



**NIDIA FERNANDA GAMBOA GONZALEZ**

**NUTRIÇÃO *IN OVO*: INJEÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E AMINOÁCIDOS  
SULFURADOS EM OVOS FÉRTEIS DE FRANGO DE CORTE**

**LAVRAS – MG**

**2021**

**NIDIA FERNANDA GAMBOA GONZALEZ**

**NUTRIÇÃO *IN OVO*: INJEÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E AMINOÁCIDOS  
SULFURADOS EM OVOS FÉRTEIS DE FRANGO DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Ribeiro Alvarenga  
Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Gonzalez, Nidia Fernanda Gamboa.

Nutrição in ovo: Injeção de ácido fólico e aminoácidos sulfurados em ovos férteis de frangos de corte / Nidia Fernanda Gamboa Gonzalez. - 2021.

66 p.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): Renata Ribeiro Alvarenga.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Nutrição in ovo. 2. Expressão gênica. 3. Desempenho. I. Zangerônimo, Márcio Gilberto. II. Ribeiro Alvarenga, Renata. III. Título.

**NIDIA FERNANDA GAMBOA GONZALEZ**

**NUTRIÇÃO *IN OVO*: INJEÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO E AMINOÁCIDOS  
SULFURADOS EM OVOS FÉRTEIS DE FRANGO DE CORTE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de Julho 2021

Membro Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Membro Dra. Vanessa Avelar Silva	UFLA
Membro Dr. Edison José Fassani	UFLA
Membro Dra. Luciana de Paula Naves	UFLA
Membro Dra Camila Meneghetti	UESC

  
Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Ribeiro Alvarenga  
Coorientadora

**LAVRAS - MG**

**2021**

A Deus,  
A MARA (In memoriam),  
A Leito e minha família, por acreditarem em mim.  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade concedida para realização do Doutorado em tão renomada instituição.

Aos Professores Renata Ribeiro Alvarenga, Vanessa Avelar Silva, Márcio Gilberto Zangeronimo, Luciana Naves e Antônio Gilberto Bertechini, pela colaboração e disponibilidade.

Aos meus amigos Vanessa, Olga, Sandra, Sami (QPD), Gabriel, Bibiana, Leticia, Soraya, Yuyu pela amizade sincera que deve ser valorizada sempre.

Um agradecimento especial a Ana Patrícia, Alexandra Mendez, aos doutores Alberto Botero, Oscar Diaz, Yuliana Silva, Josimar Rincón e Miguel Cruz, por permitir que este trabalho pudesse ser concluído de forma exitosa.

Enfim, a todos que torceram, acompanharam e, de alguma forma, contribuíram para a realização dessa etapa.

Obrigada.

## RESUMO

O ácido fólico (AF) e aminoácidos sulfurados (AAS) como a metionina e a cisteína são substâncias que participam de diversos processos metabólicos do animal, favorecendo o desenvolvimento de tecidos e o desempenho zootécnico. Dessa forma, objetivou-se determinar o efeito da injeção *in ovo* de AF e AAS na expressão de genes miogênicos, desempenho, características de carcaça, peso de órgãos, parâmetros hematológicos e histologia do intestino delgado e músculo peitoral de frangos de corte. Um total de 1200 ovos férteis com peso de  $65 \pm 0,74$  g foram divididos em cinco grupos experimentais (240 ovos cada): G1 - grupo controle (ovos intactos sem inoculação); G2 - solução salina; G3 - 0,15 mg de AF; G4: 5,90 mg de L-metionina (Met) + 3,40 mg de L-cisteína (Cyst) e G5: AF (0,15 mg) + Met (5,90 mg) + Cyst (3,40 mg). A inoculação foi realizada no primeiro dia de incubação. Em cada ovo, 0,5 ml de NaCl a 0,75% foi usada como veículo. Após a eclosão, os pintinhos de cada grupo experimental foram alojados em seis boxes com 30 aves cada, as quais foram mantidas até 42 dias de idade. O AF aumentou ( $P < 0,05$ ) a expressão dos genes PAX7 e MYF5 no músculo peitoral dos pintinhos recém eclodidos ( $P < 0,05$ ) e melhorou a conversão alimentar aos 42 dias de idade. A combinação AF + AAS aumentou ( $P < 0,05$ ) o peso relativo dos órgãos linfóides e a profundidade da cripta do íleo aos 21 dias de idade. Não houve diferenças ( $P > 0,05$ ) nas variáveis hematológicas, área das fibras musculares e características de carcaça no 1º, 21º e 42º dia de idade. Conclui-se que a inoculação de 0,15 mg/ovo de AF no primeiro dia de incubação pode ser utilizado para melhorar a expressão gênica e o desempenho zootécnico dos frangos de corte. O uso de AAS nas doses testadas não deve ser utilizado nessa idade.

**Palavras-chave:** Desempenho. Expressão gênica. Histomorfometria. Miopatias.

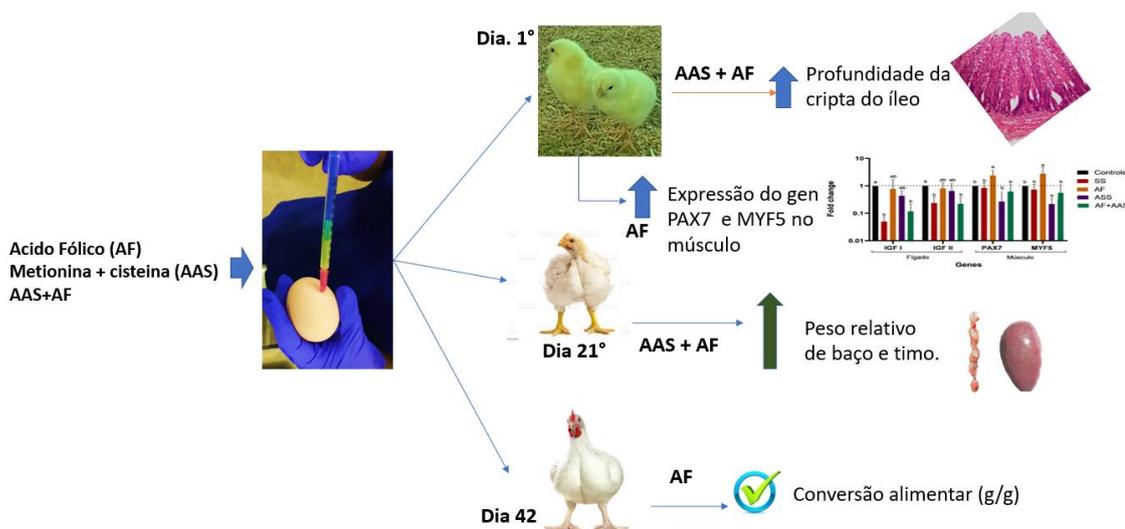
## ABSTRACT

Folic acid (FA) and sulfur amino acids (AAS) such as methionine and cysteine are substances that participate in various metabolic processes in the animal, favoring tissue development and zootechnical performance. Thus, the objective was to determine the effect of in ovo injection of FA and AAS on the expression of myogenic genes, performance and carcass characteristics, organ weight and hematological and histological parameters of the small intestine and pectoral muscle of broiler chickens at hatch and in the productive phase. A total of 1200 eggs weighing  $65^{\pm 0.74}$  g were divided into five experimental groups (240 eggs each): G1 - control group (intact eggs without inoculation); G2 - saline solution; G3 - 0.150 mg of AF; G4: 5.90 mg of L-methionine (Met 99%) + 3.40 mg of L-cysteine (cyst) and G5: AF (0.150 mg) + Met (5.90 mg) + Cistein (3.40 mg). In each injected egg, 0.5 ml of 75% NaCl was used as vehicle. After hatching, the chicks from each experimental group were housed in six boxes with 30 birds each, totaling 180 birds/group, which were kept until 42 of age. AF injection reduced ( $P < 0.05$ ) feed conversion at 21 and 42 days of age, while AF + AAS increased ( $P < 0.05$ ) the relative weight of lymphoid organs and ileum crypt depth at 21 days old. There were no differences ( $P > 0.05$ ) in hematological variables, muscle fiber area and carcass characteristics at day 1, 21° and 42° of age. Injection into fertile egg with folic acid (FA) increase the expression of PAX7 and MYF5 gene in the pectoral muscle in chicks and improve the feed conversion ratio of broilers at 42 days of age. The combination of AAS + AF benefit the relative weight of the spleen and thymus on the 21st day of life, as well as the depth of the ileum crypt on the 1st day. It is concluded that an inoculation of 0.15 mg/egg of AF on the first day of incubation can be used to improve gene expression and zootechnical performance of broiler chickens. The use of AAS at the doses tested should not be used at this age.

**Keywords:** Performance. Gene expression. Histomorphometry. Myopathies.

## RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

O período de incubação corresponde a cerca de 33% do ciclo de vida dos frangos de corte. O ovo, a única fonte de nutrição do embrião nesse momento, pode conter quantidades limitadas de nutrientes necessárias para suprir todas as necessidades de desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, a injeção de substâncias nutritivas pode ser benéfica para o adequado estado fisiológico das aves antes e após a eclosão. A inoculação da metionina e cisteína (AAS) e ácido fólico (AF) em períodos avançados da incubação como estratégias de nutrição *in ovo* tem mostrado benefícios na redução do estresse oxidativo, melhora na expressão de genes e maior tamanho das vilosidades. Entretanto, ainda existem poucos estudos que contemplam o efeito da injeção destas substâncias no ovo fértil antes do início do processo de incubação. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da injeção *in ovo* de soluções contendo AAS e AF no desenvolvimento embrionário e nas características fisiológicas de frangos de corte. Observou-se que a injeção *in ovo* de AF favoreceu a expressão dos genes PAX7 e MYF5 no músculo peitoral e a conversão alimentar aos 42 dias de idade e a combinação do AF e AAS melhorou a profundidade de cripta no íleo no 1º dia e o tamanho do timo e baço aos 21 dias pós-eclosão. Por outro lado, a injeção de AAS no primeiro dia de incubação não alterou os parâmetros avaliados. Esses achados representam uma base para estudos futuros em relação ao uso de outras concentrações e ao tempo ideal para a inoculação das substâncias.



A inoculação de 0,15 mg/ovo de AF no primeiro dia de incubação pode ser utilizado para melhorar a expressão gênica e o desempenho zootécnico dos frangos de corte. O uso de AAS nas doses testadas não deve ser utilizado nessa idade..

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química dos aminoácidos sulfurados.....	17
Figura 2 Rota metabólica da metionina.....	18
Figura 3 Ciclo do ácido fólico.....	20
Figura 4 Processos de ativação, proliferação e diferenciação de células-satélite.....	23

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Composição de aminoácidos por ovo.....	15
tabela 2 Composição de vitaminas do ovo .....	16

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. Revisão de literatura .....	13
2.1 Regulação do desenvolvimento embrionário .....	13
2.2 Composição nutricional do ovo .....	14
2.3. Aminoácidos sulfurados .....	16
2.4 Acido fólico .....	19
2.5 Regulação do crescimento muscular .....	21
3. Considerações finais .....	24
Referências .....	25
SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....	34
Injeção <i>in ovo</i> com aminoácidos sulfurados e ácido fólico: expressão gênica, desempenho, peso relativo de órgãos e parâmetros hematológicos em frangos de corte.....	34

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola está em constante evolução passando por mudanças significativas nas áreas de nutrição, manejo, genética e sanidade. Segundo Zuidhof *et al.* (2014), no período de 1957 a 2005, houve um aumento de 400% no crescimento e desenvolvimento corporal do frango de corte. Esse rápido desenvolvimento das aves somado à redução do tempo de abate faz com que o período de incubação seja considerado relativamente importante, passando a representar cerca de 33% de seu ciclo de vida. O ovo, sendo a única fonte de nutrição do pintinho, é composto *in natura* por, aproximadamente, 52% de proteína bruta, 33% de lipídios, 5,0% de cinzas além dos carboidratos, minerais e vitaminas que devem suprir todas as necessidades de desenvolvimento embrionário da ave.

Uma estratégia que pode apoiar o desenvolvimento embrionário de aves é o uso da alimentação *in ovo* com nutrientes como aminoácidos, carboidratos e vitaminas. O uso dessa tecnologia tem demonstrado que a injeção de nutrientes afeta positivamente o estado fisiológico dos embriões de frangos de corte antes e após a eclosão e, conseqüentemente, a qualidade da proteína que chegará até o consumidor final.

Os aminoácidos sulfurados como a metionina e a cisteína desempenham um papel crucial na estrutura proteica, metabolismo, imunidade e estado oxidativo, além de exercer funções importantes através de seus metabólitos. Já o ácido fólico (AF) possui diversas funções no metabolismo, dentre elas a participação na rota da metilação e síntese de DNA, importante para preservar a homeostase. Tem-se observado que a suplementação *in ovo* com essa vitamina reduz o desenvolvimento embrionário anormal, reverte alterações epigenéticas que causam distúrbios e favorece a resposta imune. No entanto, embora os AAS e o AF possam influenciar a fase embrionária, poucas pesquisas têm sido realizadas avaliando o efeito da inoculação destas substâncias no início do desenvolvimento embrionário. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da injeção de AF e AAS no ovo fértil sobre a expressão de genes miogênicos, desempenho e características de carcaça, peso de órgãos, parâmetros hematológicos e histologia do intestino delgado e músculo peitoral de frangos de corte após a eclosão e durante a fase produtiva.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Regulação do desenvolvimento embrionário

Diferentemente do que ocorrem em mamíferos, nas aves, o desenvolvimento embrionário ocorre fora do organismo materno. Nesse sentido, a composição nutricional do ovo é importante uma vez que este irá suprir as necessidades dos embriões durante o período de incubação (GONÇALVES et al., 2013).

Após a fecundação iniciam-se várias reações químicas que dependem da temperatura e da umidade. Essas reações são divididas em fases: a primeira é a clivagem, que inicia no útero da galinha especificamente na câmara da casca onde se forma o blastocele a partir dos blastômeros e os precursores dos futuros tecidos embrionários; a segunda fase é a gastrulação que também ocorre no organismo da ave e forma o eixo central do embrião, tendo início a linha primitiva e a formação dos somitos, os quais originarão os órgãos da ave até a fase adulta. Após o processo de gastrulação, o desenvolvimento embrionário pode ser dividido em quatro fases: a organogênese, na qual inicia-se a organização do sistema nervoso; morfogênese, que compreende todos os processos pelos quais diferentes partes de um sistema em desenvolvimento adquirem uma forma ou posição definitiva e se evidencia a diferenciação celular; integração funcional, onde os órgãos começam atuar de forma interligada; e a fase de maturação embrionária, que permite a formação e preparação final do pintinho para o momento da eclosão (CHRIST; ORDAHL, 1995).

O desenvolvimento do sistema muscular e o gastrointestinal inicia na organogênese. Nessa fase, os mioblastos se desenvolvem a partir de células precursoras miogênicas que são de origem mesodérmica. Esse processo inclui a determinação das células precursoras do músculo esquelético nos tecidos embrionários, a proliferação celular a diferenciação e a maturação das fibras musculares (Te Pas e Marinus, 2004). Por outro lado, durante o desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI), se desenvolvem outras estruturas que incluem as células entero endócrinas, células caliciformes, as vilosidades e as criptas, gerando finalmente um sistema que garanta a digestão e absorção dos nutrientes (TAKO et al., 2004).

