

MORFOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO DE TÍBIAS DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS À DIETA COM 25 HIDROXICOLECALCIFEROL

Roselaine Ponso¹, Rodrigo Garófallo Garcia², Ibiara Correia de Lima Almeida Paz³, Nilsa Duarte da Silva Lima⁴, Rita de Kássia Silva dos Santos⁴

1. Bolsista DCR – Fundect/CNPQ (roselaineponso@ufgd.edu.br)
2. Docente da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados - MS
3. Docente da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – UNESP, *campus* Botucatu - SP
4. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados – MS

Recebido em: 30/09/2013 – Aprovado em: 08/11/2013 – Publicado em: 01/12/2013

RESUMO

O sucesso da avicultura de corte deve-se em parte a nutrição, sendo que nas últimas décadas, o ganho de peso médio diário aumentou e decorrente a isso aumentou também a incidência de problemas locomotores. A utilização de vitamina D tem sido amplamente estudada na avicultura, na tentativa de diminuir os prejuízos causados por problemas locomotores. A compreensão dos inúmeros fatores nutricionais envolvidos no desenvolvimento ósseo, como deficiências de vitaminas e minerais são de suma importância na ocorrência de distúrbios esqueléticos. A vitamina D₃ na avicultura tem sido amplamente utilizada na diminuição da incidência de algumas distúrbios metabólicos das aves de rápido crescimento, dentre elas a displasia tibial. Recentes pesquisas têm apontado exigências de vitamina D₃ para favorecer o crescimento, aumentar o conteúdo de cinzas dos ossos, a quantidade de cálcio no sangue, e prevenir o raquitismo. Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar aspectos morfológicos e histológicos de ossos de frangos de corte e o desenvolvimento de displasia tibial, suplementados com vitamina D. Foram utilizados 468 pintos machos de um dia, de três linhagens comerciais, criados em baterias metálicas. Distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, alocados em esquema fatorial 3x3 (três linhagens: Ross, Cobb e Hybro; três níveis de inclusão de vitamina D₃ na dieta: 1250UI D₃/kg sem 25-(OH)D₃; 1250UI D₃/kg com 69mg 25-(OH)D₃/t e 3000UI D₃/kg com 69mg 25-(OH)D₃/t). As análises morfológicas e histológicas demonstraram que os tratamentos não influenciaram o desenvolvimento de displasia tibial, já que as aves não apresentaram este distúrbio. Concluiu-se que, mesmo sendo criados em baterias metálicas, os ossos de frangos de corte, apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade, independentemente dos níveis de vitamina D₃ na dieta e das linhagens estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: condrócitos, discondroplasia, problemas locomotores, vitamina D.

EVALUATION OF BONE MORPHOLOGY OF BROILERS SUBMITTED TO A DIET WITH 25 HYDROXYCHOLECALCIFEROL

ABSTRACT

The success of the poultry industry is due in part to nutrition, and in recent decades, the average daily weight gain increased and due to this the incidence of leg weakness. The use of vitamin D has been widely studied in poultry in an attempt to reduce the damage caused by locomotor problems. Understanding the numerous nutritional factors involved in bone development, such as deficiencies of vitamins and minerals, are of paramount importance in the occurrence of skeletal disorders. Vitamin D3 in poultry has been widely used to decrease the incidence of certain metabolic disorders of the fast-growing birds, among them the tibial dyschondroplasia. Recent research has indicated requirements of vitamin D3 for increasing growth, increasing the ash content of bone, the amount of calcium in the blood, and preventing rickets. Thus, this work was to evaluate morphological and histological bone of broilers and the development of tibial dyschondroplasia, supplemented with vitamin D. We used 468 male chicks a day, three commercial strains reared in cages. Distributed in a completely randomized, allocated in a factorial 3x3 (three strains: Ross, Cobb and Hybro, three inclusion levels of vitamin D3 in the diet: 1250UI D3/kg without 25 - (OH) D3; 1250UI D3/kg with 69mg 25 - (OH) D3/te 3000IU D3/kg with 69mg 25 - (OH) D3 / t). The morphological and histological analysis showed that the treatment did not affect the development of tibial discrondroplasia, since the birds did not have this disorder. It was concluded that, even being raised in battery cages, bones bones of broilers were within normal limits, regardless of the levels of vitamin D3 in the diet and the strains studied.

KEYWORDS: chondrocytes, dyschondroplasia, locomotor disorders, vitamin D.

