

ANEXO 1 - MINUTA DE PROJETO DE PESQUISA

1 – IDENTIFICAÇÃO:

1.1 Nome do Solicitante: **Marcelo Leite da Veiga**
1.2 Matrícula SIAPE: **1728692**
1.3 E-mail de contato: **marcelo.lv@ufsm.br**

2 – DADOS DO PROJETO:

2.1 Título: **Desenvolvimento dos tecidos extra e intraembrionários de ovos fertilizados de frangos das raças Plymouth Rock White, Plymouth Rock Barrado e Rhode Island Red, com e sem a inoculação com cantaxantina.**
2.2 Registro UFSM: **059232**

3 – CARACTERIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA:

Devido ao constante progresso genético que vem ocorrendo nas linhagens avícolas destinadas à produção de carne, o tempo de abate do frango de corte foi consideravelmente reduzido. Com isso o período de incubação se torna cada vez mais importante, representando cerca de 30% do período de vida do animal. Portanto, limitações no desenvolvimento neonatal podem implicar em um baixo desempenho do frango (RONDÓN e MURAKAMI, 2008).

A última fase da incubação, prenhez e nascimento é um dos períodos de maior impacto no crescimento pós-natal dos vertebrados, já que ocorre uma mudança drástica de um ambiente aquoso protegido para um meio aeróbico totalmente distinto. Esta fase nas aves inclui absorção de água, retração do saco vitelino, maturação funcional do pulmão, desenvolvimento do trato gastrointestinal com foco no crescimento de vilos e maturação de enterócitos, transição de uma respiração cório-alantóide para uma pulmonar, bicagem e nascimento, ocorrendo ao mesmo tempo um desenvolvimento da resposta homeotérmica (DECUYPERE et al., 1991).

Após a eclosão as aves apresentam funções digestivas limitadas, o que diminui a disponibilidade de nutrientes para seu crescimento, embora sua capacidade digestiva comece a se desenvolver quando o fluido amniótico é oralmente consumido, por volta do 17º dia de incubação (UNI et al., 2003a). Por não possuírem desenvolvida a microflora intestinal, os pintos são muito susceptíveis à colonização por patógenos acarretando no desenvolvimento de doenças, agregando isso ao menor tamanho de órgãos imunitários devido ao desenvolvimento genético avançado e a falta de produção de linfócitos devido ao jejum pós-eclosão. A camada de muco do epitélio intestinal é a primeira barreira física contra infecções. O desenvolvimento da mucosa intestinal, assim como das enzimas digestivas e das vilosidades intestinais, é estimulado pelo acesso precoce do pinto ao alimento.

Assim, para a melhor utilização da técnica de inoculação in ovo é necessário se conhecer as características morfológicas dos tecidos extra e intraembrionários de ovos fertilizados e determinar o estágio ótimo de inoculação com cantaxantina, que disponibilize nutrientes ao embrião, forneça maior eficiência digestiva e diminua as taxas de morbidez e mortalidade após a eclosão.

A literatura científica apresenta vantagens da suplementação pela cantaxantina na dieta de Gallus gallus (GARCIA et al., 2002; FERREIRA, 2010; SANTOS, 2011; ROCHA, 2011; ROSA et al., 2012; ROCHA et al., 2013; TRIQUES, 2014; FORGIARINI, 2015; ARAÚJO, 2017; LUCCA, 2017; ORSO, 2017; CESCO, 2019; ARAÚJO et al., 2020; MIRANDA et al., 2021). No entanto, o custo dessa suplementação é alto, visto a pequena quantidade que efetivamente chega ao embrião.

Estudos prévios testaram diferentes quantidades de cantaxantina inoculadas in ovo, via cavidade amniótica. Araújo (2020) testou a concentração ideal de cantaxantina a ser inoculada no dia 17, utilizando 156 ovos por dose, concluindo que a dose de 0,035mg foi a mais promissora. Entretanto, com formulação comercial utilizada não seria recomendado seu uso, possivelmente por outros componentes associados. Como foi observado ganho do estado oxidativo, pode-se supor que uma formulação diferente e a inoculação em outro dia poderiam ser vantajosas, uma vez que reduziriam os custos de aquisição da cantaxantina e otimizariam os resultados.

Assim, para a melhor utilização da técnica de inoculação in ovo é necessário se conhecer as características morfológicas dos tecidos extra e intraembrionários de ovos fertilizados e determinar o estágio ótimo de inoculação com cantaxantina, que disponibilize nutrientes ao embrião, forneça maior eficiência digestiva e diminua as taxas de morbidez e mortalidade após a eclosão.

4 – OBJETIVOS E METAS:

OBJETIVO GERAL

Descrever comparativamente as características morfológicas de tecidos extra e intraembrionários de ovos fertilizados de frangos das raças Plymouth Rock White, Plymouth Rock Barrado e Rhode Island Red e determinar o estágio ótimo de inoculação com cantaxantina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever comparativamente diferentes aspectos morfoestruturais das membranas extraembrionárias e de diferentes tecidos intraembrionários de frangos das raças Plymouth Rock White, Plymouth Rock Barrado e Rhode Island Red.
- Avaliar a composição celular e de matriz tissular, bem como as características vasculares das membranas extraembrionárias nos períodos de incubação e eclosão, com e sem inoculação in ovo de cantaxantina.
- Caracterizar histologicamente as membranas extraembrionárias nos períodos de incubação e eclosão de ovos das raças estudadas com e sem suplementação pela cantaxantina.