A nível molecular o crescimento dos tecidos é regulado pela expressão de diferentes genes, entre eles aqueles que codificam os fatores de crescimento semelhantes a insulina 1 e 2 (IGF 1 e 2). Nas aves, o IGF-1 e IGF-2 agem como sinalizadores

endócrinos e parácrinos e são mediados pelos receptores de fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 e 2 (IGF-1R, IGF-2R) (JONES; CLEMMONS, 1995). Outros fatores que controlam o desenvolvimento de células musculares incluem os genes do fator regulador miogênico (MRF), e os atores de transcrição desta família são à família de proteínas (MyoD e Myf5) e miogenina (FERRI et al., 2009)

Os MRF e várias proteínas estruturais regulam extensivamente a reorganização do citoesqueleto, que ocorre antes e após a fusão do mioblasto. Essa regulação tem um papel central na definição da arquitetura muscular. De forma semelhante ao que acontece em mamíferos, o IGF também estimula o crescimento das células satélites as quais se ativam no momento que o desenvolvimento muscular do frango precise delas (OLIVEIRA et al., 2008).

O ácido fólico é uma vitamina chave envolvido na manutenção do DNA, A metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético que ajuda a regular a expressão gênica. Pesquisas relataram a relação entre o ácido fólico e a metilação dos genes IGF e Pax7 e Myf5 (MCMURTRY *et al.*, 1997; LEUNG, *et al.*, 2013). Por outro lado, uma das funções metabólicas dos AAS é a reação de metilação do DNA. De fato, tem-se observado que a inoculação *in ovo* de AAS favorece a expressão dos genes IGF (ELWAN et al., (2019).

## 2.2 Composição nutricional do ovo

Como descrito previamente, o desenvolvimento do embrião está limitado ao conteúdo nutricional do ovo, cuja composição é dependente da alimentação, da genética e da idade da matriz (BURNHAM et al., 2001). Cada ovo fértil contém aproximadamente 52% de proteína, 33,0% de extrato etéreo e 4,8% de carboidratos (VIEIRA; MORAN, 1998). Por tanto, a composição nutricional do ovo influencia diretamente o desenvolvimento, a qualidade e o desempenho do pintinho após a eclosão (UNI et al., 2012).

O ovo é composto pela casca, que além de participar como barreira física e antibacteriana, fornece minerais como o cálcio, magnésio, fósforo, cobre, zinco, manganês e ferro, importantes nutrientes nos estágios da embriogênese (TULLETT, 1990). A gema representa a principal fonte de lipídeos, compostos por 65% de triglicerídeos, 23,3% de fosfolipídios (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e 5,2% de colesterol (PRIVETT et al., 1962). Por outro lado, o albúmen fornece ao embrião, água,

proteínas e minerais (ROBERTS, 2004). Dentre as proteínas, as mais importantes são a ovo albumina, que atua como fonte de aminoácidos; a ovotransferrina que age como queladora de ferro que previne o crescimento bacteriano no ovo; a ovo mucoide, uma proteína é inibidora de proteases; as ovo globulinas G2 e G3, proteínas que atuam como inibidores de proteases, além de possuírem capacidade para quelatar minerais e inibir a proliferação microbiana; a lisozima, que contém atividade antimicrobiana especificamente para gram-negativas; e as ovo mucinas  $\alpha$  e  $\beta$ , responsáveis por manter a característica de gel do albúmen importante para o evitar a proliferação microbiana (SUGINO et al., 2018).

No período de desenvolvimento embrionário, todos os aminoácidos são essenciais e a ausência de qualquer um deles causa comprometimento da síntese proteica e distúrbios da homeostase do embrião, o que resulta em um prejuízo no crescimento e metabolismo do organismo (KUCHARSKA-GACA et al., 2017). Com relação à composição de aminoácidos presentes no ovo, especialmente a metionina é um aminoácido que pouco tem mudado no decorrer dos anos o que pode ser causa da inovação genética e nutricional das galinhas como pode-se observar na tabela 1.

Tabela 1 Composição de aminoácidos no ovo 100 gramas.

<b>Aminoácido</b>	Munks et al (1945)	Lewis et al. (1950)	Kunachowicz et al. (1998)	Werenska e Okruszek, (2011)
Treonina	3,9	4,0	4,7	4,7
Cisteína	2,2	-	-	-
Metionina	5,2	5,4	5,9	5,9
Fenilalanina	5,8	7,5	9,8	9,6
Lisina	5,2	6,4	6,3	6,3
Histidina	2,0	2,41	-	-
Arginina	6,4	5,9	-	-
Triptofano	1,4	-	1,5	0,7

Fonte: Adaptado de Kucharska et al. (2017)

A composição de vitaminas presentes no ovo, e mais precisamente, na gema, contém grande quantidade de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e vitaminas hidrossolúveis (tiamina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico e cobalamina), enquanto a clara possui grandes quantidades de vitaminas riboflavina, niacina, ácido

pantotênico, ácido fólico entre outras vitaminas do complexo B (TABELA 2) (RÉHAULT-GODBERT et al., 2019).

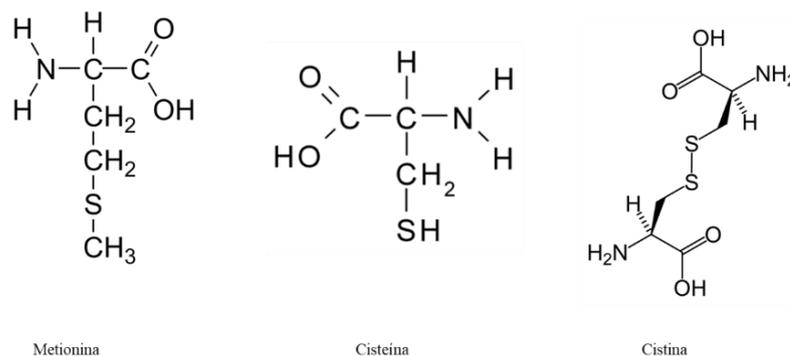
Tabela 2 Composição de vitaminas do ovo 100 gramas.

Vitaminas	Seuss-Baum. - 2007	Réhault-Godbert, et al. (2019)	Czarnowska-Kujawska, et al. (2021)
Colecalciferol	2,9	2	-
Tocoferol	2000	1050	-
Menadiona	0,48	0,3	-
Tiamina (B1)	176	40	-
Ácido pantotenico (B5)	2990	1533	-
Piridoxina (B6)	120	170	-
Biotina (B8)	25	16,5	-
Ácido fólico (B9)	65	47	78,5
Cobalamina (B12)	1,9	0,9	-

### 2.3. Aminoácidos sulfurados

Existem cerca de 300 aminoácidos (AA) na natureza, no entanto, do ponto de vista nutricional, apenas 20 compõem as proteínas, dos quais nove são considerados dieteticamente essenciais (BERTECHINI, 2013). Os AA regulam o crescimento celular e participam da síntese de porfirinas, pirimidinas e ureia (CONDE-AGUILERA et al., 2013). Os aminoácidos sulfurados (AAS), em particular, são aqueles que contêm dentro de sua estrutura átomos de enxofre (FIGURA 1) (WU, 2009) e são de grande relevância para a nutrição animal. Dentre os AAS estão a metionina, cisteína e a cistina (SANTANA et al., 2014).

Figura 1 Estrutura química dos aminoácidos sulfurados

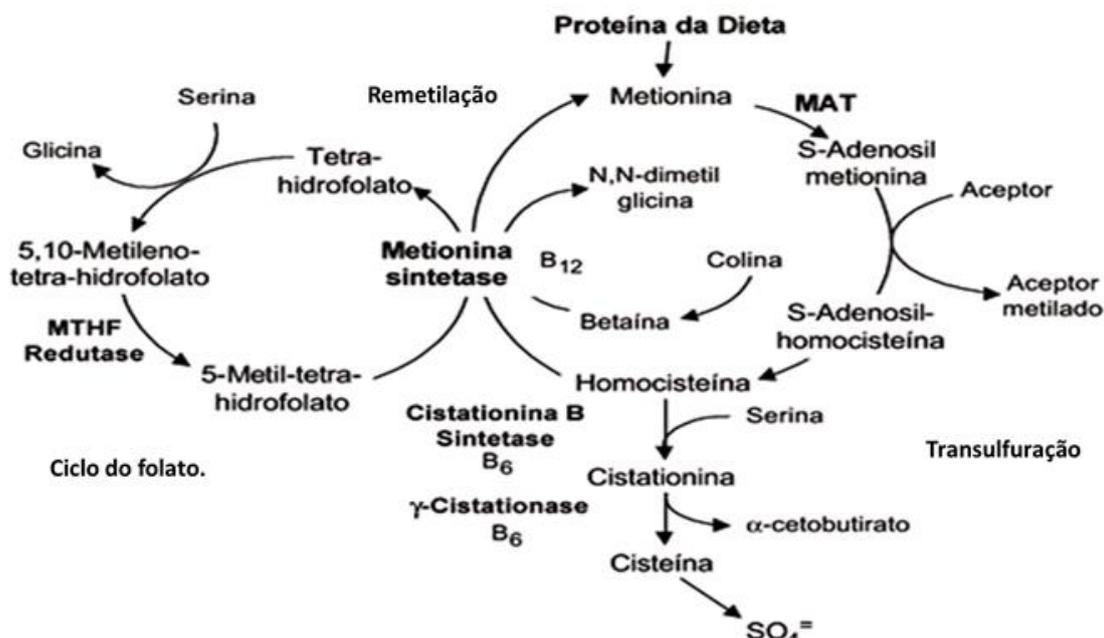


Fonte: Adaptado de Wu (2009).

Especificamente, a metionina é o primeiro AA limitante nas aves. A partir deste, pela via da transulfuração, se produz a cisteína, sendo este último considerado um aminoácido semi-essencial (TROEN et al., 2003). Os AAS desempenham um papel crucial na estrutura proteica, metabolismo, imunidade e oxidação, além de exercer funções importantes através de seus metabólitos, como S-adenosil metionina (SAM), poliaminas (Espermina e espermidina), taurina e glutatona (GSH) (TESSERAUD et al., 2008).

A rota metabólica dos aminoácidos sulfurados está apresentada na Figura 2. Além da síntese de proteínas, os aminoácidos sulfurados também participam de rotas de transulfuração para a produção de outros aminoácidos como a homocisteína, metilação de DNA (BUNCHASAK, 2009), metabolismo de lipídios e síntese da glutatona (GSH), além de favorecer a proliferação de células do sistema imune e anticorpos (MAROUFYAN et al., 2010).

Figura 2 Rota metabólica da metionina



Fonte: Bydlowski, 1998.

Ligações permanentes são formadas entre metionina e serina durante a transulfuração. Essa reação requer a enzima cistationa- $\beta$ -sintetase (CBS) e piridoxina (vitamina B6) como coenzima essencial. A homocisteína é metabolizada de volta a metionina na presença de cianocobalamina (vitamina B12). Essa re-metilação requer da presença de MTHRF (metileno-tetra-hidrofolato redutase) e quantidades suficientes de ácido fólico (Vitamina B9). A SAM coordena os processos de transulfuração e re-metilação agindo como um ativador de CBS ou um inibidor alostérico de MTHRF (EMMERT et al., 1996).

Lu et al. (2020), investigaram as mudanças metabólicas nas concentrações séricas e hepáticas da MAT durante a fase embrionária. Os autores evidenciaram que a MAT tem um comportamento ascendente significativo a partir do dia 19º de incubação e atinge sua máxima atividade ao 7º dia pós-eclosão, indicando maior demanda de AAS nessa mesma fase. Nesse contexto, o enriquecimento na fase embrionária com AAS poderia melhorar o peso das aves na eclosão, melhorar a capacidade antioxidante e o desenvolvimento de tecidos.

Por outro lado, Elwan et al. (2019) evidenciaram que a injeção de AAS em ovos embrionados aos 17 dias de incubação melhora o peso do pintinho, a histomorfometria intestinal e estimula a atividade da glutatona e a expressão dos fatores de crescimento

semelhantes à insulina (IGF). Nazem et al. (2015) observaram maior desenvolvimento do diâmetro e densidade do folículo da pena em pintinhos inoculados na fase embrionária com 50 mg de metionina por ovo, característica que pode melhorar o empenamento da ave na fase pós-eclosão.

De acordo com Mohammadrezaei et al. (2015) e Nazem et al. (2019), a injeção no saco vitelino com 40 mg de metionina na fase inicial do desenvolvimento embrionário estimula a altura e largura das vilosidades intestinais, melhorado assim a digestibilidade dos nutrientes dos pintinhos na fase pós-eclosão. Da mesma forma, Ebrahimi et al. (2018) observaram que a injeção in ovo de DL-metionina melhorou o peso relativo da carcaça, da coxa, do proventrículo e do fígado.

Além dos benefícios no desempenho, tem-se evidenciado que a inoculação de 5,90 mg de L-metionina mais 3,40 mg L-cisteína no 17º dia de incubação reduz as concentrações séricas das proteínas de choque térmico (HSP70) e corticosterona em tecidos cardíaco, fígado, músculo, rins e intestino, bem como favorece o perfil lipídico sérico nos frangos de corte recém-nascidos (ELNESR et al., 2019).

## **2.4 Ácido fólico**

O ácido fólico (AF), também conhecido como folato, ácido Pteroilglutâmico ou vitamina B9, foi isolado da levedura por Lucy Wills e Robert Stokstad em 1930. Suas principais funções são a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e a conversão de vários aminoácidos. Além disso, participa no processo de maturação de glóbulos vermelhos e na homeostase do sistema imune (BARROETA et al., 2012).

As aves necessitam AF para síntese, reparação e metilação do DNA nas fases em que acontece o crescimento acelerado de tecidos, como durante o processo embrionário. Além disso, o AF atua em associação com a piridoxina e cobalamina, controlando os níveis plasmáticos dos aminoácidos sulfurados (GOH YI et al., 2008). Para que o ácido fólico seja bioquimicamente ativo, este deve ser transformado pela enzima dihidrofolato redutase a ácido tetrahydrofolico (THF) e metiltetrahydrofolato (CH<sub>3</sub>-THF) e, posteriormente, ser transportado para as células da medula onde serão necessários para a eritropoiese e em outras funções metabólicas (GROPPER; SMITH, 2005).

As funções bioquímicas do folato podem ser divididas em duas categorias, que são a síntese de bases para incorporação no DNA e RNA e participação no metabolismo da homocisteína para formar a metionina e, posteriormente, o S-adenosil metionina



aumentou os níveis de glicose e da vitamina B9 no 1º dia pós-eclosão de frangos de corte e reduziu a quantidade de lipídios das aves aos 42 dias de idade.

A inoculação de ácido fólico (0,150 mg) em ovos embrionados no 11º dia de incubação aumentou a expressão do gene IGF-2 hepático, modulando a hipometilação do DNA e melhorando a acessibilidade da cromatina na região promotora do gene, favorecendo o crescimento embrionário e o desenvolvimento de órgãos de frangos de corte (LIU et al., 2016). De igual modo, tem-se observado que a suplementação da vitamina B9 pode reverter alterações epigenéticas que causam distúrbios no embrião (ELAD et al., 2020). No entanto, embora o folato possa influenciar na fase embrionária, poucas pesquisas têm descrito os efeitos da inoculação dessa vitamina nas diferentes fases de incubação.