INTRODUÇÃO

Na agropecuária, a avicultura foi a atividade que mais evoluiu nas últimas décadas. Teve como evolução o suporte na melhoria constante no desempenho das linhagens, pela seleção artificial e pelo melhoramento nas condições de alimentação, manejo, instalações, sanidade, processamento e comercialização. Segundo MENDES et al. (2010), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro maior exportador de carne de frango. Em termos de competitividade e qualidade, o país produz hoje o frango de melhor qualidade e com preço muito acessível.

Na produção avícola, a locomoção correta dos frangos é essencial, pois tem um papel central no desempenho produtivo da ave. Associado aos problemas de locomoção tem-se causas infecciosas e não infecciosas, que

afetam a “saúde” do membro pélvico das aves (OVIEDO-RONDÓN, 2009a). As perdas não se resumem ao aumento da mortalidade e triagem na produção, em virtude das perdas em vida, serem apenas uma pequena parte do impacto econômico destes problemas. O aumento das rejeições em abatedouro devido a processos inflamatórios cutâneos e articulares, dermatites químicas e de escoriações devido ao excesso de decúbito, aumento da contaminação dos animais diminuindo a segurança alimentar e problemas na linha de abate ocupam a grande fatia nas perdas econômicas causadas pelos problemas de pernas.

Estatísticas atuais sugerem que, rejeições totais ou parciais de carcaça, devido a problemas de perna, aumentam significativamente o custo por quilograma de peso vivo do frango (OVIEDO-RONDÓN, 2009b). A compreensão dos inúmeros fatores nutricionais envolvidos no desenvolvimento ósseo e suas características morfológicas é de suma importância na ocorrência de distúrbios esqueléticos (DAS et al., 2011). Com a seleção genética voltada para o alto ganho de peso e elevadas taxas de crescimento, tem-se depositado grandes cargas sobre ossos e articulações relativamente imaturos.

Na avicultura industrial, existe uma constante busca de conhecimento das diferentes patologias e dos procedimentos técnicos para preveni-las ou curá-las, permitindo viabilizar a intensificação da produção animal. O melhoramento genético, a compreensão das necessidades nutricionais, bem como, o balanceamento das rações, também são fundamentais e tem permitido um aumento da eficiência zootécnica desses animais, sendo assim, o sucesso da avicultura de corte decorre, em grande parte, da nutrição (TORRES et al., 2009).

O desenvolvimento do tecido ósseo das aves de rápido crescimento não tem acompanhado os processos fisiológicos, aumentando a incidência de problemas locomotores, entre eles, a discondroplasia tibial, uma anormalidade metabólica causada pela formação de massa anormal de cartilagem não vascularizada, pouco mineralizada na metáfise da extremidade proximal da tíbia (TALATY et al, 2009).

O uso da vitamina D₃ na avicultura tem despertado grande interesse dos pesquisadores nos últimos anos devido, principalmente, à sua capacidade de induzir a diferenciação de condrócitos, controle do crescimento ósseo, prevenção do raquitismo e diminuição da incidência de problemas locomotores.

A literatura relata que a inclusão de níveis adequados de minerais e vitaminas na dieta podem diminuir as lesões locomotoras em aves de produção (ALMEIDA PAZ et al., 2010). Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a inclusão de vitamina D na dieta de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade e avaliar o aspecto morfológico do desenvolvimento de discondroplasia tibial, a qualidade óssea de frangos de corte suplementados com vitamina D₃ na dieta utilizando-se a histologia e microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizados 468 pintos machos de três linhagens comerciais, criados em baterias metálicas com quatro repetições cada, no período de janeiro a junho e aprovado pelo comitê de ética de uso animais da CEUA/UFGD, Protocolo nº 009/2013. Os animais foram distribuídos em

delineamento inteiramente casualizado, alocados em esquema fatorial 3x3 (três linhagens: Ross, Cobb e Hybro; três níveis de inclusão de vitamina D: 1250UI D₃/kg sem 25-(OH)D₃; 1250UI D₃/kg com 69mg 25-(OH)D₃/t e 3000UI D₃/kg com 69mg 25-(OH)D₃/t). Aos sete e 14 dias, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e aos 21 dias foram insensibilizadas por eletronarcore, sendo posteriormente abatidas por sangria.

