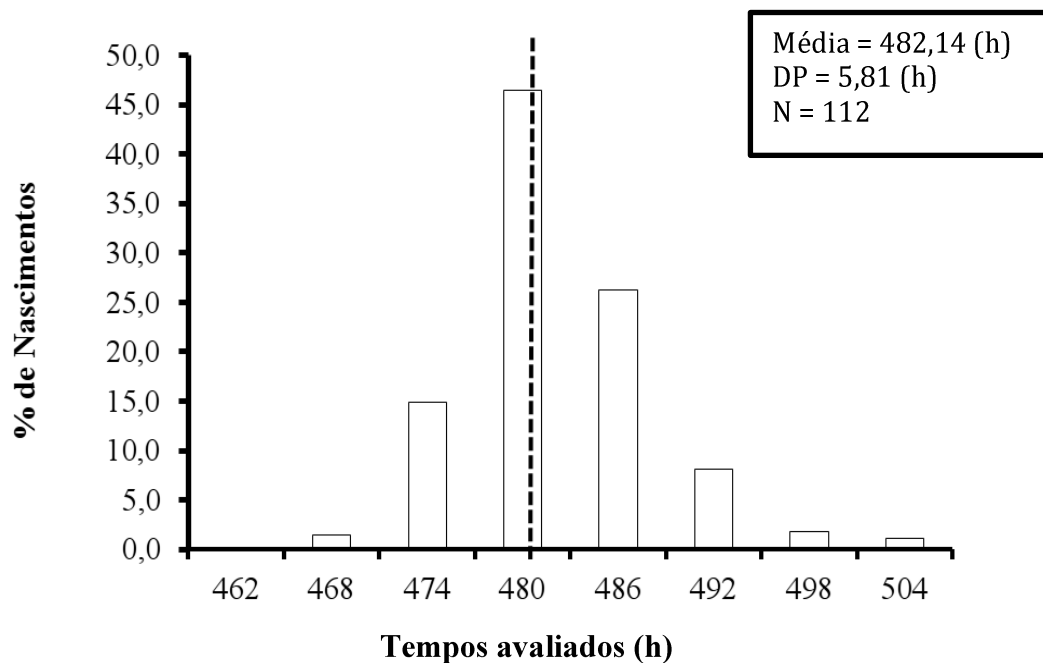


Gráfico 1- Dispersão de eclosão de acordo com o tempo de nascimento do tratamento controle