Recentemente, Lu et al. (2021) investigaram o efeito da suplementação de ácido fólico (1,25 mg/kg) em dietas de matrizes sobre o metabolismo de metionina nos embriões no dia 18 de incubação. Evidenciando que a suplementação de ácido fólico beneficia o metabolismo da metionina nos embriões.

## **2.5 Regulação do crescimento muscular**

O músculo esquelético é o maior componente do corpo animal, sendo formado por milhares de fibras musculares. Essas miofibrilas podem ser de tipo II (contração rápida, glicolítica) presentes especificamente no musculo peitoral major das aves e as miofibrilas do tipo I (contração lenta, oxidativa) que compõe em maior proporção o bíceps femoral (SMITH; FLETCHER, 1988).

A formação muscular inclui duas etapas, as de formação de miofibrila (hiperplasia) e crescimento das mesmas (hipertrofia) (MOSS et al., 1968). No processo embrionário, a hiperplasia ocorre em quatro fases, que são diferenciação precursora miogênica de somitos, desenvolvimento de mioblastos, proliferação e fusão de mioblastos para formar os miotubos multinucleados e, finalmente, maturação de miotubos em miofibrilas (LUO et al., 2013). Após a eclosão ocorre a hipertrofia das miofibrilas, processo que compreende a renovação de proteínas, proliferação de células satélites, diferenciação e fusão de miofibrilas (OKSBJERG et al., 2004).

A hiperplasia das miofibrilas é uma característica complexa sendo influenciada pela regulação gênica e por condições ambientais (GE et al., 2011). Entre os fatores de regulação estão os fatores de transcrição e metilação de DNA e RNAs que são importantes

no crescimento e desenvolvimento do músculo esquelético em mamíferos e aves e dependentes dos níveis de AF e metionina (OUYANG et al., 2016, EWANG et al., 2019). Os genes miogênicos que estão envolvidos no desenvolvimento do músculo esquelético pertencem as famílias de fatores de transcrição como a miostatina (MSTN) e genes relacionados ao eixo de crescimento (Pax7, Myf5, MyoD, IGF) (SACCONE; LORENZO, 2010).

Existem vários genes relacionados ao crescimento muscular, como o receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1 e 2), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e receptor de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2), que podem afetar o desenvolvimento do músculo esquelético das aves (LUO et al., 2015). Adicionalmente, os níveis de metilação do DNA estão associados ao tamanho da fibra muscular e encontram-se elevados na fase inicial da embriogênese, diferente do que acontece com os níveis de IGF2 que diminuem nessa mesma fase (GEIMAN; MUEGGE, 2010; LI *et al.*, 2016). Por outro lado, o promotor MyoD e a miogenina promovem e facilitam a diferenciação de mioblastos, além de favorecer a transcrição de genes específicos responsáveis pela transcrição da informação muscular (LU et al., 2015).

Segundo Alami-Durante et al. (2018), os níveis de metionina no organismo podem alterar a expressão de genes que regulam pontos de transição específicos na miogênese. Dessa forma, uma redução desse aminoácido poderia regular a expressão do gene muscular e reduzir a hipertrofia da fibra musculares. Elwan et al. (2019) observaram que a inoculação *in ovo* de AAS (5,90 mg de metionina e 3,40 mg de cisteína) no dia 17º dia de incubação melhorou a expressão do IGF1 e o desenvolvimento do musculo liso dos pintinhos na eclosão.

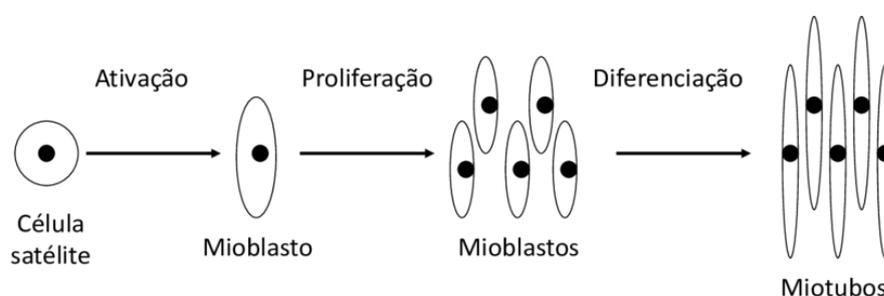
Na fase pós-eclosão, diversos fatores podem estimular o crescimento do músculo, como os fatores endócrinos cuja interação com o crescimento muscular é importante para compreender as características musculares das aves (STOCKDALE; MILLER, 1987). A hipertrofia muscular pós-eclosão depende, principalmente, da diferenciação e fusão de mioblastos (MOZDZIAK et al., 1997). A regulação desses processos a nível endócrino não está bem definida, porém, acredita-se que hormônios tireoidianos aumentados como a triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) possuem papel central na hipertrofia das fibras musculares (WILLEMSSEN et al., 2010). O IGF1 decresce no final da embriogênese e isso causa uma redução porcentual da massa peitoral nos frangos (MCMURTRY, 1998). Além disso, foi evidenciado que os

níveis circulantes de T3 diminuem quando os pintinhos são expostos a um jejum involuntário prolongado, causando um retardo nos perfis de expressão dos genes envolvidos na diferenciação e proliferação de células satélites como a miogenina (MYOG) e fator de diferenciação miogênica 1 (MYOD1), causando uma redução no crescimento muscular na primeira semana de vida da ave (PAYNE et al., 2020). Segundo Abd El-Azeem et al. (2014); a inoculação in ovo de 1mg de ácido fólico por ovo no dia 14º de incubação induz a hipertrofia dos miócitos que, por sua vez, aumentam a porcentagem de carcaça e rendimento do peito do frango corte no dia 42 de idade.

Outras estruturas histológicas importantes no desenvolvimento dos músculos são as células satélite (CS). Essas células foram descobertas inicialmente por Mauro em 1961 e se originam nos somitos na fase do desenvolvimento embrionário (GROS et al., 2005). O fator de transcrição básica específica do músculo que regula as CS é o fator de transcrição Pax7. Esse fator desempenha um papel essencial no desenvolvimento do musculo esquelético na fase pós-eclosão, tornando-se altamente expressivo após sua ativação e proliferação. Em seguida, essa expressão decresce (ZAMMIT et al., 2006).

As CS só podem ser distinguidas em estágios posteriores da embriogênese. No 14º dia de incubação elas estão presentes em baixo número, aumentando a partir do 18º dia (YABLONKA-REUVENI, 1995). Após a eclosão, as CS proliferam amplamente e depois sofrem diferenciação terminal. Esse processo ocorre até o 8º dia de vida da ave (HALEVY et al., 2004). Posteriormente, a atividade das CS diminui rapidamente e tornam-se praticamente inativas, permanecendo nesse estado até que aconteça um evento que as ative novamente (YIN et al., 2013) (FIGURA 4).

Figura 4 - Processos de ativação, proliferação e diferenciação de células-satélite



Fonte: Adaptado de Hawke, (2005).

Segundo Daughtry et al. (2017), os números das células satélites do peito do frango diminuem, bem como suas habilidades inerentes para proliferar e se diferenciar, com a idade e o tamanho da ave. Os autores relatam que, quando o músculo do peito é submetido a uma lesão, sua regeneração ocorre mais lentamente em aves maiores do que seus equivalentes menores de mesma idade. Adicionalmente, aves com maior hipertrofia muscular têm menos CS, com capacidade diminuída de função, sugerindo que a seleção agressiva para o crescimento do peito em frangos pode reduzir os *pools* de CS quando as aves crescem para pesos de processamento maiores.

Os níveis de metionina na dieta também afetam a expressão de genes estruturais musculares e de genes envolvidos na regulação do crescimento, metabolismo, inflamação e respostas ao estresse. Sendo assim, a inoculação *in ovo* com esse aminoácido poderia melhorar o desenvolvimento embrionário e o peso dos pintinhos (COŞKUN et al., 2014). Porém, o mecanismo pelo qual os pintinhos apresentam maior peso e melhor desenvolvimento muscular ainda é pouco conhecido. Além disso, Hwang et al. (2019), sugerem também que o folato pode exercer um efeito positivo no desenvolvimento do músculo esquelético nas aves. Dessa forma, a associação desses nutrientes na técnica de nutrição *in ovo* poderia beneficiar a produção de frangos de corte.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os contínuos avanços na indústria avícola, incluindo o desenvolvimento da tecnologia da nutrição *in ovo*, tem aberto uma importante oportunidade para nutrir os frangos de corte desde seu período embrionário. Nesse sentido, a injeção *in ovo* de substâncias como aminoácidos sulfurados e ácido fólico são promissoras, pois estes nutrientes participam em distintas e complementares rotas metabólicas fundamentais para os animais. Porém, ainda é necessário elucidar como estes nutrientes podem atuar nos diferentes processos fisiológicos associados ao desenvolvimento embrionário do pintinho. Mais pesquisas são necessárias para compreender como a inoculação *in ovo* destes nutrientes influencia o metabolismo, o desenvolvimento embrionário e a expressão genica no período pré-eclosão dos frangos de corte.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-AZEEM et al. Physiological and histological responses of broiler chicks to in ovo injection with folic acid or l-carnitine during embryogenesis. **Global Veterinaria**, vol. 13, no 4, p. 544-551. 2014. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.04.8523>.
- ALAMI-DURANTE et al. Effect of dietary methionine level on muscle growth mechanisms in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Aquaculture**, vol. 483, p. 273-285. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.030>.
- BARROETA, A.C et al. **Optimum Vitamin Nutrition**. 2012.
- BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogástricos**. Segunda edição. Minas Gerais: Editora UFLA, 2013.
- BORYCKI, A.G; EMERSON, C.P. Multiple Tissue Interactions and Signal Transduction Pathways Control Somite Myogenesis. **Current topics in developmental biology**. 48(C):165–224. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60757-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60757-7).
- BRAND-SABERI; CHRIST, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. **Cell and Tissue Research**. ;296(1):199–212. 1999. <https://doi.org/10.1007/s004410051281>.
- BUNCHASAK, C. Role of dietary methionine in poultry production. *The Journal of Poultry Science*, v. 46, n. 3, p. 169-179, 2009. <https://doi.org/10.2141/jpsa.46.169>.
- BURNHAM, M. R et al. Effects of incubator humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. **The Journal of Poultry Science**, 80(10), 1444-1450. 2001. <https://doi.org/10.1093/ps/80.10.1444>.
- BYDLOWSKI, S.P.; MAGNANELLI, A.C.; CHAMONE, D.A.F. Hiperhomocisteinemia e doenças vaso-oclusivas. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 71, n. 1, p. 69-76, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X1998000700013>.
- CANFIELD, W.M; KORNFELD, S. The chicken liver cation-independent manose 6-phosphate receptor lacks the high affinity binding site for insulin-like growth factor II. **Journal of Biological Chemistry**. 264, 7100– 7103. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83204-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83204-5)
- CHOI, S.W.; MASON, J.B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. **Journal of Nutrition** 132, 2413S–2418S. 2002. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2413S>.
- CHRIST, B.; ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and embryology**, vol. 191, no 5, p. 381-396. 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00304424>.

CONDE-AGUILERA, J. A et al. Changes in body composition in broilers by a sulfur amino acid deficiency during growth. **The Journal of Poultry Science**, 92(5), 1266-1275. 2013. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02796>.

COŞKUN, İ. et al. Impacts of *in ovo* feeding of DL-methionine on hatchability and chick weight. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, 2(1), 47-50. 2014. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v2i1.47-50.64>.

CZARNOWSKA-KUJAWSKA; et al. Folate Content and Yolk Color of Hen Eggs from Different Farming Systems. **Molecules**, vol. 26, no 4, p. 1034.2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26041034>.

DAUGHTRY, M.R. et al. Satellite cell-mediated breast muscle regeneration decreases with broiler size. **The Journal of Poultry Science**, 96(9), 3457-3464. 2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pex068>.

DE OLIVEIRA, J.E.; UNI, Z.; FERKET, P.R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, 2008, vol. 64, no 4, p. 488-499. <https://doi.org/10.1017/S0043933908000160>.

DUCLOS, M.J.; GODDARD, C. Insulin-like growth factor receptors in chicken liver membranes: binding properties, specificity, developmental pattern and evidence for a single receptor type. **Journal. Endocrinology**. 125, 199–206. 1990. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1250199>

EBRAHIMI, M et al. The impact of *in ovo* injection with different levels of dl-methionine on carcass characteristics and blood parameters of day-old broiler chicks. **Research On Animal Production**, 9(20), 43-52. 2018.

ELAD, O. et al. Epigenetic effect of folic acid (FA) on the gene proximal promoter area and mRNA expression of chicken B cell as antigen presenting cells. **British Poultry Science**, 61(6), 725-733. .2020. <https://doi.org/10.1645/joe.0.3259>

ELNESR, S.S. et al. Effects of *in ovo* injection of sulfur-containing amino acids on heat shock protein 70, corticosterone hormone, antioxidant indices, and lipid profile of newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. **The Journal of Poultry Science**, 98(5), 2290-2298. 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pey609>

ELWAN, Hamada AM, et al. Effects of *in ovo* methionine-cysteine injection on embryonic development, antioxidant status, IGF-I and tlr4 gene expression, and jejunum histomorphometry in newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. **Animals**, vol. 9, no 1, p. 25.2019. <https://doi.org/10.3390/ani9010025>.

EMMERT, J.L et al. Hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity in the chicken is influenced by dietary intake of sulfur amino acids, choline and betaine. **The**

**Journal of nutrition**, v. 126, n. 8, p. 2050-2058, 1996. <https://doi.org/10.1093/jn/126.8.2050>.

FERRI, P et al. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. **Journal of cellular biochemistry**, vol. 108, no 6, p. 1302-1317. 2009. <https://doi.org/10.1002/jcb.22360>.

GE, Y.; SUN, Y.; CHEN, J. IGF-II is regulated by microRNA-125b in skeletal myogenesis. **Journal of Cell Biology**, 192(1): 69–81 2. 2011. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007165>

GEIMAN, T.M.; MUEGGE, K. DNA methylation in early development. **Journal Molecular Reproduction and development**. 77(2):105–113. doi:10.1002/mrd.21118.2010. <https://doi.org/10.1002/mrd.21118>

GOH, Y.I.; KOREN, G. Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. **Journal of Obstetrics and Gynecology**. 28:3-13. 2008. <https://doi.org/10.1080/01443610701814195>.

GONÇALVES, F.M; SANTOS, V.L; FARINA, G. Nutrição *in ovo*: Estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**. 2013; 62:45–55. 2013. DOI: <https://doi.org/10.21071/az.v62iREV.1956>.

GRIMBLE, R.F. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. **Journal of nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1660S-1665S, 2006. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1660S>.

GROFF-URAYAMA, P et al. Performance, intestinal morphometry, and incubation parameters of broiler chickens submitted to *in ovo* feeding with different techniques and amino acids. **Canadian Journal of Animal Science**, 99 (4), 732-740. 2019. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0131>

GROPPER, S; SMITH, J. L. Advanced nutrition and human metabolism. **Cengage Learning**. 2012.

GROS, J. et al. Common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. **Nature journal**. 435 (7044), 954-958. 2005. <https://doi.org/10.1038/nature03572>.

HACKER, A; GUTHRIE, S. A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo. **Development journal**. 125(17):3461–3472.1998. <https://doi.org/10.1242/dev.125.17.3461>

HALEVY, O et al. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. **Developmental**

**dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, 231(3), 489-502. 2004. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20151>.