Procedeu-se então, a retirada do material para avaliação macroscópica e análise histológica. As tíbias direitas foram incisadas com bisturi em cortes longitudinais, divididas em paquímeros ventral e dorsal, sendo paquímero dorsal imerso em solução fixadora de Bouin, para estudos de morfologia, conforme a rotina de inclusão em parafina. Posteriormente, estes foram corados por hematoxilina-eosina, para a observação e descrição histológica dos ossos. No paquímero dorsal das tíbias foram realizadas análises histológicas, e não apresentaram achados significativos, portanto, para confecção das imagens de microscopia eletrônica foram colhidas amostras aleatoriamente. As amostras das tíbias foram processadas para microscopia eletrônica de varredura.

Para a microscopia eletrônica, os fragmentos ósseos foram coletados e acondicionados em frascos, contendo solução conservadora de glutaraldeído 4%, os quais foram lavados por seis vezes consecutivas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 3 horas e então pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2%, durante 30 minutos, à temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram novamente lavadas com o mesmo tampão por seis vezes consecutivas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (30, 50, 70, 80, 90 e 100%), 20 minutos em cada concentração, sendo que, na última, as amostras foram lavadas por três vezes consecutivas, 20 minutos em cada lavagem. Depois de cada desidratação, o material passou pela câmara de secagem do secador de ponto crítico, mediante a utilização de dióxido de carbono. O material foi então montado em porta objeto apropriado, recoberto com uma camada de 30 nm de ouro e finalmente eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura (Modelo Jeol JSM 54 10), operando em 15 KV.

Para as análises histológicas, foram colhidas amostras da tíbia de uma ave por repetição de tratamento aos 7, 14, e 21 dias de idade. As aves foram sacrificadas por deslocamento cervical, quando se procedeu a retirada do material para análises histológicas e microscopia eletrônica de varredura. As tíbias foram removidas e dissecadas, a tíbia direita foi imediatamente fixada para histologia e microscopia eletrônica. As tíbias direitas foram incisadas com bisturi em cortes longitudinais, divididas em paquímeros ventral e dorsal, sendo o paquímero ventral imerso em fixador primário de glutaraldeído 2,5% e o paquímero dorsal imerso em solução fixadora de Bouin para estudos de morfologia. A solução fixadora de Bouin foi preparada para que atingisse uma concentração de 2,5% de formol. Para cada 100 ml dessa solução, utilizou-se 75 mL de ácido pícrico, 25 mL de formol a 40% e 5 ml de ácido acético glacial. Os fragmentos ósseos coletados para análise permaneceram nessa solução por 24 horas. Em seguida, foram mantidos em álcool 70%, até o momento do processamento. O material fixado em solução fixadora de Bouin seguiu a rotina de inclusão em parafina e corte em micrótomo Spencer de secções de 5 µm, onde foram corados por hematoxilina-eosina, para a observação e descrição histológica dos ossos. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, obtendo-se imagens das mesmas através do programa Kontron KS 400 3.0 µm

microscópio Olympus DX 60 acoplado a câmara Axio CAN HRc, utilizando o programa de análise de imagem KONTRON KS 400 Zeiss®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independente dos tratamentos estudados não houve diferença ($p < 0,05$) para as características avaliadas. O exame de microscopia eletrônica de varredura da extremidade proximal das tíbias de aves, suplementadas com 3000 UI/kg de 25 hidroxicolecalciferol, apresentou tecido ósseo normal e estrutura trabecular no tecido denso (Figuras 1 A e B).

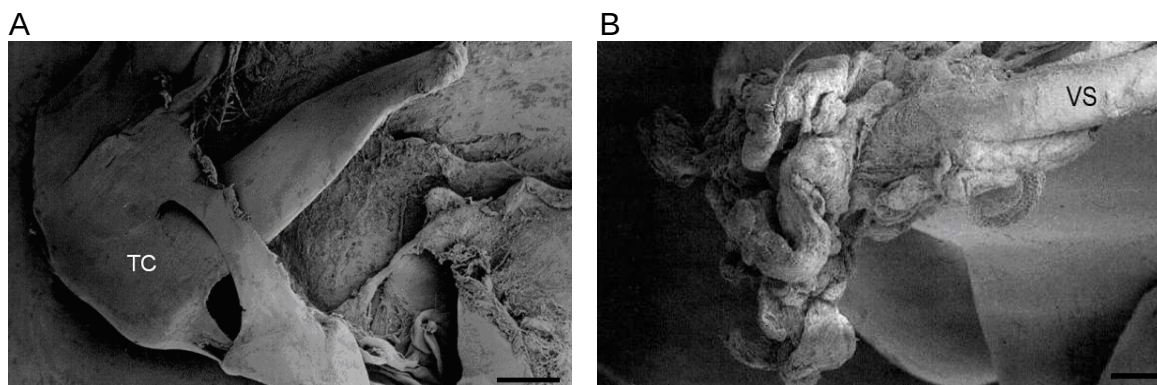


FIGURA 1 - A: eletromicrografia de Varredura, de osso de frango aos 21 dias, ilustrando tecido ósseo com a presença de tecido cartilaginoso (TC) em sua extremidade. 1.500x. B: eletromicrografia de Varredura, de osso de frango aos 21 dias, ilustrando a presença de vaso sanguíneo (VS), demonstrando vascularização normal, penetrando na zona de crescimento. 1500x.