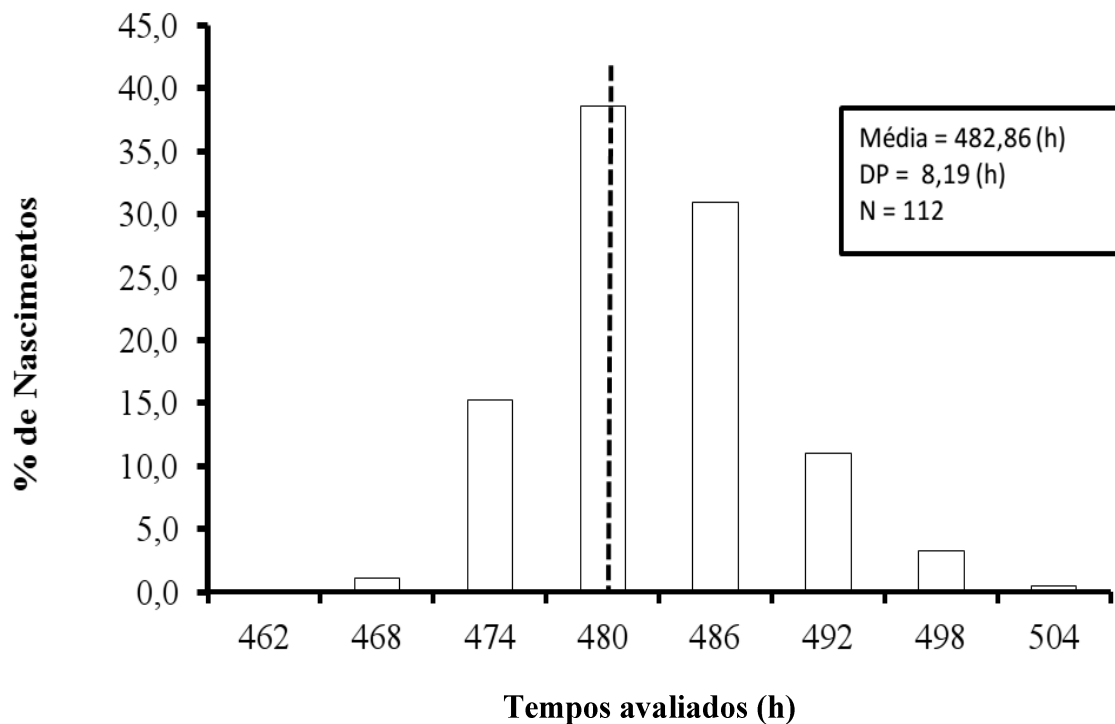


Gráfico 2 - Dispersão de eclosão de acordo com o tempo de nascimento do tratamento Vacina *in ovo*

Alguns parâmetros relacionados ao desenvolvimento embrionário são analisados para a caracterização de uma eclosão de pintos de qualidade. Entre elas, encontram-se o peso do pinto sem o saco vitelino, o comprimento do pinto e o score de umbigo. Nangsuay et al. (2011) explicaram que o YFBM é uma variável mais fidedigna quando comparada ao peso bruto do pintinho, pois representa o que realmente foi convertido de nutrientes pelo embrião em massa corporal a partir do saco vitelino.

O comprimento do pintinho é um método prático para prever o desenvolvimento do recém-eclodido porque está relacionado positivamente à massa corporal livre de gema na ocasião do nascimento (HILL, 2002). Pesquisas têm demonstrado que a vantagem de 1 cm a mais no comprimento do pintinho no dia do nascimento pode resultar em 264 gramas a mais em peso corporal com 45 gramas a mais na produção de carne de peito ao 38º dia de idade (MOLENAAR et al., 2008).

Tabela 3- Parâmetros de qualidade de pintos recém-eclodidos não vacinados ou vacinados *in ovo*

Variáveis	Pintos controle	Pintos vacinados <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Peso do pinto (g)	39.86	39.09	0.26	0.151
YFBM (g)	37.90	37.20	0.23	0.146
SV (g)	2.17	1.86	0.10	0.136
Comprimento (cm)	18.75	18.80	0.05	0.672
Qualidade de umbigo ¹	1.89	1.51	0.06	0.001

YFBM (peso do pinto sem o saco vitelino – yolk free body mass); SV (saco vitelino residual). ¹ Condição de umbigo, onde: 1= boa, 2= moderada, 3= ruim.

Outro fator relevante é que um pinto bem desenvolvido também tem normalmente um umbigo limpo e fechado. Segundo Meijerhof (2006, 2009), quando o umbigo não está perfeitamente cicatrizado, o risco de uma infecção do saco vitelino residual aumenta, o que pode ser prejudicial para o recém-eclodido.

Os resultados da Tabela 3 demonstram que pintos vacinados *in ovo* tiveram seu peso médio, peso do pinto sem o saco vitelino, peso de saco vitelino residual e comprimento semelhantes aos não vacinados ($P > 0,05$), indicando que a técnica de vacinação *in ovo* não prejudica a qualidade do pintinho. Además, a qualidade do umbigo foi mais elevada nos pintos que passaram pelo processo de vacinação *in ovo* ($P \leq 0,001$). Sharma et al. (1995) observaram que o índice de refugagem foi menor ($P \leq 0,05$) quando a vacinação *in ovo* foi realizada (0,39% para não vacinados x 0,28% para vacinados), porém os autores não identificaram uma razão para tal resultado. Devido ao fato de que o furo na casca durante a vacinação *in ovo* pode aumentar a disponibilidade de oxigênio para o embrião, é possível que pintos vacinados tenham maior tempo para o fechamento da cavidade abdominal até que haja o estímulo para eclosão.