HAWKE, T.J. Muscle stem cells and exercise training. **Exercise and sport sciences reviews**, vol. 33, no 2, p. 63-68. 2005.

HWANG, S; SUNG, B; KIM, N. Roles of folate in skeletal muscle cell development and functions. **Archives of pharmacal research**, 2019, vol. 42, no 4, p. 319-325. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1100-9>.

JONES, J.I.; CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrinology**. Rev. 16, 3– 34. 1995. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-1-3>.

KUCHARSKA-GACA, J; KOWALSKA, E.E; DĘBOWSKA, M. *In ovo* feeding–technology of the future—a review. **Annals of Animal Science**, 17(4), 979-992. 2017. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-1-3>.

Kunachowicz et al. Tables of Nutritional Value of Food Products. **Instytut Żywności and Żywienia**. Warsaw, 1998.

LEUNG, Kit-Yi et al. Folate metabolite profiling of different cell types and embryos suggests variation in folate one-carbon metabolism, including developmental changes in human embryonic brain. **Journal molecular and cellular biochemistry**, vol. 378, no 1, p. 229-236. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1613>

LEWIS, J. C et al. Amino-acid composition of egg proteins. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 186, p. 23-35.1950. ISSN: 0021-9258

LI, S. et al. DNA methylation variation trends during the embryonic development of chicken. **PLoS One**, 11(7), e0159230. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159230>

LI, Z. “Effect of *in Ovo* Feeding of Folic Acid on the Folate Metabolism, Immune Function and Epigenetic Modification of Immune Effector Molecules of Broiler.” **British journal of nutrition** 115.3 2016. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004511>

LIU, Y. et al. Effect of *in ovo* folic acid injection on hepatic IGF2 expression and embryo growth of broilers. **Journal of animal science and biotechnology**, 7(1), 1-9. 2016. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0099-3>

LU, J. et al. Ontogeny of hepatic methionine catabolic enzyme activities (Transmethylation and Transsulphuration) and associated physiological amino acids in E10-21 chick embryos and D1-49 broilers. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2020. <https://doi.org/10.1111/jpn.13463>

LU, J et al. The effect of feeding adequate or deficient vitamin B6 or folic acid to breeders on methionine metabolism in 18-day-old chick embryos. **Poultry Science**, 100(4), 101008. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.075>

LU, J; COON, C.N. Developmental changes in hepatic enzymes activities involved methionine metabolism in chick embryo. **Poultry Science**, 83(Sup 1), 193, 2004. <https://doi.org/10.1111/jpn.13390>

LUO, W. et al. Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, Promotes Chicken Myoblast Fusion. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(11), 26186–26201. 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms161125946>.

LUO, W.; NIE, Q.; ZHANG, X. MicroRNAs Involved in Skeletal Muscle Differentiation. **Journal of Genetics and Genomics**, 40(3), 107–116. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.02.002>.

MAROUFYAN, E et al. Responses of performance and differential leukocyte count to methionine and threonine supplementations on broiler chickens challenged with infectious bursal disease in tropical condition. **Asian Journal of Biological Sciences**, 3(2), 68-76. 2010. ISSN : 1996-3351

MCMURTRY, J.P. Nutritional and developmental roles of insulin-like growth factors in poultry. **The Journal of nutrition**. vol. 128, no 2, p. 302S-305S. 1998. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.302S>

MCMURTRY, J. P; FRANCIS, G. L; UPTON, Z. Insulin-like growth factors in poultry. Domestic animal endocrinology, **Endocrinologia de animais domésticos** , vol. 14, no 4, p. 199-229.1997. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(97\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(97)00019-2)

MILLER, J.W.; ULRICH, C.M. Folic acid and cancer—where are we today. **The Lancet**, vol. 381, no 9871, p. 974-976. 2013. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60110-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60110-5)

MOHAMMADREZAEI, H.; NAZEM, M.; Effect of *in ovo* injection of methionine on the histomorphometry of jejunum of chicken embryo. **Biological Forum**. Research Trend, p. 23.2015. ISSN No. (Online): 2249-3239

MOSS, F.P. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. **American Journal of Anatomy**, vol. 122, no 3, p. 555-563. 1968 . <https://doi.org/10.1002/aja.1001220308>

MOZDZIAK, P.E; SCHULTZ, E; CASSENS, R.G. Myonuclear accretion is a major determinant of avian skeletal muscle growth. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 1997, vol. 272, no 2, p. C565-C571. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.2.C565>

MUNKS, B et al. Amino acids in the production of chicken egg and muscle. **The Journal of Poultry Science**, vol. 24, no 5, p. 459-464. 1945. <https://doi.org/10.3382/ps.0240459>

NASIR, Z., e PEEBLES E. "Symposium: avian embryo nutrition and incubation." **The Journal of Poultry Science**. 97.8 2994-2995. 2018. <https://doi.org/10.3382/ps/pey137>

NAZEM, M. N et al. Effect of *in ovo* injected methionine on feather follicle formation and its growth in the chicken embryo. **Anatomical Sciences Journal**, 12(2), 83-88. 2015. <http://anatomyjournal.ir/article-1-110-en.html>

NAZEM, M. N et al. Histomorphometric analysis of the small intestine of broiler chick embryos injected *in ovo* with methionine. **Animal Production Science**, 59(1), 133-139. 2019. <https://doi.org/10.1071/AN17269>

NOURI, S. et al. Effect of *in ovo* feeding of folic acid on subsequent growth performance and blood constituents levels in broilers. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 24(3), 463-470. (2018). <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9629-x>

OHTA, Y. et al. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. **The Journal of Poultry Science**, vol. 78, no 11, p. 1493-1498. 1999. <https://doi.org/10.1093/ps/78.11.1493>.

OKSBJERG, N.; GONDRET, F; VESTERGAARD, M. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system. **Domestic Animal Endocrinology**, 27(3), 219–240. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2004.06.007>

OUYANG, H.; NIE, Q; ZHANG, X. Characterization of Circular RNAs in relation to embryonic muscle development in chicken. **Journal of Animal Science**, 94, 79–79. 2016. <https://doi.org/10.2527/jas2016.94supplement479a>.

PAYNE, J. A et al. Delayed access to feed alters gene expression associated with hormonal signaling, cellular differentiation, and protein metabolism in muscle of newly hatch chicks. **General and comparative endocrinology**, vol. 292, p. 113445. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113445>

PRIVETT, O. S; BLANK, M. L; SCHMIT, J. A. Studies on the Composition of Egg Lipid a. **Journal of Food Science**, vol. 27, no 5, p. 463-468. 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1962.tb00128.x>.

RÉHAULT-GODBERT, S; GUYOT, N; NYS, Y. The golden egg: nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. **Journal Nutrients**. vol. 11, no 3, p. 684. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>

ROBERTS, J.R. Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. **The Journal of Poultry Science**, vol. 41, no 3, p. 161-177. 2004. <https://doi.org/10.2141/jpsa.41.161>

SACCONE, V; LORENZO PURI, P. Epigenetic regulation of skeletal myogenesis. **Organogenesis**, 6(1), 48–53. 2010. <https://doi.org/10.4161/org.6.1.11293>

SANTANA, M. H. M et al. Interações nutricionais entre aminoácidos sulfurosos, colina e betaína para aves. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 69-83, 2014. ISSN: 1885-4494

SEUSS-BAUM, I. Nutritional evaluation of egg compounds. En Bioactive egg compounds. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 117-144., 2007. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_18).

SKŘIVAN, M. et al. Dietary selenium increases vitamin E contents of egg yolk and chicken meat. **British The Journal of Poultry Science**, vol. 49, no 4, p. 482-486. 2008. <https://doi.org/10.1080/00071660802236021>

SMITH, D. P.; FLETCHER, D. L. Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. **The Journal of Poultry Science**, 1988. <https://doi.org/10.3382/ps.0670908>

STEWART, C.E.; ROTWEIN, P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. **Physiological reviews**, 1996, vol. 76, no 4, p. 1005-1026. <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.4.1005>

STOCKDALE, F.; MILLER, J.B. The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. **Developmental biology**, vol. 123, no 1, p. 1-9. 1987. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90420-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90420-9)

SUGINO, H.; NITODA, T.; JUNEJA, L. R. General chemical composition of hen eggs. **Hen Eggs. CRC press**. p. 13-24. 2018

TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. Effects of *in ovo* feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **The Journal of Poultry Science**, vol. 83, no 12, p. 2023-2028. 2004. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.2023>

TE PAS, M. FW. Muscle Development of Livestock Animals Physiology Genetics and Meat Quality. **CABI**, 2004. ISBN 0-85199-811-9

TESSERAUD, S. et al. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. **British Journal of Nutrition**, 101(8), 1132-1139. 2008. <https://doi.org/10.1017/S0007114508159025>.

TOMBARKIEWICZ, B. et al. The effect of methionine and folic acid administered *in ovo* on the hematological parameters of chickens (*Gallus domesticus*). **The Journal of Poultry Science**, 99(9), 4578-4585. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.014>

TROEN, A. M. et al. The atherogenic effect of excess methionine intake. Proceedings of the National **Academy of Sciences**, 100(25), 15089-15094. 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2436385100>

TULLETT, S. G. Science and the art of incubation. **The Journal of Poultry Science**, vol. 69, no 1, p. 1-15, 1990. <https://doi.org/10.3382/ps.0690001>

UEHARA, S. K.; ROSA, G. Associação da deficiência de ácido fólico com alterações patológicas e estratégias para sua prevenção: uma visão crítica. **Revista de Nutrição**, 23(5), 881–894, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000500018>

UNI, Z.; YADGARY, L.; YAIR, R. Nutritional limitations during poultry embryonic development. **Journal of Applied Poultry Research**, vol. 21, no 1, p. 175-184. 2012. <https://doi.org/10.3382/japr.2011-00478>

VIEIRA, S.L.; MORAN JR, E.T. Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. **Journal of Applied Poultry Research**, v.7, n.2, p.372-376, 1998. <https://doi.org/10.1093/japr/7.4.372>

WANG, G. S. et al. Influence of *in ovo* injecting igf-1 on weights of embryo, heart and liver of duck during hatching stages. **The Journal of Poultry Science**, vol. 11, no 12, p. 756.2012. <https://doi.org/10.3382/ps.011120756>

WEREŃSKA M; OKRUSZEK A. Nutritive value of different egg types **NIT**, 3: 212–224. 2011.

WEREŃSKA-SUDNIK, M.; OKRUSZEK, A. Wartość odżywcza różnego rodzaju jaj. **Nauki Inżynierskie i Technologiczne**, no 3. 2011. <http://doi.org/10.2282c772975a4958b0a2dc049581e3c7>

WILLEMSSEN, H. et al. Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. **World's The Journal of Poultry Science Journal**, 66(2), 177-188.2010. <https://doi.org/10.1017/S0043933910000243>

WILLIER, B. H. Phases in embryonic development. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, Amsterdam, v.43, p. 307-317, 1954. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030430413>

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

YABLONKA-REUVENI, Z. Development and postnatal regulation of adult myoblasts. **Microscopy research and technique**, vol. 30, no 5, p. 366-380. 1995. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070300504>.

YIN, H; PRICE, F; RUDNICKI, M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. **Physiological reviews**, 2013. [https:// doi: 10.1152/physrev.00043.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011)

YOUSSEF, S. Effect of *in ovo* methionine, glutamine, carnitine or betaine injection on hatchability, growth performance and physiological stat. Egyptian **The Journal of Poultry Science** Journal, 2017, vol. 37, no 4, p. 1273-1287 . [https:// doi: 10.21608/EPSJ.2017.5653](https://doi.org/10.21608/EPSJ.2017.5653)

ZAMMIT, P. S.; PARTRIDGE, T. A.; YABLONKA-REUVENI, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 54(11), 1177-1191. 2006. [https:// doi: 10.1369/jhc.6R6995.2006](https://doi.org/10.1369/jhc.6R6995.2006)

ZUIDHOF, M. J. et al. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, 460 and 2005. **The Journal of Poultry Science**, Champaign, v. 93, n. 12, p. 2970-2982, 2014. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04291>

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO****Injeção *in ovo* com aminoácidos sulfurados e ácido fólico: expressão gênica, desempenho, peso relativo de órgãos e parâmetros hematológicos em frangos de corte**

Nídia Fernanda Gamboa Gonzalez<sup>1</sup>, Márcio Gilberto Zangeronimo<sup>2\*</sup> et al.

<sup>1</sup> Universidade Cooperativa da Colômbia.

<sup>2</sup> Veterinary Medicine Department, Federal University of Lavras, University Campus, s/n, 37200900 Lavras, Brazil.

\*Author for correspondence: Veterinary Medicine Department, Federal University of Lavras, University Campus, Minas Gerais, MG 37200-900, Brazil. Tel +55 35 98862-1825. Email: zangeronimo@ufla.br

Redigido de acordo com as normas para submissão na revista Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition

## Resumo

O objetivou-se avaliar o efeito da injeção *in ovo* de ácido fólico (AF) e aminoácidos sulfurados (AAS) de forma isolada e combinados sobre a atividade mitótica dos miositos do músculo peitoral maior, desempenho, peso relativo de órgãos, e valores hematológicos e características de carcaça de frangos de corte. Um total de 1200 ovos férteis foram divididos em cinco tratamentos (240 ovos cada), sendo um controle (C - ovos intactos sem inoculação); outro inoculado 0,5 ml de solução salina 0,75% (SS); outro com SS + 0,150 mg de AF; outro com SS + 5,90 mg de L-metionina e 3,40 mg de L-cisteína (AAS); e outro com SS + AF + AAS. A inoculação foi no albúmen no primeiro dia de incubação. Após a eclosão, os pintinhos foram alojados com separação de sexo de acordo com o grupo experimental em seis boxes com 30 aves cada e mantidos até 42 dias de idade. A inoculação de AAS não influenciou ( $P > 0,05$ ) as características pós-eclosão das aves. O AF aumentou ( $P < 0,05$ ) a expressão do gene PAX7 e MYF no músculo peitoral dos pintinhos recém eclodidos e melhorou ( $P < 0,05$ ) a conversão alimentar aos 42 dias de idade. A combinação AAS + AF aumentou ( $P < 0,05$ ) a profundidade da cripta do íleo no 1º dia após a eclosão e o peso relativo do baço e do timo no 21º dia de vida. Conclui-se que a inoculação de 0,15 mg/ovo de AF no primeiro dia de incubação melhora a expressão gênica e o desempenho zootécnico dos frangos de corte e que o uso de AAS nas doses testadas não deve ser utilizado nessa idade.

**Palavras-chave:** Avicultura. Desempenho. Expressão gênica. Histomorfometria. Miopatias

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a fase embrionária, as aves são dependentes dos nutrientes que estão disponíveis no ovo. Sabe-se que nutrientes como os aminoácidos e vitaminas são essenciais no desenvolvimento embrionário e a ausência de qualquer um deles causa comprometimento no crescimento e metabolismo do organismo (Joanna et al., 2017) O uso da injeção de nutrientes *in ovo* tem demonstrado benefícios no estado fisiológico dos embriões de frangos de corte antes e após a eclosão (Li et al., 2016; Selim et al., 2012).