5 – METODOLOGIA:

Neste projeto, durante o ano de 2023 foi realizado o ensaio experimental, onde foram atendidas as primeiras etapas, em especial a análise macroscópica e a colheita das biopsias. No ano de 2024 foi realizada a inclusão em parafina de todas as amostras coletadas e realizadas as análises morfométricas que caracterizam os aspectos vasculares da membrana corioalantóica. No corrente está planejado o processamento histológico das demais amostras de membranas extraembrionárias e a realização dos protocolos histoquímicos para quantificação de glicogênio, mucinas e dos colágenos tipo I e III.

No bioensaio foram utilizados ovos fertilizados de poedeiras das raças Plymouth Rock White, Plymouth Rock Barrado e Rhode Island Red provenientes do Laboratório de Avicultura da Universidade Federal de Santa Maria. Estes ovos fertilizados são produzidos e disponibilizados a fim promover a melhoria da qualidade do plantel de galinhas poedeiras e de corte dos produtores de pequeno e médio porte do sul do Brasil, ao disponibilizar novas linhagens melhoradas, de alto valor zootécnico, com diferentes genótipos e alta heterozigosidade.

Incubação, inoculação e coleta

No próprio LAVIC, os ovos fertilizados foram colocados em incubadora comercial onde permaneceram até o dia da coleta. Diariamente foram colhidos 10 ovos de cada raça, totalizando 510 ovos até o dia 17. Nos dias 17, 18 e 19, foi administrada a cantaxantina na metade dos ovos incubados (“in ovo”), a fim de verificar o melhor dia de inoculação. Do dia 18 ao 21, foram colhidas amostras de 10 ovos de cada raça suplementados com cantaxantina e 10 sem suplementação, logo, 60 ovos por dia, totalizando 240 ovos durante este período. Somando os dois períodos o número total de ovos fertilizados e em desenvolvimento embrionário projetado foi de 750.

A técnica de inoculação utilizada foi a apresentada em diversos estudos da área, que consiste em higienizar a região da câmara de ar de cada ovo com álcool iodado (2%) e perfurar na região com a agulha 7x2,5 mm, até atravessar a membrana interna do ovo e alcançar o líquido amniótico, inoculando 0,3 mL de solução. Este valor foi o menor dentre todos da literatura consultada (LEITÃO, et al. 2008; LEANDRO, et al. 2010; LEITÃO, et al. 2010; CAMPOS, et al. 2011 e ARAÚJO et al. 2020). Assim, na presente proposta, foi utilizada a dose de 0,035mg, previamente testado por Araújo, et al. (2020), desprovida de lignosulfonatos aglutinantes e nos dias 17, 18 e 19 de incubação.

Ao serem retirados da incubadora, os ovos fertilizados foram levados ao Laboratório de Morfofisiologia Experimental e Comparada (LABITEX), do Departamento de Morfologia, do Centro de Ciências da Saúde da UFSM, onde foram colhidas as estruturas propostas e realizados os processamentos e análises derivadas.

Para a eutanásia dos embriões foram utilizadas as recomendações do Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais, referendado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e pelo CONCEA, utilizadas nas pesquisas desenvolvidas no país, que são: ovos embrionados até 14 dias, resfriamento por submersão em água com gelo (0 a 4°C) por 20 minutos seguido de decapitação; ovos embrionados acima de 15 dias, exposição ao CO₂ seguido de decapitação.

Análises microscópicas

Das membranas vitelínica, coriônica e alantóica foram coletadas amostras, imediatamente submetidas ao processo de fixação pelo formaldeído. Estas passarão pelo processamento histológico padrão, a saber, desidratação em álcool, diafanização por xilol, inclusão em parafina histológica e microtomia.

As lâminas histológicas resultantes serão submetidas aos protocolos histoquímicos da reação ao Ácido periódico de Schiff (PAS), alcian blue e picrossírius.

Coleta de imagens

Para as análises microscópicas serão obtidas fotomicrografias das lâminas histológicas no microscópio Zeiss (AxioScope A1-AX10, câmera Axioscan 305), as quais serão submetidas a morfometria dos diferentes parâmetros, segundo o órgão.

Análise estatística

Os dados quantitativos morfométricos obtidos serão submetidos a estatística descritiva e testes de comparação entre grupos estudados. Assim, será realizado o teste de normalidade das variáveis (Kolmogorov-Smirnov) seguido da comparação entre as médias (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). Valores de p bicaudal < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas serão realizadas no programa GraphPad Prism 8.0.