Tabela 4- Peso de órgãos em valores absolutos(g) e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino (%) de recém-eclodidos que foram submetidos ou não à vacinação *in ovo*

Variáveis	Pintos controle	Pintos vacinados <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Coração (g)	0.33	0.30	0.006	0.011
Coração (%)	0.008	0.008	0.001	0.121
Fígado (g)	1.19	1.11	0.01	0.025
Fígado (%)	0.03	0.03	0.001	0.091
Estômago (g)	3.06	3.08	0.042	0.852
Estômago (%)	0.08	0.083	0.001	0.088
Intestino (g)	2.25	2.25	0.003	0.948
Intestino (%)	0.06	0.06	0.001	0.395
Pulmão (g)	0.34	0.32	0.005	0.025
Pulmão (%)	0.009	0.008	0.001	0.197
Baço (g)	0.015	0.014	0.001	0.726
Baço (%)	0.001	0.001	0.001	0.691
Bursa (g)	0.042	0.043	0.001	0.737
Bursa (%)	0.001	0.001	0.001	0.478

n=28. Pesos relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino.

Na tabela 4 encontram-se os resultados de peso de órgãos em valores absolutos e relativos ao peso do pinto sem o saco vitelino de recém-eclodidos que foram submetidos ou não à vacinação *in ovo*. Não foram encontrados na literatura experimentos semelhantes ao presente estudo que avaliaram o desenvolvimento de órgãos durante a incubação. O peso absoluto do coração, fígado e pulmão foram estatisticamente inferiores ($P \leq 0,05$) nos pintos onde a técnica de vacinação *in ovo* foi empregada. Molennar et al. (2010) e Maatjens et al. (2016) sugeriram que o peso destes órgãos vitais quando reduzidos podem indicar um decréscimo no desenvolvimento corporal. Porém, os pesos relativos destes órgãos foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os tratamentos, demonstrando que a organogênese de embriões vacinados *in ovo* não foi alterada no que diz respeito aos órgãos avaliados. As demais variáveis referentes aos órgãos dos pintinhos também não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 5- Parâmetros sanguíneos de pintos recém-eclodidos não vacinados ou vacinados *in ovo*

Variáveis	Pintos controle	Pintos vacinados <i>in ovo</i>	SEM	P-valor
Glicose (mmol/l)	7.75	7.12	0.09	0.001
Lactato (mmol/l)	0.47	0.49	0.03	0.819
Ácido úrico (mmol/l)	0.38	0.31	0.01	0.023
Albumina (mg/dL)	0.88	0.72	0.02	<.0001
Triglicérides (mg/dL)	13.89	16.09	0.77	0.160
Colesterol total (mg/dL)	173.97	208.40	4.46	<.0001
VLDL (mg/dL)	2.77	3.22	0.15	0.160
LDL (mg/dL)	175.37	116.40	8.48	<.0001
HDL	41,03	56,31	2.79	0.002

Valores $p < 0.05$.

Os níveis de glicose no sangue foram influenciados ($p \leq 0,05$) pelo processo de vacinação *in ovo* de acordo com os dados apresentados na tabela 5. Esses valores podem ser justificados pela menor demanda por glicose para o tratamento *in ovo*. Esse fato pode estar relacionado ao aporte de oxigênio que foi maior para os pintinhos vacinados. Dessa forma, esses pintos conseguiram manter sua demanda energética no terço final da incubação, por meio da eficiência na transferência de energia do saco vitelino pela via da β -oxidação. Romanoff e Romanoff (1949) e Maatjens et al. (2014) declararam que os valores de glicose circulantes são comumente baixos em pintinhos logo após a eclosão, e essa ocorrência é causada pela baixa concentração de glicose no ovo. Dessa maneira, o aumento no valor de glicose sanguínea para pintos controle, que tiveram acesso limitado ao oxigênio, podem indicar a utilização de outras vias metabólicas para obtenção de glicose, como por exemplo, a glicogenólise, gliconeogênese e glicólise anaeróbica. Portanto, as reservas de glicogênio que foram acumuladas durante a incubação no coração, fígado e músculo, podem ter contribuindo primariamente para a liberação de glicose para a corrente sanguínea (FOYE et al., 2007). Nangsuay et al. (2015), pesquisando diferenças na disponibilidade de nutrientes do ovo, desenvolvimento e metabolismo de embriões de frangos e poedeiras encontraram valores médios de 10,94 mmol/L de glicose, às 6 horas após o nascimento, que foram superiores ao encontrados no nosso trabalho. Maatjens et al., 2016, avaliando o efeito de diferentes temperaturas da casca do ovo durante a fase de incubação (36,7; 37,8 ou 38,9 ° C) e duas concentrações de CO₂ (0,2 ou 1%) sobre os efeitos da fisiologia dos embriões de

galinha, relataram valores médios de 7,90 mmol/L de glicose, que corroboram com esta pesquisa.