A metionina e a cisteína são aminoácidos sulfurados (AAS) que participam em diversos processos metabólicos do animal. A metionina é considerada o primeiro aminoácido limitante para as aves. Esse aminoácido deve ser adicionado na dieta, uma vez que o organismo animal não é capaz de sintetizá-lo. A metionina participa na síntese de proteínas, precursores de glutathione, eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e metilação de reações de DNA (Kidd, 2004), além de estimular o transporte e absorção de lisina e arginina na ave (Jankowski et al., 2014). Por outro lado, a cisteína atua como um aminoácido semi-essencial, pois pode ser sintetizado a partir da metionina e serina por transulfuração (Stipanuk, 2004). Os AAS, além de serem um componente estrutural das proteínas, também são precursores na biossíntese de vários metabólitos, tais como a sarcosina, a betaína e a colina (Zhai et al., 2012).

A deficiência de aminoácidos sulfurados essenciais pode acarretar danos no desenvolvimento do músculo (Pack & Schutte, 1995). Dessa forma, pesquisas são desenvolvidas para entender o papel deste aminoácido nas aves de rápido crescimento (Kalinowski et al., 2003), já que uma possível deficiência desses aminoácidos poderia reduzir a expressão de proteína no músculo esquelético das aves (Corzo et al., 2006). Além disso, tem-se evidenciado que o uso destes AAS reduz o estresse pelo calor e

melhora o desenvolvimento morfológico dos tecidos na fase embrionária (Elwan et al., 2019).

O ácido fólico (AF) é uma vitamina do complexo B importante para a síntese, reparação e metilação do DNA nas fases embrionárias e de crescimento. Além disso, o AF, trabalha juntamente com a vitamina B6 (piridoxina) e B12 (cobalamina), controlando os níveis plasmáticos dos aminoácidos sulfurados (Goh & Koren, 2008). Adicionalmente, favorece a viabilidade embrionária, melhora a eclosão do pintinho, o desempenho zootécnico e o fortalecimento do sistema imune das aves (Li et al., 2016; Nouri et al., 2018a). O AF também apresenta importante participação nos processos hematopoiéticos e suas deficiências levam à ocorrência da anemia megaloblástica (Green & Datta Mitra, 2017).

Embora estudos tenham demonstrado resultados positivos com a injeção *in ovo* de AAS e AF durante o desenvolvimento embrionário tardio (D19), até o momento não há evidências do uso dessa técnica quando aplicada no início do período de incubação. A maior vantagem de se inocular substâncias no primeiro dia de incubação está na facilidade de se inocular substâncias sem provocar lesões no embrião em desenvolvimento. Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar se a injeção *in ovo* de AF e AAS no primeiro dia incubação influencia o desempenho, o peso relativo de órgãos, os parâmetros hematológicos e histológicos, a expressão gênica e a qualidade da carcaça de frangos de corte.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Bioética de Investigação da Universidade Cooperativa da Colômbia, sob protocolo de número 032/2019.

### 2.1. Injeção *in ovo* e incubação

Um total de 1200 ovos férteis de frangos de corte provenientes de matrizes Ross AP<sup>®</sup> de 42 semanas de idade e com peso de  $65 \pm 0.74$  g foram selecionados. Em seguida, os ovos foram pré-aquecidos à 26 °C por 8 horas em uma sala de aquecimento. Posteriormente, foram aleatoriamente divididos em cinco tratamentos (n=240): C: controle, sem inoculação; SS: ovos inoculados com 0,5 ml de solução salina (NaCl 0,75%); AF: ovos inoculados com solução salina contendo 0,150 mg de ácido fólico (Liu et al., 2016) (Ácido Fólico No, F8758-5G >97%, Sigma-Aldrich, USA); AAS: ovos inoculados com solução salina contendo 5,90 mg de L-metionina (Elwan et al., 2019) (L-Metionina, No. 64319, Bio Ultra,  $\geq 99,5\%$ ; Sigma-Aldrich, USA) e 3,40 mg de L-cisteína (L- Cisteína- No, C7352-25G >98%, Sigma-Aldrich, USA) ; AF + AAS: os ovos inoculados com uma solução salina contendo 0,150 mg de AF, 5,90 mg de metionina e 3,40 mg de cisteína. Todas as inoculações foram realizadas no primeiro dia de incubação.

Antes da inoculação, os ovos foram colocados na posição horizontal e higienizados com álcool iodado a 2% em sua extremidade mais fina (oposto a câmara de ar). Em seguida, as soluções foram inoculadas no albúmen utilizando uma agulha estéril (índice,  $0,38 \times 13$ ). Após a inoculação, o orifício perfurado na casca foi vedado com parafina fundida (Gonzales et al., 2013). Os ovos foram então identificados e incubados em chocadeiras automáticas com capacidade para 15.840 ovos (Genesis IV, Jamesway

Chick Master Incubator- Ohio USA), ajustadas a 37,5 °C e 60% de umidade (Aviagen, 2019).

## **2.2. Alojamento das aves**

Após a eclosão, todos os pintinhos foram separados por tratamentos em caixas plásticas e foram vacinados no incubatório (Marek e Newclaste) e em seguida transportados para a granja, onde foram pesados e alojados de acordo com o grupo experimental, em seis boxes por tratamento, com separação de sexo. Em cada box (1,75 m de comprimento × 1,5 m de largura) foram alojadas 30 aves de peso médio  $44 \pm 1,0$  g, em piso coberto por maravalha e equipado com comedouro tubular e bebedouro tipo *nipple*. As aves receberam água e ração peletizada a vontade durante todo o período experimental, que foi de 42 dias. A dieta foi formulada de seguindo as especificações nutricionais da genética ROSS (Tabela 1) (AVIAGEN, 2019)

## **2.3. Desempenho, coleta de amostras e vilosidades intestinais**

Aos 7, 21 e 42 dias de idade as aves e as sobras de ração foram pesadas para calcular o ganho de peso (GP), o consumo de ração (CR) e a conversão alimentar (CA). Adicionalmente, no primeiro dia de criação e no 21º dia foi selecionada, aleatoriamente, uma ave por box (seis por tratamento), as quais foram abatidas para a coleta do sangue da veia jugular e mensuração do peso relativo dos órgãos. O peso relativo de cada órgão (peito, baço, coração, intestino, timo, bursa de Fabricius, moela e fígado) foi calculado usando a fórmula:  $\text{peso relativo (\%)} = (\text{peso do órgão(g)}/\text{peso vivo(g)}) \times 100$ . Uma porção do duodeno, do jejuno e do íleo foi retirada para analisar o diâmetro das vilosidades. As amostras foram lavadas em solução salina fisiológica e fixadas em formalina tamponada a 10%. A coloração com hematoxilina-eosina foi utilizada para avaliar a

histomorfométricas desses tecidos. Para determinar a altura e largura das vilosidades, a profundidade da cripta e a amplificação histológica da superfície de absorção (HASA metodologia de Kisielinski et al. (2002) foi utilizada. Para as medições, 15 vilosidades de cada segmento foram avaliadas usando o software AxioVision especializado para o microscópio ótico (Vision Scientific, Westland, Michigan, USA).

No 42º dia de vida das aves, o sangue foi coletado diretamente da veia da asa. A coleta foi realizada em tubos BD Microtainer® com gel de heparina de lítio/PST™, com volume de coleta de 400 a 600 µL. As amostras foram refrigeradas a uma temperatura entre 2 e 8 °C para as análises correspondentes.

#### **2.4. Análises hematológicas**

As análises hematológicas para análise do número de glóbulos vermelhos, concentração de hemoglobina no sangue, hematócrito volume corpuscular médio de glóbulos vermelhos (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi realizada usando a metodologia de Tombarkiewicz. (2020). Além disso, as plaquetas e o número de glóbulos brancos foram determinados pelo método manual usando a solução de coloração de Natt-Herrick.

#### **2.5. Histologia do músculo *Pectoralis major***

Nos dias 1, 21 e 42 após a eclosão, uma amostra representativa (0,5 × 0,5 cm) de tecido da parte cranial de cada músculo *Pectoralis major* foi imediatamente removido e fixado em tampão de formalina a 10% por 24 h em temperatura ambiente. As amostras foram conservados segundo metodologia de (Soglia et al., 2016). Cortes de 4 a 5 microns foram obtidos e colocados sobre lâminas de vidro (três seções/amostra/lâmina), depois coradas com os procedimentos comuns de coloração com hematoxilina e eosina. As

seções musculares foram examinadas usando um microscópio de luz (Vme0007b100ld, Vision Scientific, Westland, Michigan, EUA) para avaliar as diferentes medições. Para avaliar o número de mionúcleos e diâmetros das fibras musculares utilizou-se a metodologia de Rusu et al. (2016).

## 2.6. PCR - RT

As expressões gênicas de IGF-I e II no fígado e Pax7 e Myf5 no músculo peitorais, foram quantificadas por sistema de PCR quantitativo em tempo real. Após o abate das aves no primeiro dia após a eclosão, uma amostra de fígado e do músculo *Pectoralis major* de aproximadamente 1,0 x 1,0 cm foram removidos, cortados e congelados em nitrogênio líquido e transportados em nitrogênio até o laboratório. Em seguida, foram armazenados no freezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análises. O RNA total desses tecidos foi isolado usando um PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA). A pureza e a qualidade do RNA foram verificadas em um nanofotômetro NP80 (IMPLEN, München, Alemanha) e a síntese de cDNA a partir de RNA foi realizada com o kit de síntese de cDNA RevertAid™ H Minus First Strand (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI).

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados usando o Luna® Universal qPCR Master Mix, baseado em verde Sybr (New England Biolabs, Ipswich, Ma, EUA) em um CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). De acordo com as instruções do fabricante, as reações foram preparadas com um volume final de 20  $\mu\text{L}$  contendo 1X master mix, 0,25  $\mu\text{M}$  de cada primer, modelo de cDNA de 100 ng e água. Os programas de amplificação consistiram em uma desnaturação inicial a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguida por 40 ciclos de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15s e  $55\text{ a }60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 45 s. Os controles negativos

(NTC) consistiram em omitir qualquer molde de cDNA de uma reação e conduzidos em um sistema de detecção em tempo, seguindo as especificações do fabricante (Thermo Fischer Scientific) (Tabela 2).

## **2.7. Rendimento de carcaça e cortes nobres**

Aos 42 dias de idade, cinco aves por parcela com o peso corporal próximo ao da média da parcela foram submetidas a jejum alimentar de oito horas e abatidas por deslocamento cervical, sangradas, escaldadas por três minutos a 68 °C, depenadas e evisceradas. Após a pesagem das carcaças, os peitos, as asas e as pernas (coxa e sobrecoxa) foram separadas e pesados para determinação do rendimento de carcaça e de cortes. O rendimento dos cortes foi determinado em relação ao peso da carcaça eviscerada.

## **2.8. Classificação das miopatias no peito**

Os peitos das aves foram analisados e classificados para verificar a presença das miopatias *wooden breast* e *white striping*. Para *white striping*, os filés de peito foram classificados em escores de acordo com (Kuttappan et al., 2013) como escore 0 – normal, sem quaisquer linhas brancas distintas; escore 1 – moderado, apresentando linhas brancas paralelas às fibras musculares, com espessura menor do que 1 mm; e escore 2 – grav,: exibindo linhas brancas paralelas às fibras musculares, com espessura maior que 1 mm. Para *wooden breast* (WB), os filés foram classificados em escore 0 – normal, ausência de dureza e de palidez; escore 1 - presença suave de dureza e/ou palidez, filé levemente afetado nas áreas caudal e/ou cranial; escore 2 - presença moderada de dureza e/ou palidez, moderadamente afetado ao longo dos filés; e escore 3 – grave, filés com

hemorragia superficial e presença de exsudato estéril na superfície muscular, de acordo com descrito por Cruz et al. (2017).

## **2.9. Características da carne**

As características da carne foram avaliadas utilizando o músculo *Pectoralis major* de cinco aves por parcela, totalizando 150 aves por tratamento. A coloração foi determinada utilizando-se colorímetro (Minolta, CR 400, New 1063 Jersey, USA) mediante leitura em três pontos distintos do peito após exposição da carne ao ambiente por 30 minutos, de acordo com o sistema CIELAB, por meio de leituras de reflectância de luz em três coordenadas: L\* (luminosidade), a\* (teor de vermelho) e b\* (teor de amarelo), na superfície ventral e no meio da seção cranial, seguindo a metodologia descrita por Honikel (1998).

## **2.10. Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade pelo teste de Shapiro - Wilk, homoscedasticidade de variâncias pelo teste de Breusch Pagan e independência dos erros pelo teste de Durbin-Watson. Quando atendidas todas as condições ( $P > 0,05$ ), a análise de variância (ANAVA) foi realizada, sendo o teste SNK a 5% utilizado para comparar as médias obtidas entre as diferentes soluções inoculadas e o teste Dunnett, também a 5%, para comparar com controle (sem inoculação). O software estatístico R (CoreTeam, 2019) foi utilizado.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Desempenho e características de carcaça

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) no consumo de ração e ganho de peso em nenhuma das fases avaliadas (Tabela 3). Comparado ao controle, a inoculação de AAS, associados ou não ao AF aumentou ( $P<0,05$ ) a conversão alimentar aos 21 dias de idade, enquanto a inoculação de AF melhorou ( $P<0,05$ ) esse parâmetro aos 42 dias.

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da inoculação das soluções sobre o rendimento de carcaça e de cortes. Entretanto, a inoculação de AAS, associado ou não ao AF, reduziu ( $P<0,05$ ) o peso do timo das aves à eclosão, enquanto que a associação aumentou o peso do baço e do timo aos 21 dias, quando comparado ao grupo controle (Tabela 4). Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da inoculação das soluções sobre as demais variáveis de carcaça.

#### 3.2. Características hematológicas

A inoculação de AAS reduziu ( $P<0,05$ ) o volume corpuscular médio e a hemoglobina corpuscular média, quando comparado à inoculação de solução salina, nas aves recém-eclodidas (Tabela 5). Não houve diferenças ( $P>0,05$ ) nos demais parâmetros hematológicos avaliados.

#### 3.3. Vilosidades intestinais

Nas aves recém-eclodidas, a inoculação de AF aumentou ( $P<0,05$ ) a área histológica de superfície de absorção do duodeno, enquanto a associação AF + AAS aumentou ( $P<0,05$ ) a profundidade de criptas no íleo (Tabela 6). Aos 21 dias de idade, a inoculação *in ovo* das substâncias reduziu a altura das vilosidades no jejuno, enquanto que o uso da SS, AF e AF+AAS reduziram ( $P<0,05$ ) a profundidade de criptas neste

segmento. Tanto no jejunum quanto no íleo, menor área histológica de superfície de absorção foi observada ( $P < 0,05$ ) somente com a inoculação da SS.

### **3.4. Expressão gênica de mRNA de IGF-I e II Pax-7 e Myf-5**

A injeção de SS e de soluções contendo AF+AAS reduziram ( $P < 0,05$ ) a expressão de IGF I e II no fígado, quando comparado ao controle (Figura 1). Por outro lado, constatou-se ( $P < 0,05$ ) que o AF aumentou da expressão de PAX7 e MYF5 no músculo peitoral das aves em comparação a todos os outros grupos experimentais.

### **3.5. Diâmetro de fibras musculares e qualidade da carne de frangos**

Comparado à solução salina, a injeção de AF aumentou ( $P < 0,05$ ) o diâmetro da seção transversal das fibras musculares das aves aos 42 dias de idade (Tabela 7). Entretanto, comparado ao controle, não houve diferenças ( $P > 0,05$ ) entre as diferentes soluções inoculadas. Também não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) no número de células e nas características das fibras musculares nas demais idades avaliadas, nem mesmo na aparência da carne.