As fibras paralelas com intensa concentração de tecido cartilaginoso, identificando a integridade da linha de crescimento, e presença constante de vasos sanguíneos, confirmam a ausência de DT, já que segundo MENDONÇA JÚNIOR (2009), as lesões encontradas na DT são avasculares, podendo ser encontradas algumas áreas de necrose.

Os resultados indicam presença de vasos sanguíneos, tecido ósseo e cartilaginoso, hipertrofia completa do condrócitos, que atingiram o tamanho esperado e não sofreram mudanças degenerativas, corroborando com os resultados de KHAN et al. (2010). Entretanto, na presente pesquisa, foi observada vascularização sanguínea e proliferação de tecido cartilaginoso, o que evidencia a ausência de discondroplasia tibial, por se tratar de uma massa de cartilagem avascular (TALATY et al., 2009). Todas as tíbias encontraram-se dentro dos padrões ótimos de desenvolvimento. Os resultados dos exames macroscópicos foram confirmados sob aspecto histológico.

Nas Figuras 2 A e B observa-se a formação da cartilagem, com penetração vascular, não caracterizando a presença de discondroplasia tibial, assim como a zona de transição e início de formação do tecido osteóide, mineralização e zona de transição entre cartilagem e osso, e um acúmulo de cartilagem avascular, composta de condrócitos não maduros, pequenas lacunas

ovóides e com uma quantidade muito maior de matriz, do que a cartilagem hipertrófica. De acordo com TAKITA (1998), apud ALMEIDA (2003), a placa de crescimento foi dividida em zona proliferativa, zona pré- hipertrófica e zona hipertrófica, sendo-lhe atribuídos os seguintes escores: 0 (zero) - placas de crescimento normal, com as três regiões bem distintas; o escore 1 - representou placas de crescimento com regiões de acúmulo de condrócitos pré-hipertróficos; escore 2 - indicou placas de crescimento com uma banda larga e distinta de condrócitos pré-hipertróficos; no escore 3 - encontram-se as placas de crescimento que apresentaram mudanças degenerativas nas células.

Essa caracterização de tecido ósseo normal sem a presença de lesões concernentes à DT, está de acordo com as afirmações de BORGES et al. (2010), que mostrou uma marcante redução da DT em frangos alimentados com diferentes níveis de 1,25-dihidroxicolicalciferol $1,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ revelando que a placa de crescimento da tíbia mostrou acúmulos de condrócitos transicionais, o que confirma a hipótese de que a causa da discondroplasia, seja uma falha na diferenciação de condrócitos. No entanto, muitos autores relatam que a inclusão de metabólitos 1-hidroxilados em dietas de frangos de corte é eficiente na promoção adequada da diferenciação de condrócitos, reduzindo o aparecimento de distúrbios ósseos (THABET, 2009).