Os níveis de lactato não diferiram estatisticamente entre os tratamentos ($P > 0,05$). Porém nas variáveis ácido úrico ($P < 0,023$) e albumina ($P < 0,0001$) os valores foram alterados entre os pintos do grupo controle e os vacinados *in ovo*. Essas variáveis indicam modificações do metabolismo proteico, visto que, no final da incubação a alta demanda por energia faz com que os embriões esgotem suas reservas de glicogênio, e conseqüentemente, comecem a metabolizar as proteínas musculares para a produção de energia. Os maiores valores de albumina e ácido úrico foram encontrados para o grupo controle. Esses resultados podem estar aliados ao fato de que, os pintos desse grupo não foram eficientes em metabolizar os lipídeos provenientes do saco vitelino para suas demandas energéticas, devido ao estado de hipóxia que estes se encontravam. Além disso, é possível que as vias de gliconeogênese e glicogenólise não foram suficientes para obtenção de energia.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para a variável de triglicerídeos ($P > 0,160$) e VLDL ($P > 0,160$). Apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, os valores numéricos encontrados para estas variáveis, demonstram que houveram concentrações elevadas de TGA no sangue dos pintos vacinados *in ovo*. Essa resposta está intimamente correlacionada ao fato de que esses pintinhos podem ter sido mais eficientes em mobilizar os TGA no final da incubação, para a demanda energética nessa fase. Ao observar os valores encontrados para o tratamento de pintos vacinados *in ovo*, o Colesterol total ($P < 0,0001$) e HDL ($P < 0,002$) apresentaram valores superiores em relação ao tratamento controle, demonstrando dessa forma, a maior utilização dos lipídeos para a produção de energia. Além disso, altos valores de LDL ($P < 0,0001$) foram observados no sangue de pintos controles.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando o processo de incubação é controlado, a vacinação *in ovo* não provoca alterações na organogênese e eclodibilidade dos pintos, além de melhorar a qualidade de umbigo dos recém-eclodidos.

Os parâmetros sanguíneos indicaram que o maior aporte de O₂ causado pela perfuração da casca na vacinação *in ovo* pode ter proporcionado uma otimização da eficiência de utilização de energia por meio dos lipídeos da gema e menor degradação protéica. As principais vias metabólicas utilizadas pelo embrião na fase perinatal necessitam ser melhor investigadas para a implantação de outras inovações em larga escala, como é o caso da nutrição *in ovo*

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVAKIAN, A.; SINGBEIL, B.; POSTON, R.; GROSSE, D.; KLEIN, D.; WHITFILL, C. e TRIPATHY, D. Safety and efficacy of foal and pigeon pox vaccines administered *in ovo* to SPF and broiler embryos. **Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference**, p. 56-60, 1999.

BARBOSA, T. S.; MORI, C. K.; POLÔNIO, L. B.; PONSANO, E. H. G. e CIARLINI, P. C. Perfil bioquímico sérico de galinhas poedeiras na região de Araçatuba, SP. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1583-1588, 2011.

BARBOSA, V. M. Desenvolvimento embrionário. In: BARBOSA, V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. 1.ed., Belo Horizonte: FEP - MVZ, 2011. 124p. cap. 5 p. 85-124.

BEHR, S. R.; PATSCH, J. R.; FORTE, T. e BENSADOUN, A. Plasma lipoproteins change resulting from immunologically blocked lipolysis. **Journal of Lipid Research**, v. 22, p. 443-450, 1981.

BERNADINO, A. e DAGA, M. Vacinação “*in ovo*”. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NAAS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da incubação**. 3. ed., Campinas: FACTA, 2013. 465p. cap. 3.7 p.397-408.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2013. 373 p.