### **3.6. Miopatias no peito**

Diferentes graus de miopatias *wooden breast* e *white striping* foram observadas nos peitos (Figura 2). Apenas as aves provenientes de ovos inoculados com AF + AAS (33% das aves) apresentaram grau máximo de *wooden breast*. As aves provenientes de ovos inoculados com AF foram as que tiveram maior índice (33%) de aves sem anomalias no peito.

#### 4. DISCUSSÃO

A inoculação *in ovo* de soluções contendo aminoácidos e vitaminas tem trazido benefícios ao desenvolvimento pós-eclosão de frangos de corte (Uni et al., 2005). Tem-se evidenciado que a inoculação de ácido fólico *in ovo* com doses semelhantes as usadas nesta pesquisa favorece as características de desempenho dos frangos na fase post eclosão (Nouri et al., 2018b). Por outro lado, a injeção de AAS estimula o desenvolvimento dos órgãos do trato gastrointestinal, o que é positivo para a digestibilidade de nutrientes e desempenho das aves na fase pós-eclosão (Nazem et al., 2019). No presente estudo, a inoculação de AF no primeiro dia de incubação melhorou o desempenho zootécnico das aves, porém, o uso de AAS nessa mesma etapa do desenvolvimento embrionário não trouxe resultados satisfatórios, mesmo quando associado ao AF possivelmente a menor doses de AAS usada na inoculação.

Evidências mostram que a inoculação *in ovo* de metionina + cisteína no 17º dia de incubação aumento a expressão gênica de IGF-I (Elwan et al., 2019), enquanto que a de AF no 11º dia aumentou a expressão gênica de IGF-II (Liu et al., 2016). Sabe-se que essas proteínas estimulam o crescimento embrionário e o desenvolvimento de tecidos e poderiam favorecer o desempenho pós-eclosão das aves (Gonçalves et al., 2013). A inoculação *in ovo* dessas substâncias isoladas ou associadas no primeiro dia de incubação dos ovos não tem sido avaliado até então. A maior vantagem de se inocular soluções no dia 1 de incubação é a simplicidade da técnica. Não há possibilidade de lesões no embrião e isso reduz os efeitos negativos desta técnica sobre a eclodibilidade dos ovos.

O músculo é um dos componentes mais importante do organismo (Smith & Fletcher, 1988), estando diretamente relacionado com o rendimento de carne nas carcaças das aves. O AF participa da formação desse tecido, modulando a síntese, reparação e metilação do DNA durante a miogênese na fase embrionária, além de controlar também

os níveis plasmáticos de aminoácidos (Goh & Koren, 2008). Os genes miogênicos que estão envolvidos no desenvolvimento do músculo esquelético pertencem as famílias de fatores de transcrição PAX7, MYF5 e IGF (Saccone & Puri, 2010). Os dois primeiros regulam as células satélites, que desempenham um papel fundamental na formação do músculo esquelético (Zammit et al., 2006). De acordo com Halevy et al. (2004), a maior expressão desses genes ocorrem durante a última fase do desenvolvimento embrionário. Sendo assim, a maior disponibilidade de AF nesse período pode favorecer a metilação do DNA e, conseqüentemente na expressão desses genes o que, de fato, foi observado no presente estudo. Entretanto, o AF não foi capaz de influenciar significativamente a hiperplasia das fibras musculares, nem aumentar a expressão gênica de IGF, provavelmente devido ao momento da inoculação associada à dose pequena utilizada.

El-Azeem et al. (2014), ao inocularem 1 mg/ovo de AF na câmara de ar no 14º dia de incubação, observaram menor número, porém maior dimensão dos miócitos no músculo peitoral das aves, comprovando o efeito hipertrófico dessa vitamina nesse tecido. Como foi evidenciado no diâmetro das fibras musculares ao dia 42. Porém, embora não tenham sido detectadas diferenças nas dimensões das fibras musculares em relação ao grupo controle, houve menor conversão alimentar aos 42 dias de idade das aves provenientes de ovos inoculados com AF. Esse resultado pode estar relacionado ao efeito dessa vitamina no metabolismo muscular, proporcionando melhor aproveitamento dos nutrientes presentes na dieta (Nouri et al., 2018b).

Com relação ao AAS, Lu et al. (2021) evidenciaram que a máxima necessidade desses nutrientes ocorre a partir do dia 19º de incubação, pois a metionina adenosiltransferase metaboliza este aminoácido para lidar com a demanda imposta pelos embriões e pelos frangos em crescimento. Por outro lado, os AAS também são reconhecidos como precursores na biossíntese de vários metabólitos no organismo (Zhai

et al., 2012). Que podem favorecer algumas características fisiológicas do animal. Assim como no presente estudo, Youssef et al. (2017) também não observaram diferenças no ganho de peso e no consumo de ração quando inocularam ovos com AAS, tanto de forma individual quanto combinada com AF. Relato na literatura sugere que os efeitos da inoculação com AAS possam quando há menores quantidades desses nutrientes nos ovos. Powell et al. (2017) observaram que a deficiência desses aminoácidos suprime totalmente a proliferação e a diferenciação células satélites, impactando na formação da fibra muscular. Dessa forma, acredita-se que os efeitos da inoculação *in ovo* de AAS podem estar diretamente relacionados à nutrição das matrizes.

Com relação ao peso de órgãos, Groff-Urayama et al. (2019) observaram que a administração *in ovo* de metionina não influenciou o desenvolvimento dos órgãos gastrointestinais e afirmaram que esse resultado está mais relacionado à alimentação das aves após a eclosão. Por outro lado, Li et al. (2016) observaram que a injeção *in ovo* de AF em concentrações de 0,15 mg no 11º dia de incubação melhorou o peso relativo do fígado e da bursa de Fabricius no momento da eclosão. Segundo esses autores, esse aumento foi causado devido ao estímulo da expressão de IGF no fígado. No presente estudo, apenas o baço e o timo foram maiores nas aves provenientes de ovos injetados com AF + AAS. Assim como no presente estudo, Tombarkiewicz et al. (2020) também verificaram que a inoculação de AAS (5 ou 25 mg/ovo) e AF (3 ou 15 mg/ovo) no 17º dia de incubação não causam mudanças expressivas nas células sanguíneas das aves após a eclosão, o que torna difícil justificar os aumentos no baço e no timo observados.

Com relação à morfometria do epitélio intestinal, o diâmetro das vilosidades é um fator determinante no desempenho da ave, pois influencia diretamente a capacidade de digestão e absorção dos nutrientes. Segundo Vaezi et al. (2011), a presença de aminoácidos essenciais, além de favorecer o desempenho zootécnico, é capaz de melhorar

o diâmetro das vilosidades intestinais, favorecendo o aproveitamento dos nutrientes. Mohammadrezaei et al. (2015) observaram que a inoculação *in ovo* de 40 ou 50 mg de metionina no 4º dia de incubação aumentou o diâmetro das vilosidades dos embriões no 18º dia. De maneira semelhante, Elwan et al. (2019) e Nazem et al. (2019) observaram que frangos provenientes de ovos inoculados no com AAS possuíam melhor capacidade absorptiva no jejuno. No presente estudo, não houve alterações importantes na morfometria do epitélio intestinal no dia da eclosão das aves provenientes de ovos inoculados com AF ou AAS quando comparados ao grupo controle. Apenas aos 21 dias houve menor tamanho das vilosidades e das criptas nas aves provenientes de ovos inoculados com AF ou AF+AAS, porém, sem influência na área da superfície de absorção.

Segundo Tako et al. (2004), o efeito da inoculação *in ovo* tem seu ápice na morfometria intestinal até 48 h após a inoculação. Além disso, o maior desenvolvimento do epitélio intestinal ocorre somente até o 7 dia após a eclosão (Leitão et al., 2014), reduzindo os efeitos da nutrição *in ovo* quando avaliado após essa idade.

Quanto à carne, sua coloração é definida primariamente por meio dos pigmentos de mioglobina e hemoglobina (Mutryn et al., 2015), cuja formação depende da presença de AF (Barroeta et al., 2012). No presente estudo, não houve influência da inoculação *in ovo* dessa vitamina, provavelmente devido à presença desse nutriente nas dietas das aves até os 42 dias de idade. Outro fator que influencia nas cores das carnes é a presença de miopatias. Na presença de *white striping* o tom amarelado se eleva devido ao incremento de gordura (Dalle Zotte et al., 2017). Já na presença de *wooden breast*, o tom amarelo é elevado em resposta à uma degeneração muscular com fibroses no músculo (Mudalal et al., 2015). No presente estudo observou-se uma incidência elevada dessas miopatias, não sendo possível avaliar o efeito do AAS e AF na coloração das carnes.

As principais causas do *white striping* são o rápido crescimento dos tecidos, a vasodilatação, a hipoxia e as lipólises na região do músculo peitoral maior (Kuttappan et al., 2013). Já o *wooden breast* ocorre devido às lesões fibrolíticas também devido ao rápido crescimento muscular (Mudalal et al., 2015). De maneira geral, os frangos de corte melhorados geneticamente desenvolvem uma hipertrofia das fibras musculares e não uma hiperplasia, sendo que esse processo ocorre principalmente na fase embrionária (Luo et al., 2017). A hiperplasia deficiente reduz a formação de miofibras musculares e também a área de capilaridade do músculo, o que causa um aumento da incidência das miopatias citadas (Harthan et al., 2014). No presente estudo, a associação de AF + AAS aumentou a incidência de *wooden breast*, enquanto a inoculação de apenas AF reduziu o índice de anomalias. Mais estudos devem ser conduzidos na tentativa de se elucidar os mecanismos envolvendo a presença desses nutrientes na formação do tecido muscular embrionário nas aves.

## 5. CONCLUSÃO

A inoculação de 0,15 mg/ovo de AF no primeiro dia de incubação pode ser utilizado para melhorar a expressão gênica no músculo de Myf5 e Pax 7, e o desempenho zootécnico dos frangos de corte. O uso de AAS nas doses testadas não deve ser utilizado nessa idade.

## REFERÊNCIAS

- Barroeta, C., Baucells, M. D., Calsamiglia, S., Casals, R., Briz, R. C., Davin, R., Gonzalez, G., Hernandez, J. M., Isabel, B., Bote, C. L., Rey, I. a, Rodriguez, M., Sanz, J., & Weber, G. (2012). *Optimum Vitamin Nutrition*.
- Corzo, A., Kidd, M. T., Dozier, W. A., Shack, L. A., & Burgess, S. C. (2006). Protein

- expression of pectoralis major muscle in chickens in response to dietary methionine status . *British Journal of Nutrition*, 95(4), 703–708.  
<https://doi.org/10.1079/bjn20051716>
- Cruz, R. F. A., Vieira, S. L., Kindlein, L., Kipper, M., Cemin, H. S., & Rauber, S. M. (2017). Occurrence of white striping and wooden breast in broilers fed grower and finisher diets with increasing Lysine levels. *Poultry Science*, 96(2), 501–510.  
<https://doi.org/10.3382/ps/pew310>
- Dalle Zotte, A., Tasoniero, G., Puolanne, E., Remignon, H., Cecchinato, M., Catelli, E., & Cullere, M. (2017). Effect of “wooden breast” appearance on poultry meat quality, histological traits, and lesions characterization. *Czech Journal of Animal Science*, 62(2), 51–57. <https://doi.org/10.17221/54/2016-CJAS>
- El-Azeem, N. A. A., Abdo, M. S., Madkour, M., & El-Wardany, I. (2014). Physiological and histological responses of broiler chicks to in ovo injection with folic acid or L-carnitine during embryogenesis. *Global Veterinaria*, 13(4), 544–551.  
<https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.04.85231>
- Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., Xu, Q., Xie, C., Dong, X., & Zou, X. (2019). Effects of in ovo methionine-cysteine injection on embryonic development, antioxidant status, IGF-I and TLR4 gene expression, and jejunum histomorphometry in newly hatched broiler chicks exposed to heat stress during incubation. *Animals*, 9(1).  
<https://doi.org/10.3390/ani9010025>
- Goh, Y. I., & Koren, G. (2008). Folic acid in pregnancy and fetal outcomes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 28(1), 3–13.  
<https://doi.org/10.1080/01443610701814195>
- Gonçalves, F. M., Santos, V. L., Farina, G., Kreuz, B. S., Gentilini, F. P., Anciuti, M. A., & Rutz, F. (2013). Nutrição in ovo : Estratégia para nutrição de precisão em sistemas

- de produção avícola. *Archivos de Zootecnia*, 62, 45–55.
- Gonzales, E., Cruz, C. P., Leandro, N. S. M., Stringhini, J. H., & Brito, A. B. (2013). In ovo supplementation of 25(OH)D3 to broiler embryos. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola*, 15(3), 199–202. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2013000300005>
- Green, R., & Datta Mitra, A. (2017). Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. *Medical Clinics of North America*, 101(2), 297–317. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.013>
- Groff-Urayama, P., Padilha, J., Einsfeld, S., Pertile, S., Gorges, M., de Andrade, M., Di Domenico, A., Maeda, E. M., & Takahashi, S. (2019). Performance, intestinal morphometry, and incubation parameters of broiler chickens submitted to in ovo feeding with different techniques and amino acids. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(4), 732–740. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0131>
- Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M. Z., Rosser, B. W. C., Rinkevich, Y., Reshef, R., Rozenboim, I., Wleklinski-Lee, M., & Yablonka-Reuveni, Z. (2004). Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Developmental Dynamics*, 231(3), 489–502. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20151>
- Harthan, L. B., McFarland, D. C., & Velleman, S. G. (2014). The effect of nutritional status and myogenic satellite cell age on turkey satellite cell proliferation, differentiation, and expression of myogenic transcriptional regulatory factors and heparan sulfate proteoglycans syndecan-4 and glypican-1. *Poultry Science*, 93(1), 174–186. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03570>
- Honikel, K. O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4), 447–457. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00034-5)

- Jankowski, J., Kubińska, M., & Zduńczyk, Z. (2014). Nutritional and immunomodulatory function of methionine in poultry diets - A review. *Annals of Animal Science*, *14*(1), 17–31. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0081>
- Joanna, K. G., Emilia, K., & Michalina, D. (2017). In ovo feeding - Technology of the future - A review. *Annals of Animal Science*, *17*(4), 797–992. <https://doi.org/10.1515/aoas-2017-0004>
- Kalinowski, A., Moran, E. T., & Wyatt, C. (2003). Methionine and cystine requirements of slow- and fast-feathering male broilers from zero to three weeks of age. *Poultry Science*, *82*(9), 1423–1427. <https://doi.org/10.1093/ps/82.9.1423>
- Kidd, M. T. (2004). Nutritional modulation of immune function in broilers. *Poultry Science*, *83*(4), 650–657. <https://doi.org/10.1093/ps/83.4.650>
- Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2002). A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and Experimental Medicine*, *2*(1), 131–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s102380200018>
- Kuttappan, V. A., Brewer, V. B., Mauromoustakos, A., McKee, S. R., Emmert, J. L., Meullenet, J. F., & Owens, C. M. (2013). Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*, *92*(3), 811–819. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02506>
- Leitão, R. A., Leandro, N. S. M., Stringhini, J. H., Café, M. B., Matos, M. S., & Andrade, M. A. (2014). Inoculação de maltose e/ou sacarose em ovos leves embrionados. *Ciencia Animal Brasileira*, *15*(1), 55–63. <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.13974>
- Li, S., Zhi, L., Liu, Y., Shen, J., Liu, L., Yao, J., & Yang, X. (2016). Effect of in ovo feeding of folic acid on the folate metabolism, immune function and epigenetic modification of immune effector molecules of broiler. *British Journal of Nutrition*,

115(3), 411–421. <https://doi.org/10.1017/S0007114515004511>

- Liu, Y., Zhi, L., Shen, J., Li, S., Yao, J., & Yang, X. (2016). Effect of in ovo folic acid injection on hepatic IGF2 expression and embryo growth of broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 3–11. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0099-3>
- Lu, J., Weil, J. T., Cerrate, S., & Coon, C. N. (2021). Ontogeny of hepatic methionine catabolic enzyme activities (Transmethylation and Transsulphuration) and associated physiological amino acids in E10-21 chick embryos and D1-49 broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(3), 507–519. <https://doi.org/10.1111/jpn.13463>
- Luo, W., Abdalla, B. A., Nie, Q., & Zhang, X. (2017). The genetic regulation of skeletal muscle development: Insights from chicken studies. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 4(3), 295–304. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2017159>
- Mohammadrezaei, H., Nazem, M., & Mohammadrezaei, M. (2015). Effect of in ovo injection of Methionine on the histomorphometry of Jejunum of chicken embryo. July.
- Mudalal, S., Lorenzi, M., Soglia, F., Cavani, C., & Petracci, M. (2015). Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal*, 9(4), 728–734. <https://doi.org/10.1017/S175173111400295X>
- Mutryn, M. F., Brannick, E. M., Fu, W., Lee, W. R., & Abasht, B. (2015). Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1623-0>
- Nazem, M. N., Sajjadian, S. M., Kheirandish, R., & Mohammadrezaei, H. (2019).