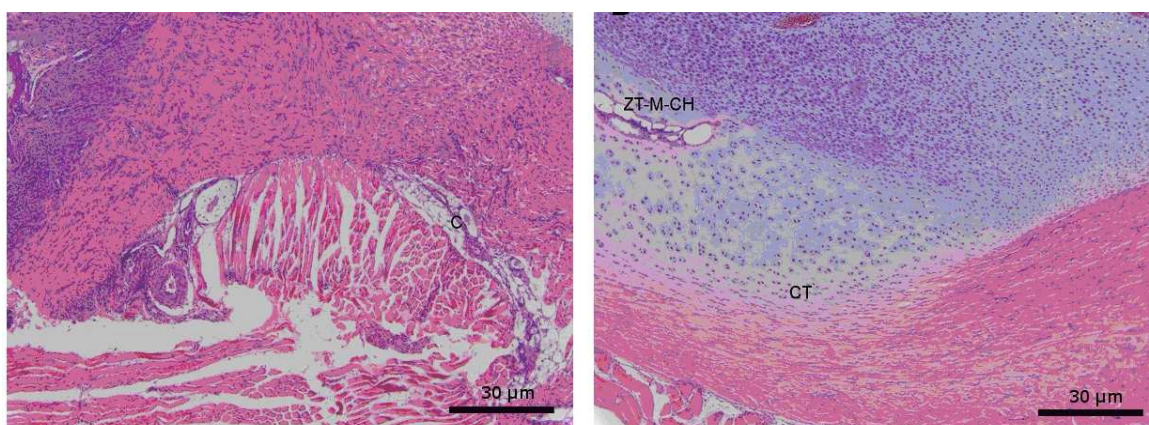


FIGURA 2 – Em A: fotomicrografia de corte transversal da tíbia de frango de corte aos 14 dias de idade, descalcificada e corada pela técnica da hematoxilina e eosina. Em B: fotomicrografia de corte transversal da tíbia de frango de corte aos 14 dias de idade, descalcificada e corada pela técnica da hematoxilina e eosina.

CONCLUSÕES

À luz da microscopia eletrônica e da histologia, verificou-se que, mesmo sendo criadas em baterias metálicas, as aves tiveram bom desenvolvimento ósseo, sem apresentar discondroplasia tibial, independentemente dos níveis de vitamina D_3 na dieta e da linhagem estudada, demonstrando que níveis mínimos já impedem o desenvolvimento de patologias ósseas.

AGRADECIMENTOS

FUNDECT/CNPQ pelo apoio financeiro e UFGD e USP/FZEA, pelas instalações utilizadas nesse experimento.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA PAZ, I. C. L.; GARCIA, R. G.; BERNARDI, R.; NÄÄS, I. A.; CALDARA, F. R.; FREITAS, L. W.; SENO, L. O.; FERREIRA, V. M. O. S.; PEREIRA, D. F.; CAVICHIOLO, F. Selecting appropriate bedding to reduce locomotion problems in broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, n. 12, p. 189-195, 2010.

ALMEIDA, I. C. L. **Caracterização da Discondroplasia Tibial em Frangos de Corte Através da Densitometria Óptica Radiográfica**. 2003. 53 f. Dissertação (Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu, São Paulo.

BORGES, L. L.; BARALDI-ARTONI, S. M.; AMOROSO, L. Densidade Mineral Óssea na Produção de Frango de Corte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – ISSN: 1679-7353 Ano VIII – n. 15 – Periódicos Semestral, Julho de 2010.

DAS, S.; PALAI, T. K.; MISHRA, S. R.; DAS, D.; JENA, B. Nutrition in Relation to Diseases and Heat stress in Poultry. **Veterinary World**, Gujarat, v. 4, n. 9, p. 429-432, 2011.

KHAN, S. H.; SHAHID, R.; MIAN, A. A.; SARDAR, R.; ANJUM, M. A. Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, n. 5, p. 584–593, 2010.

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.A.; NÄÄS, I. de A.; MACARI, M. (Ed.). **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2010. p.1-22.

OVIEDO-RONDÓN E. “El Sistema de Producción Avícola de Carne : 1. El Modelo Americano” XXV Curso de Especialización FEDNA: Avances En Nutrición Y Alimentación Animal. Saragoza, 2009a, 12 p.

OVIEDO-RONDÓN E. “Aspectos Nutricionales que Influyen Sobre La Incidencia de Problemas de Patas En Pollos de Engorde”, XXV Curso de Especialización. 2009b, 15p.

TAKITA, T. S.; GONZALES, E.; LODDI, M. M.; RAMOS, A. A. Métodos de avaliação de discondroplasia tibial em frangos de corte . In **Conferencia apinco**

de ciência e tecnologia avícolas, 1998, Campinas, **Anais...** Campinas: Facta. 1998.

TALATY, P. N.; KATANBAF, M. N.; HESTER, P. Y. Variability in bone mineralization among purebred lines of meat-type chickens. **Poultry science**, Oklahoma, v. 88, n. 9, p. 1963-1974, 2009.

THABET, H. A. Effect of high levels of cholecalciferol on performance, some blood constituents, bone quality and mineral retention in broiler chicks fed low levels of calcium and phosphorus. **Journal Agriculture Science**, Mansoura, v. 34, n. 12, p. 11011-11020, 2009.

TORRES, C. A.; VIEIRA, S. L.; REIS, R. N.; FERREIRA, A. K.; SILVA, P. X.; FURTADO, F. V. F. Desempenho produtivo de reprodutoras de frangos de corte sob suplementação com 25-hidroxicolecalciferol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 1286-1290, 2009.