- BOHÓRQUEZ, D. V. M. **Nutritional influences on the ultra-structural development of the small intestinal epithelium of the perinatal turkey embryo and poul.** 2010. Tese (Doutorado) - Graduate Faculty of North Carolina State University, 2010.
- BONAMIGO, A.; SILVA, C. B. S. e MOLENTO, C. F. M. Grau de bem-estar relativo de frangos em diferentes densidades de lotação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1421-1428, 2011.
- BURGDORF-MOISUK, A.; ZICCARDI, M.; LARSEN, R. S. e HOPPER, K. Validation of lactate measurement in american flamingo (*phoenicopterus ruber*) plasma and correlation with duration and difficulty of capture. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 43, n. 3, p, 450-458, 2012.
- CALIL, T. A. C. **Pré-aquecimento: conceitos a aplicação para incubação em estágio múltiplo.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2007a.
- CAMPOS, A. M. A.; ROSTAGNO, H. S. e GOMES, P. C. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 1712-1717, 2011.
- CATALAN, A. A. S.; AVILA, V. S.; LOPES, L. L.; MONTAGNER, P.; VARGAS, G. D.; XAVIER, E. G. e ROLL, V. F. B. Perfil metabólico, hematológico e comportamental de poedeiras suplementadas com *Panax ginseng*. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 89-100, 2013.
- CHRISTENSEN, V. L.; WINELAND, M. J.; FASENKO, G. M. e DONALSON, W. E. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, p. 1729-1735, 2001.
- DECUYPERE, E.; DEWIL, E. e KUHN, E. R. The hatching process and the role of hormones. In: **Avian incubation**. Cap. 15, p. 239-256, 1991.
- DEEMING, D. C. **Avian incubation: behaviour, environment, and evolution.** Lincoln: Oxford University Press, 2002.
- DE OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z. e FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, p. 488-499, 2008.

DRACKLEY, J. K. Lipid metabolism. In D'MELLO, J. P. F. (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CABI Publishing, p. 97-102, 2002.

EVERAET, N. e DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NAAS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da incubação**. 3. ed., Campinas: FACTA, 2013. 465p. cap. 1.2 p.32-43.

FERKET, P. R. e UNI, Z. Early feeding – in ovo feeding enhances of early gut development and digestive capacity of poultry. In: european poultry conference 12th, verona. Anais. **European poultry conference**, 2006.

FERKET, P. R. Incubation and *in ovo* nutrition affects neonatal development. Proceedings of the 33^o Annual Carolina Poultry Nutrition Conference, 2006. Durham. North Carolina, 2006.

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

FOYE, O. T.; FERKET, P. R. e UNI, Z. Ontogeny of energy and carbohydrate utilisation of the precocial avian embryo and hatchling. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 18, p. 93-101, 2007.

FREEMAN, B. M. e VINCE, M. A. **Development of the avian embryo**. London: Chapman and Hall, 1974.

GAGIC, M.; St HILL, C. A. e SHARMA, J. M. In ovo vaccination of specific-pathogen-free chickens with vaccines containing multiple agents. **Avian Diseases**, v. 43, n. 2, p. 293-301, 1999.

GIAMBRONE, J. J.; DORMITORIO, T. e BROWN, B. C. Safety and efficacy of in ovo administration of infectious bursal disease viral vaccines. **Avian Diseases**, v. 45, p. 144-148, 2001.

GILDERSLEEVE, R. P.; HOYLE, C. M.; MILES, A. M.; MURRAY, D. L.; RICKS, C. A.; SECREST, M. N.; WILLIAMS, C. J. e WOMACK, C. L. Developmental performance of an egg injection machine for administration of Marek's disease vaccine. **Journal of Applied Poultry Science**, p. 337-346, 1993.

GILDERSLEEVE, R. P. e KLEIN FLUKE, D. R. In ovo technology for vaccine delivery. **The North Central Avian Disease Conference**, v. 46, p. 35-41, 1995.

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

GONZALES, E. Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico. Em: **X Congresso Nacional de Zootecnia Zootec**. Anais eletrônicos [online]. Campo Grande, 2005. Disponível em: http://www.abz.org.br/files.php?file=documentos/Elisabeth_910013612. Acesso em: 25 de jan de 2017.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J. e HARRISON, L. R. (eds): **Avian Medicine: Principles and Application**. Lake Worth, FL, Wingers Publishing, p. 223-245, 1994.