- Histomorphometric analysis of the small intestine of broiler chick embryos injected in ovo with methionine. *Animal Production Science*, 59(1), 133–139. <https://doi.org/10.1071/AN17269>
- Nouri, S., Ghalehkandi, J. G., Hassanpour, S., & Aghdam-Shahryar, H. (2018a). Effect of In Ovo Feeding of Folic Acid on Subsequent Growth Performance and Blood Constituents Levels in Broilers. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(3), 463–470. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9629-x>
- Nouri, S., Ghalehkandi, J. G., Hassanpour, S., & Aghdam-Shahryar, H. (2018b). Effect of In Ovo Feeding of Folic Acid on Subsequent Growth Performance and Blood Constituents Levels in Broilers. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(3), 463–470. <https://doi.org/10.1007/s10989-017-9629-x>
- Pack, M., & Schutte, J. B. (1995). Sulfur amino acid requirement of broiler chicks from fourteen to thirty-eight days of age. 2. Economic evaluation. *Poultry Science*, 74(3), 488–493. <https://doi.org/10.3382/ps.0740488>
- Powell, D. J., Velleman, S. G., Cowieson, A. J., & Muir, W. I. (2017). Methionine concentration in the pre-starter diet: Its effect on broiler breast muscle development. *Animal Production Science*, 57(3), 448–457. <https://doi.org/10.1071/AN15479>
- Rusu, R. M. R., Ionescu, I., Sciences, A., & Medicine, V. (2016). Aspects concerning the histological structure of the biceps brachialis muscles in chicken broilers ASpects concerning the histological structure of the biceps brachialis muscles in chicken broilers. March.
- Saccone, V., & Puri, P. L. (2010). Epigenetic regulation of skeletal myogenesis. *Organogenesis*, 6(1), 48–53. <https://doi.org/10.4161/org.6.1.11293>
- Selim, S. A., Gaafar, K. M., & El-ballal, S. S. (2012). Influence of in-ovo administration with vitamin E and ascorbic acid on the performance of Muscovy ducks. *Emirates*

*Journal of Food and Agriculture*, 24(3), 264–271.

- Smith, D. P., & Fletcher, D. L. (1988). Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. *Poultry Science*, 67(6), 908–913. <https://doi.org/10.3382/ps.0670908>
- Soglia, F., Mudalal, S., Babini, E., Di Nunzio, M., Mazzoni, M., Sirri, F., Cavani, C., & Petracci, M. (2016). Histology, composition, and quality traits of chicken Pectoralis major muscle affected by wooden breast abnormality. *Poultry Science*, 95(3), 651–659. <https://doi.org/10.3382/ps/pev353>
- Stipanuk, M. H. (2004). Sulfur amino acid metabolism: Pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annual Review of Nutrition*, 24, 539–577. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132418>
- Tako, E., Ferket, P. R., & Uni, Z. (2004). Effects of in ovo feeding of carbohydrates and  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poultry Science*, 83(12), 2023–2028. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.2023>
- Tombarkiewicz, B., Trzeciak, K., Bojarski, B., & Lis, M. W. (2020). The effect of methionine and folic acid administered in ovo on the hematological parameters of chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Poultry Science*, 99(9), 4578–4585. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.014>
- Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., & Kedar, O. (2005). In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84(5), 764–770. <https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764>
- Vaezi, G., Teshfam, M., Bahadoran, S., Farazyian, H., & Hosseini, S. (2011). Effects of different levels of lysine on small intestinal villous morphology in starter diet of broiler chickens. *Global Veterinaria*, 7(6), 523–526.
- Youssef, S. F., El-halim, H. A. H. A., & Wahba, F. A. (2017). Effect of in Ovo

Methionine, Glutamine, Carnitine or Betaine Injection on Hatchability, Growth Performance and Physiological State. *Egyptian Poultry Science Journal*, 37(4), 1273–1287. <https://doi.org/10.21608/epsj.2017.5653>

Zammit, P. S., Partridge, T. A., & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(11), 1177–1191. <https://doi.org/10.1369/jhc.6R6995.2006>

Zhai, W., Araujo, L. F., Burgess, S. C., Cooksey, A. M., Pendarvis, K., Mercier, Y., & Corzo, A. (2012). Protein expression in pectoral skeletal muscle of chickens as influenced by dietary methionine. *Poultry Science*, 91(10), 2548–2555. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02213>

Tabela 1. Composição percentual e calculada das rações experimentais utilizadas para frangos de corte nas diferentes fases de vida.

Ingrediente (%)	Fase da criação			
	1 a 7 dias	8 a 21 dias	22 a 35 dias	36 a 42 dias
Milho	54,63	54,56	59,48	68,74
Farelo de soja	25,86	28,56	17,74	9,49
Soja integral extrusada	15,53	10,93	14,37	11,59
Farinha de vísceras	-	-	2,37	3,50
Farinha de penas e sangue	-	-	1,00	2,40
Óleo	-	2,80	2,00	1,49
Fosfato tri cálcico defluorinado	1,01	0,77	0,38	0,22
Calcário calcítico	0,81	0,78	0,67	0,60
DL-Metionina (99%)	0,45	0,39	0,47	0,41
L - Lisina (78%)	0,39	0,24	0,43	0,52
Núcleo vitaminas e minerais <sup>1</sup>	0,37	0,37	0,40	0,38
L- Treonina 99%	0,22	0,14	0,20	0,20
Sal comum	0,17	0,21	0,40	0,38
Cloreto de colina (60%)	0,14	0,12	0,10	0,08
L-Arginina	0,13	-	-	-
L-Valina	0,13	0,03	-	-
Adisodium <sup>2</sup>	-	-	0,18	0,26
Aditivo <sup>3</sup>	0,10	0,06	0,16	0,06
Ácidos orgânicos <sup>4</sup>	0,06	0,05	0,03	0,03
Total	100,0	100,0	100,0	100,0
<b>Composição nutricional garantida</b>				
Energia metabolizável (Kcal/Kg)	3050	3150	3250	3280
Proteína bruta (%)	23,50	22,55	20,50	19,50
Calcio %	0,77	0,68	0,62	0,59
Fosforo disponível (%)	0,31	0,26	0,24	0,23
Lisina (%)	1,40	1,25	1,22	1,15
Metionina+ Cisteína (%)	1,01	0,95	0,96	0,90
Treonina (%)	0,94	0,84	0,81	0,77
Arginina (%)	1,47	1,31	1,15	1,04
Valina (%)	1,05	0,94	0,80	0,74
Sódio (%)	0,14	0,14	0,16	0,16

<sup>1</sup>Fornecimento por Kg de ração: UI: Retinol 11000; Colecalciferol 3000, mg: Tocoferol 75; Ac, fólico 1,5; Vit, K 3,5; Tiamina 3,0 Riboflavina 7,5; Niacina 4,50; Ac Pantotênico 15; Piridoxina 4, Biotina 0,2; Zinco 50; Manganês 50; Ferro 20; iodo 1; Selênio 0,30

<sup>2</sup> Adisodium: aditivo para alimentação animal que contém 32% de sódio e 22% de enxofre.

<sup>3</sup> Aditivo: Aditivo antimicotoxinas (HSCS – Aluminossilicato de sódio e cálcio hidratado)

<sup>4</sup> Acido cítrico, ácido butírico.

Tabela 2. Sequências de primers para análise de PCR quantitativa em tempo real.

Nome do gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto bp
PAX7	F:AGTTCGATTAGCCGTGTGCT R:TTCCTCCTTCTTGTCGAGT	75
MYF5	F:GAGGAGGCTGAAGAAAGTGA R:ATCTCCACTTTGGGGAGTCT	90
IGF 1	F:CGCTTACACCACAAGGGAATAG R:CGTACAGAGCGTGCAGATTTAG	113
IGF 2	F:CTCGCGCACCCAGTATTT R:TGTCTTCTAGTGTTGGCACTG	111
18s	F:CAGTTGGTGGAGCGATTTGTC R: CATCTAAGGGCATCACAGACC	164

PAX7 = caixa emparelhada 7 MYF5 = fator miogênico 5; IFG 1 e 2 = fatores de crescimento semelhantes à insulina; 18S = Gene de referência.

Tabela 3. Desempenho e características de carcaça de frangos de corte provenientes de ovos injetados com diferentes substâncias no primeiro dia de incubação.

Variável	Tratamentos*					SEM	P-Valor
	C	SS	AF	AAS	AF+ AAS		
<i>- Desempenho -</i>							
<i>Dia 0</i>							
Peso pintinho (g)	44,0	44,0	45,0	43,0	44,0	0,59	0,14
<i>1 a 7 dias de idade</i>							
Consumo de ração (g)	127	119	130	127	131	4,44	0,12
Ganho de peso (g)	119	112	118	117	121	4,45	0,33
Conversão alimentar (g/g)	0,78	0,77	0,80	0,79	0,79	0,01	0,24
<i>1 a 21 dias de idade</i>							
Consumo de ração (g)	1098	1096	1110	1123	1140	16,58	0,08
Ganho de peso (g)	894	883	911	882	898	16,14	0,40
Conversão alimentar (g/g)	1,23 <sup>A</sup>	1,24 <sup>AB</sup>	1,22 <sup>A</sup>	1,27 <sup>B</sup>	1,27 <sup>B</sup>	0,01	0,01
<i>1 a 42 dias de idade</i>							
Consumo de ração (g)	4586	4558	4582	4551	4590	73,37	0,97
Ganho de peso (g)	3204	3173	3241	3170	3158	51,69	0,51
Conversão alimentar (g/g)	1,43 <sup>B</sup>	1,44 <sup>B</sup>	1,42 <sup>A</sup>	1,44 <sup>B</sup>	1,46 <sup>C</sup>	0,01	0,01
<i>- Características de carcaça aos 42 dias de idade -</i>							
Peso vivo (kg)	3,43	3,44	3,44	3,36	3,47	0,07	0,81
Carcaça (%)	74,4	73,1	74,5	75,8	73,9	0,93	0,39
Peito (%)	41,9	41,7	41,5	40,7	41,3	0,82	0,86
Pernas (%)	27,6	28,8	28,2	29,2	28,7	0,63	0,47
Asas (%)	9,65	9,83	9,78	9,90	9,63	0,17	0,75

Tratamentos: C: Controle, ovos intactos; SS: solução salina; AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados.

<sup>A, B</sup> Médias seguidas de letras distintas em uma mesma linha diferem pelo teste de SNK (P<0,05).

Tabela 4. Peso relativo dos órgãos (%) aos 1 e 21 dias de idade de frangos de corte provenientes de ovos injetados com diferentes substâncias no primeiro dia de incubação.

Variável	Tratamentos*					SEM	P-Valor
	C	SS	AF	AAS	AF+ AAS		
<i>Dia 1</i>							
Peito	3,03	2,56	2,89	2,96	2,71	0,35	0,66
Coração	0,82	0,74	0,67	0,54	0,74	0,17	0,56
Intestino	4,61	4,63	4,66	4,13	4,11	0,34	0,27
Baço	0,23	0,23	0,22	0,22	0,30	0,03	0,11
Timo	0,38 <sup>A</sup>	0,27 <sup>AB</sup>	0,33 <sup>AB</sup>	0,22 <sup>B</sup>	0,23 <sup>B</sup>	0,05	0,03
Bursa de Fabrícus	0,23	0,23	0,26	0,22	0,37	0,09	0,45
Saco vitelino	11,13	11,89	13,27	15,7	13,94	2,00	0,23
Moela	5,96	5,90	6,48	5,88	5,34	0,43	0,18
Fígado	2,66	2,90	2,94	2,63	2,64	0,16	0,17
<i>Dia 21</i>							
Peito	21,78	21,81	22,03	23,08	22,66	0,68	0,26
Coração	0,63	0,67	0,61	0,63	0,67	0,04	0,47
Intestino	8,46	8,47	8,95	8,81	8,10	0,52	0,52
Baço	0,07 <sup>B</sup>	0,10 <sup>AB</sup>	0,09 <sup>AB</sup>	0,10 <sup>AB</sup>	0,13 <sup>A</sup>	0,02	0,03
Timo	0,54 <sup>B</sup>	0,49 <sup>B</sup>	0,50 <sup>B</sup>	0,55 <sup>AB</sup>	0,64 <sup>A</sup>	0,04	0,02
Bursa de Fabrícus	0,18	0,18	0,18	0,20	0,19	0,03	0,90
Moela	2,90	3,06	2,95	2,83	2,72	0,16	0,31
Fígado	3,28	3,32	3,14	3,37	3,40	0,17	0,56

Tratamentos: C: controle, ovos intactos; SS: solução salina; AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados.

<sup>A, B</sup> Médias seguidas de letras distintas em uma mesma linha diferem pelo teste de SNK (P<0,05).

Tabela 5. Características hematológicas aos 1, 21 e 42 dias de idade de frangos de corte provenientes de ovos injetados com diferentes substâncias no primeiro dia de incubação.

Variável	Tratamentos*					SEM	P-Valor
	C	SS	AF	AAS	AF+ AAS		
<i>Dia 1</i>							
Hemácias (10 <sup>6</sup> /ml)	2,28	1,93	2,14	2,53	2,26	0,15	0,12
Hemoglobina g/dl	9,28	10	9,28	9,28	9,17	0,41	0,60
Hematócritos (%)	27,8	30	27,8	27,8	27,5	0,12	0,60
VCM (fl) +	129,4 <sup>AB</sup>	156,3 <sup>A</sup>	132,3 <sup>AB</sup>	114,2 <sup>B</sup>	124,5 <sup>AB</sup>	8,46	0,02
HCM (pg) +	43,1 <sup>AB</sup>	52,1 <sup>A</sup>	44,1 <sup>AB</sup>	38,1 <sup>B</sup>	41,5 <sup>AB</sup>	2,82	0,02
CHCM (g/dL) +	30,6	26,6	25,5	22,4	20,2	0,65	0,47
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /ml)	23,2	22,	27,2	25,8	21,5	9,69	0,71
Linfócitos (%)	69,0	67,2	70,7	57,3	71,0	6,36	0,55
Eosinófilos (%)	2,50	0,67	6,67	2,00	1,30	1,54	0,08
Heterofilo (%)	28,3	32,2	22,7	40,7	27,5	6,42	0,38
Monócitos (%)	0,17	0,01	0,01	0,01	0,17	0,11	0,57
<i>Dia 21</i>							
Hemácias (10 <sup>6</sup> /ml)	2,34	2,31	2,47	2,28	2,12	0,14	0,51
Hemoglobina g/dl	9,33	9,12	9,08	9,80	9,06	0,34	0,51
Hematócritos (%)	27,8	27,3	26,0	28,5	27,2	0,76	0,24
VCM (fl)	121,0	119,7	109,2	126,4	129,6	7,79	0,42
HCM (pg)	40,7	39,9	38,1	43,5	43,3	2,89	0,65
CHCM (g/dL)	33,4	33,4	34,9	34,3	33,4	0,65	0,36
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /ml)	78,2	97,4	62,4	58,9	98,6	12,8	0,11
Linfócitos (%)	48,0	54,2	45,7	48,3	38,2	5,53	0,38
Eosinófilos (%)	3,33	2,00	0,67	0,17	0,33	0,92	0,11
Heterofilo (%)	47,3	42,7	49,7	49,7	59,2	5,41	0,32
Monócitos (%)	1,33	1,17	4,00	1,83	2,33	1,10	0,39
<i>Dia 42</i>							
Hemácias (10 <sup>6</sup> /ml)	5,03	4,47	4,73	4,34	3,93	0,68	0,83
Hemoglobina g/dl	9,55	9,98	9,9	10,67	9,39	0,57	0,56
Hematócritos (%)	29,2	30	30,2	32,8	29,0	2,01	0,68
VCM (fl)	62,5	79,4	68,8	92,3	78,9	12,29	0,50
HCM (pg)	20,3	26,6	22,5	30,6	25,5	4,14	0,47
CHCM (g/dL)	32,8	33,3	32,8	32,9	32,4	0,53	0,83
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /ml)	46,6	62,8	56,6	56,7	39,8	9,69	0,48
Linfócitos (%)	30,2	41,2	37,5	39,8	35,5	6,55	0,78
Eosinófilos (%)	0,17	0,50	0,33	0,83	1,00	0,45	0,67
Heterofilo (%)	69,7	57,7	61,3	59,3	63,3	6,72	0,75
Monócitos (%)	0,01	0,67	0,83	0,01	0,17	0,24	0,06

Tratamentos: C: Controle, ovos intactos; SS: solução salina; AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados

HCM = hemoglobina corpuscular média; VCM = volume corpuscular médio, CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média,

<sup>A, B</sup> Médias seguidas de letras distintas em uma mesma linha diferem pelo teste de SNK (P<0,05),

Tabela 6, Características das vilosidades intestinais aos 1 e 21 dias idade, de frangos de corte provenientes de ovos injetados com diferentes substâncias no primeiro dia de incubação,

Variável	Tratamentos*					SEM	P-Valor
	CI	SS	AF	AAS	AF+ AAS		
<i>- Dia 1 -</i>							
<i>Duodeno</i>							
Profundidade de cripta (µm)	64,5	79,3	66,1	65,2	68,4	8,69	0,44
Altura de vilosidades (µm)	420,1	390,4	408,3	417,9	369,2	41,45	0,89
Largura de vilosidades (µm)	50,9	61,2	64,5	63,9	60,4	4,70	0,75
HASA (µm <sup>2</sup> )	16,0 <sup>AB</sup>	14,9 <sup>B</sup>	18,8 <sup>A</sup>	18,16 <sup>AB</sup>	17,3 <sup>AB</sup>	0,88	0,03
<i>Jejuno</i>							
Profundidade de cripta (µm)	76,2	41,2	47,8	49,8	56,8	11,26	0,25
Altura de vilosidades (µm)	262,7	221,9	223,8	221,9	246,9	12,75	0,10
Largura de vilosidades (µm)	52,9 <sup>A</sup>	38,2 <sup>B</sup>	45,8 <sup>AB</sup>	45,1 <sup>AB</sup>	45,0 <sup>AB</sup>	2,96	0,03
HASA (µm <sup>2</sup> )	8,16	9,05	8,46	8,67	9,61	0,40	0,13
<i>Íleo</i>							
Profundidade de cripta (µm)	38,9 <sup>B</sup>	48,5 <sup>B</sup>	46,4 <sup>B</sup>	51,4 <sup>B</sup>	61,2 <sup>A</sup>	3,35	0,01
Altura de vilosidades (µm)	227,8	249,2	219,6	224,6	228,0	8,28	0,15
Largura de vilosidades (µm)	36,3	43,7	42,3	46,2	47,2	2,87	0,10
HASA (µm <sup>2</sup> )	8,64	9,28	9,42	9,52	9,59	0,50	0,69
<i>- Dia 21 -</i>							
<i>Duodeno</i>							
Profundidade de cripta (µm)	168,3	128,9	147,9	152,6	136,8	14,23	0,09
Altura de vilosidades (µm)	1003,7	941,5	118,6	1177,8	1022,7	108,6	0,12
Largura de vilosidades (µm)	117,5	127,9	109,7	105,6	110,2	10,94	0,31
HASA (µm <sup>2</sup> )	16,0	14,9	18,8	18,2	17,3	1,34	0,06
<i>Jejuno</i>							
Profundidade de cripta (µm)	173,8 <sup>A</sup>	103,6 <sup>B</sup>	110,3 <sup>B</sup>	149,1 <sup>AB</sup>	119,9 <sup>B</sup>	17,30	0,01
Altura de vilosidades (µm)	1083,5 <sup>A</sup>	775,3 <sup>B</sup>	891,1 <sup>B</sup>	991,1 <sup>B</sup>	696,7 <sup>B</sup>	79,40	0,01
Largura de vilosidades (µm)	98,1	106,2	103,0	91,5	98,0	8,17	0,45
HASA (µm <sup>2</sup> )	18,5 <sup>A</sup>	15,2 <sup>B</sup>	20,2 <sup>A</sup>	18,8 <sup>A</sup>	16,6 <sup>AB</sup>	1,27	0,01
<i>Íleo</i>							
Profundidade de cripta (µm)	104,1	103,1	98,0	104,9	100,8	14,40	0,98
Altura de vilosidades (µm)	629,1	614,7	546,3	770,4	630,2	53,30	0,09
Largura de vilosidades (µm)	88,4	101,0	81,8	82,8	85,2	5,72	0,15
HASA (µm <sup>2</sup> )	12,9 <sup>AB</sup>	11,2 <sup>B</sup>	15,5 <sup>AB</sup>	16,7 <sup>A</sup>	16,0 <sup>AB</sup>	1,29	0,03

Tratamentos C: Controle, ovos intactos; SS: solução salina; AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados

HASA: Área histológica da superfície de absorção (µm<sup>2</sup>),

<sup>A, B</sup> Médias seguidas de letras distintas em uma mesma linha diferem pelo teste de SNK (P<0,05),

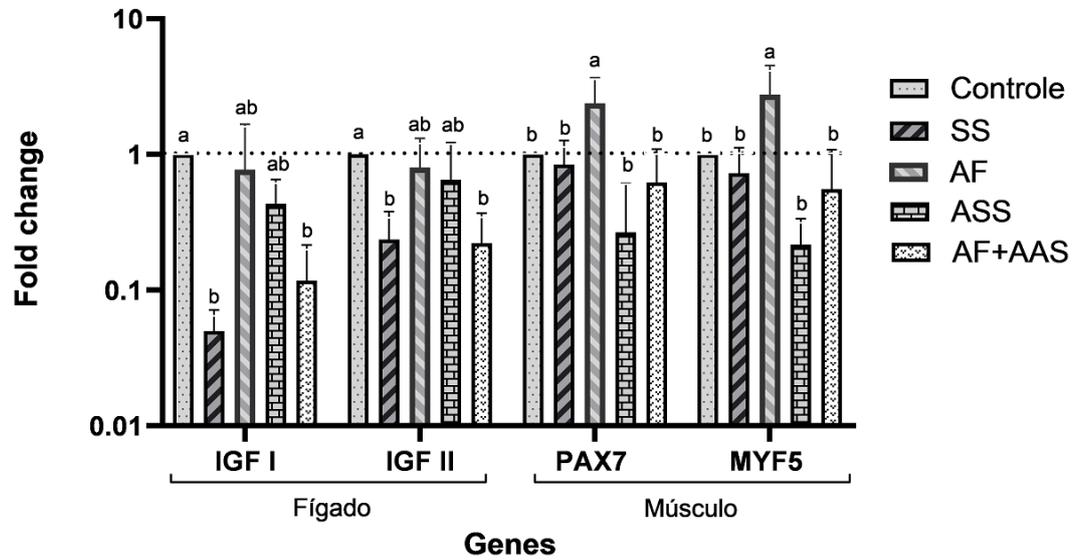
Tabela 7, Diâmetro de fibras musculares e qualidade da carne de frangos de corte provenientes de ovos injetados com diferentes substâncias no primeiro dia de incubação,

Variável	Tratamentos*					SEM	P-Valor
	C	SS	AF	AAS	AF+ AAS		
Número células (mm <sup>2</sup> ) no dia 1	27,0	26,8	30,2	23,2	23,3	2,93	0,43
DFM no dia 1 (µm)	4,37	4,71	4,88	5,45	6,04	0,48	0,13
DFM no dia 21 (µm)	34,5	37,6	35,9	35,5	38,5	2,28	0,74
DFM no dia 42 (µm)	79,8 <sup>AB</sup>	69,2 <sup>B</sup>	88,9 <sup>A</sup>	70,9 <sup>B</sup>	78,1 <sup>AB</sup>	3,84	0,01
Aparência da carne							
L (luminosidade)	47,1	46,6	46,9	46,8	46,6	0,78	0,98
A (teor de vermelho)	3,35	3,93	3,93	4,23	4,10	0,45	0,61
B (teor de amarelo)	7,9	8,71	8,75	8,6	8,63	0,63	0,87

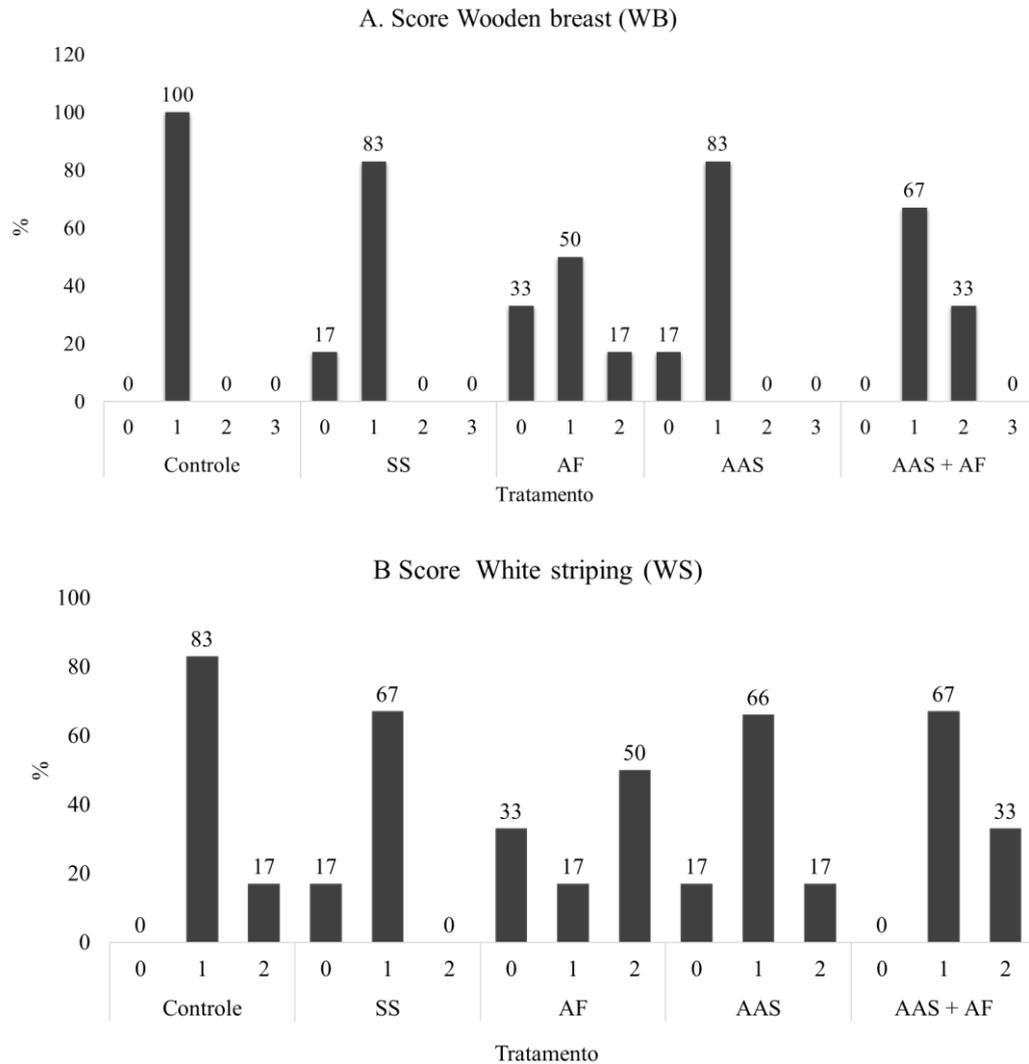
Tratamentos: C: controle: ovos intactos; SS: solução salina; AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados,

DFM: Diâmetro em micrômetros da seção transversal das fibras musculares.

<sup>A, B</sup> Médias seguidas de letras distintas em uma mesma linha diferem pelo teste de SNK (P<0,05).



**Figura 1.** Efeitos da injeção *in ovo* de aminoácidos sulfurados e ácido fólico na expressão de mRNA de IGF1 e 2 no fígado e de PAX7 e MYF5 no músculo de frangos pós-eclosão, Barras com letras diferentes diferem pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ), \*Tratamentos: Controle: ovos intactos; SS: solução salina, AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados



**Figura 2.** Incidência de miopatias peitoral de frangos de corte aos 42 dias de idade, provenientes de ovos intactos e ovos injetados com diferentes substâncias no primeiro dia de incubação, **A** Wooden breast (WB) escore 0 normal, ausência de dureza e de palidez, 1- Presença suave de dureza e/ou palidez, filé levemente afetado nas áreas caudal e/ou cranial e 2 - presença moderada de dureza e/ou palidez, moderadamente afetado ao longo dos filés 3 – grave, filés com hemorragia superficial e presença de exsudato estéril na superfície muscular, **B** White striping (WS): escore 0 normal, sem quaisquer linhas brancas distintas, escore 1 – moderado, apresentando linhas brancas paralelas às fibras musculares, com espessura menor do que 1 mm; e escore 2 – grave: exibindo linhas brancas paralelas às fibras musculares, com espessura maior que 1 mm-

\*Tratamentos: Controle: ovos intactos; SS: solução salina, AF: ácido fólico; AAS: aminoácidos sulfurados; AF + AAS: ácido fólico + aminoácidos sulfurados.