ISLAM, A. F.M. F.; WALKDEN-BROWN, S.W.; WONG, C.W.; GROVES, P. J.; BURGESS, S. K.; ARZEY, K. E. e YOUNG, P. L. Influence of vaccine deposition site on post-vaccinal viraemia and vaccine efficacy in broiler chickens following in ovo vaccination against Marek's disease. **Avian Pathology**, v. 30, p. 525-533, 2001.

JOCHEMSEN, P. e JEURISSEN, S. H. M. The Localization and Uptake of In Ovo Injected Soluble and Particulate Substances in the Chicken. **Poultry Science**, v. 81, p. 1811-1817, 2002.

JOHNSTON, P. A.; LIU, H.; O'CONNELL, T.; PHELPS, P.; BLAND, M., TYCZKOWSKI, J.; KEMPER, A.; HARDING, T.; AVAKIAN, A.; HADDAD, E., WHITFILL, C.; GILDERSLEEVE, R. e RICKS, C. A. Applications of in ovo technology. **Poultry Science**, v.76, p. 165-178, 1997.

KANEKO J. J., HARVEY J.W. e BRUSS M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6.ed. Academic Press, San Diego. 2008. 916p.

- KORNASIO, R.; HALEVY, O.; KEDAR, O. e UNI, Z. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**, v. 90, p. 1467-1477, 2011.
- LAGANÁ, C.; RIBEIRO, A. M. L.; GONZÁLEZ, F. H.D.; LACERDA, L. A.; KRATZ, L. R. e BARBOSA, P.R. Níveis dietéticos de proteína e gordura e parâmetros bioquímicos, hematológicos e empenamento em frangos de corte estressados pelo calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1783-1790, 2007.
- LOURENS A.; MOLENAAR, R.; VAN DEN BRAND, H.; HEETKAMP, M. J.; MEIJERHOF, R. e KEMP, B. Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. **Poultry Science**, v. 85, n. 4, p. 770-776, 2006.
- MAATJENS, C. M.; REIJRINK, I. A. M.; VAN DEN ANKER, I.; MOLENAAR, R.; VAN DER POL, C.W.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND, H. Temperature and CO₂ during the hatching phase. II. Effects on chicken embryo physiology. **Poultry Science**, v. 93, p. 655-663, 2014.
- MAATJENS, C. M.; VAN ROOVERT-REIJRINK, I. A. M.; ENGEL, B.; VAN DER POL, C. W.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND, H. Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic development. **Poultry Science**, v. 95, p. 956-965, 2016.
- MAATJENS, C. C. M. **Effects of temperature and CO₂ during late incubation on broiler chicken development**. 2016. 196f. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen, the Netherlands, 2016.
- MEIJERHOF, R. e VAN BEEK, G. Mathematical modelling of temperature and moisture loss of hatching eggs. **Journal of Theoretical Biology**, v. 165, p. 27-41, 1993.
- MEIJERHOF, R. Chick size matters. **World's Poultry Science Journal**, v. 22, p. 30-31, 2006.
- MEIJERHOF, R. Incubation principles: What does the embryo expect from us? Proceedings of the 20th. **Australian Poultry Science Symposium**, Australia, p. 106-110, 2009.

- MELILLO, A. Applications of serum protein electrophoresis in exotic pet medicine. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, Texas, v. 16, n. 1, p. 211-225, 2013.
- MOLENAAR, R.; REIJERINK, I. A. M.; MEIJERHOF, R. e VAN DEN BRAND, H. Relationship between hatchling length and weight on later productive performance in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 4, p. 599-604, 2008.
- MOLENAAR, R.; DE VRIES, S.; VAN DEN ANKER, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND, H. Effect of eggshell temperature and a hole in the air cell on the perinatal development and physiology of layer hatchlings. **Poultry Science** v. 89, n. 8, p. 1716-1723, 2010.
- MOLENAAR, R.; VAN DEN ANKER, I.; MEIJERHOF, R.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND, H. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration during incubation on the developmental and physiological status of broiler hatchlings in the perinatal period. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1257-1266, 2011.
- MORAN JR, E. T. Nutrition of the developing embryo and hatching. **Poultry Science**, v. 86, p. 1043-1049, 2007.
- MORITA, V. S.; BOLELI, I. C. e CARGNELUTTI FILHO, A. Hematological values and body, heart and liver weights of male and female broiler embryos of young and old breeder eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 1, p. 7-15, 2009.
- NANGSUAY, A.; MOLENAAR, R.; MEIJERHOF, R.; VAN DEN ANKER, I.; HEETKAMP, M. J. W.; KEMP, B. e VAN DEN BRAND. Differences in egg nutrient availability, development, and nutrient metabolism of broiler and layer embryos. **Poultry Science**, v. 94, p. 415-423, 2015.
- NANGSUAY, A. **Are all eggs equal? Embryonic development and nutrient metabolism in chicken eggs of different origins**. 2016. 213f. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen, NL, 2016.
- NASCIMENYO, V. P. e SALLE, C. T. P. O ovo. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da Incubação**. Jaboticabal: FACTA, 2003. p.34-50.

NEGASH, T.; AL GARIB, S. O. e GRUYS, E. Comparison of in ovo and post hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 26, n. 2, p. 76-87, 2004.

OLIVEIRA, J. E., UNI, Z., FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, p. 488-499, 2008.

OLIVEIRA, J. Zoetis lança equipamento de vacinação in ovo. 2013. Disponível em: http://agrolink.com.br/noticias/zoetis-lanca-equipamento-de-vacinacao-in-ovo_179353.html. Acesso em: 25 de jan de 2017.

OLSSON, N. Studies on the specific gravity of hens' eggs. A New Method for Determining the Percentage of shell oh Hens' Eggs. **Otto Harrassowitz**, Leipzig, G. D. R. 1934.

PRADO-REBOLLEDO, O. F.; MORALES, B. J. E.; QUINTANA, L. J. A.; GONZÁLEZ, A. M. J. e ARCE, M. J. Oxígeno adicional en incubación del pollo de engorda. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, p. 85-91, 2009.

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

ROCHA, C. e MAIORKA, A. Nutrição 'in ovo'. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NAAS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da incubação**. 3. ed., Campinas: FACTA, 2013. 465p. cap. 2.9 p.223-239.

ROMANOFF, A. L. e ROMANOFF, A. **The Avian Egg**. New York: John Wiley and Sons, 918p. 1949.

SALAZAR, A. I. El processo de incubación. **Avicultura profesional**, v. 18, p. 26-30, 2000.

SALMANZADEH, M. The effects of in-ovo injection of glucose on hatchability, hatching weight and subsequent performance of newly-hatched chicks, **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, p. 137-140, 2011.

SAKOMURA, N. K.; DA SILVA, J. H. V.; COSTA, F. G. P.; FERNANDES, J. B. K. E HAUSCHILD, L. Digestão e Absorção de Lipídeos. In: DA SILVA, J. H. V.; LIMA, R. B.; LACERDA, P. B. OLIVEIRA, A. C. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. 678p., sessão II, cap 2. p. 62-76.

SARMA, G.; GREER, W.; GILDERSLEEVE, R. P.; MURRAY, D. L. e MILES, A. M. Field safety and efficacy of in ovo administration of HVT + SB-1 bivalent marek's disease vaccine in commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 39, n. 2, p. 211-217, 1995.

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

SCHMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E. e PAULILLO, A. C. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SHAFEY, T.M.; ALODAN, M. A.; AL-RUQAIE, I.M. e ABOUHEIF, M. A. In ovo feeding of carbohydrates and incubated at a high incubation temperature on hatchability and glycogen status of chicks. **South African Journal of Animal Science**, v. 42, n. 3, p. 210-220, 2012.

SHARMA, J. M. e BURMESTER, B. R. Resistance of Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. **Avian Diseases**, v. 27, p. 134-149, 1982.

SOARES, K. R. **Efeito de diferentes níveis de proteína bruta na dieta sobre parâmetros sanguíneos, digestibilidade e desempenho de frangos de corte criados em termoneutralidade ou estresse térmico**. 2014. 151f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2014.

SOLOMON, S. E. **Egg and egg shell quality**. London: Wolfe Publishing, 149p. 1991.

SOUZA, F. M. Basic aspects of in-ovo injection in commercial hatcheries. **Hatchery Expertise Online**, n. 20, 2008.

- SPEAK, B. K. e DEANS, E. A. Biosynthesis of oleic, arachidonic and docosahexaenoic acids from their C18 precursors in the yolk sac membrane of the avian embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 138, p. 407-414, 2004.
- STONE, H.; MITCHELL, B. e 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.
- TULLETT, S. G. Science and the art of incubation. **Poultry Science**, v. 69, p. 1-15, 1990.
- UNI, Z.; SMIRNOV, A. e SKLAN, D. Pre- and post-hatch development of goblet cells in the broiler small intestine: Effect of delayed access to feed. **Poultry Science**, v. 82, p. 320-327, 2003a.
- UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. e SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, v. 82, p. 1747-1754, 2003b.
- UNI, Z.; FERKET, R. P. **Enhancement of oviparous species by in ovo feeding**. USA n. 6592878 B2, 2003.
- UNI, Z. e FERKET, P. R. Methods for early nutrition and their potential. **Poultry Science Journal**, v. 60, p. 101-111, 2004.
- UNI, Z. e FERKET, P. R. Alimentação *in ovo* – Impacto sobre o desenvolvimento intestinal, teor corporal de energia e desempenho. In: **Conferência FACTA 2010 de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 2010; Santos, São Paulo. Brasil. p. 109-119.
- UNI, Z.; FERKET, P. R.; TAKO, E. e KEDAR, O. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, p. 764-770, 2005.
- VIEIRA, S. L. e MORAN JR., E. T. Effect of egg origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. **World's Poultry Science Journal**, v. 56, p. 125-142, 1999.
- VIEIRA, S. L. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 1-8, 2007.

- WAKENELL, P. S.; BRYAN, T.; SCHAEFFER, J.; AVAKIAN, A.; WILLIAMS, C. e WHITFILL, C. Effect of In Ovo Vaccine Delivery Route on Herpes Virus of Turkeys/SB-1 Efficacy and Viraemia. **Avian Diseases**, v. 46, n. 2, p. 274-280, 2002.
- WILLIAMS, C.J. In-ovo vaccination and chick quality. **International Hatchery Practice**, v. 19, p. 7-13, 2005.
- WILLIAMS, C.J. In ovo vaccination for disease prevention. **International Poultry Production**, v. 15, p. 233-243, 2009.
- WILLIAMS, C.J. e ZEDEK, A.S. Comparative field evaluations of in-ovo applied technology. **Poultry Science**, v. 89, p. 189 -193, 2010.
- WILLIAMS, C.J. e HOPKINS, B.A. Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available in ovo injection systems. **Poultry Science**, v. 90, p. 223-226, 2011.
- WILLEMSEN, H.; KAMERS, B.; DAHLKE, F.; HAN, H.; SONG, Z.; PIRSARAEI, Z.A.; TONA, K.; DECUYPERE, E. e EVERAERT, N. High- and low-temperature manipulation during late incubation: Effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. **Poultry Science**, v. 89, p. 2678-2690, 2010.
- WILLIER, B. H. Phases in embryonic development. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 43, p. 307-317, 1954.
- WILSON, H.R. Effects of Maternal Nutrition on Hatchability. **Poultry Science**, v.76, p. 134-143, 1997.
- WINANS, R. e NEWMAN, L. Reporto field safety study for infectious bursal disease vaccine when administered by in ovo and/or via drinking water to broiler chicks. By Schering-Plough Animal Health. Elkhorn research Center, Technical article. 1997.
- YADGARI, L. e UNI, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. **Poultry Science**, v. 91, p. 444-453, 2012.
- YAHAV, S. Alleviating heat stress in domestic fowl-Different strategies. **Journal of World Poultry Science**, v. 65, p. 719-732, 2009.

YOSHIZAKI, N.; ITO, Y.; HORI, H.; SAITO, H. e IWASAWA, A. Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. **Development, Growth & Differentiation**. v. 44, p. 11–20, 2002.

ZHAI, W.; GERARD, P. D.; PULIKANTI, R. E PEEBLES, E. D. Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings. **Poultry Science**, v. 90, p. 2134-2143, 2011.

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