6 – RESULTADOS E/OU IMPACTOS ESPERADOS:

Ao final do projeto espera-se haver descrito, por primeira vez, as características morfológicas dos tecidos extraembrionários de ovos fertilizados de frangos das raças Plymouth Rock White, Plymouth Rock Barrado e Rhode Island Red e determinar o estágio ótimo de inoculação com cantaxantina.

Também se pretende publicar artigos estabelecendo os valores de correlação entre raça e as medidas anatômicas de peso do ovo, peso corporal do animal e peso dos órgãos internos, além de caracterizar histologicamente os períodos de incubação e eclosão de frangos das raças estudadas com e sem suplementação pela cantaxantina; especificamente das membranas extraembrionárias.

7 – CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO REFERENTE AO PERÍODO DO EDITAL:

Ação	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
Manter atualizado o referencial teórico do projeto	X	X	X	X	X	X	X	X
Microtomia e processamento histoquímico das lâminas histológicas das amostras das membranas vitelínica, coriônica e alantóica			X	X	X	X	X	
Elaboração do resumo para congresso, apresentando os resultados macroscópicos								X
Elaboração do artigo apresentando os resultados macroscópicos e das membranas extraembrionários								X

8 – ORÇAMENTO:

8.1 – Bolsa (349018) = R\$ 4.000,00

Obs: Caso solicitar bolsa, descreva o PLANO DE TRABALHO do bolsista referente ao cronograma submetido na minuta do projeto e preencha o TERMO DE COMPROMISSO em atenção à Resolução 023/2008 – CNPq

PLANO DE TRABALHO

As atividades planejadas para o bolsista visam à formação plena das capacidades inerentes à atividade de pesquisa esperadas de um aluno de graduação. Para isto ele deverá cumprir o plano de trabalho abaixo.

Etapas	Descrição	Início	Final
Bibliografia	Manter atualizado o referencial teórico do projeto	05/2024	12/2024
Microscopia	Microtomia e histoquímicas das lâminas histológicas das amostras das membranas vitelínica, coriônica e alantóica	07/2024	12/2024
Resumo	Elaboração do resumo para congresso, apresentando os resultados microscópicos	12/2024	12/2024
Artigo	Elaboração do artigo apresentando os resultados microscópicos e das membranas extraembrionários	12/2024	12/2024
Bibliografia	Manter atualizado o referencial teórico do projeto	05/2024	12/2024

8.2 – Material de Consumo (349030) = R\$ 0,00

Detalhamento e justificativa

8.3 – Outros Serviços de Terceiros – Pessoa Física (349036) = R\$ 0,00

Detalhamento e justificativa

8.4 – Outros Serviços de Terceiros – Pessoa Jurídica (349039) = R\$ 0,00

Detalhamento e justificativa

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, I.C.S. et al. Effect of a commercial product containing canthaxanthin for in ovo feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidation status, and performance. **Poultry Science**, 99:11, 5598–5606, 2020.

CAMPOS, A.M.A. et al. Efeito da inoculação de soluções nutritivas in ovo sobre a eclodibilidade e o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40, 1712-1717, 2011.

CESCO, M. A. A membrana vitelínica sua importância na reprodução de frangos e o papel da cantaxantina. **AviNews Brasil**, p. 43–47, 23 Julho, 2019.

Decuyper, E.; Dewil, E.; Kühn, R. **The hatching process and the role of hormones**. **Avian incubation**, London: Butterworth-Heinemann. p.239-256. 1991

FERREIRA, P. B. **Cantaxantina e 25-hidroxicolecalciferol e seus efeitos sobre os aspectos reprodutivos de galos**. 2010. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2010.

FORGIARINI, J. **Cantaxantina em dietas com milho ou sorgo sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. 2015. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2015.

GARCIA, E. A. et al. Effect of Cantaxantina Levels on Performance and Egg Quality of Laying Hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 4:1, 1–7, 2002.

LEANDRO, N.S.M. et al. Probiótico na ração ou inoculado em ovos embrionados: 1. desempenho de pintos de corte desafiados com Salmonella Enteritidis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 1509-1516, 2010.

LEITÃO, R.A. et al. Inoculação de glicose em ovos embrionados de frango de corte: parâmetros de incubação e desempenho inicial. **Ciência Animal Brasileira**, 9:4, 847–855, 2008.

LEITÃO, Rodrigo Afonso et al. Inoculação de maltose, sacarose ou glicose em ovos embrionados de baixo peso. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 32:1, 93-100, 2010.

LUCCA, É. C. L. de. **Eficiência reprodutiva de matrizes de frango de corte suplementadas com cantaxantina**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, 2017.

MIRANDA, H.A.F. et al. Efeitos da nutrição in ovo no desempenho de frangos de corte: uma revisão. **Research, Society and Development**, 10:2, p.e.38810212307, 2021.

ORSO, C. et al. **Efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre os parâmetros reprodutivos de galos**. 2017. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017

ROCHA, J. S. R. **Efeito da cantaxantina dietética para matrizes pesadas com idade avançada e do período de armazenamento dos ovos sobre a fertilidade, rendimento de incubação, nutrientes da gema e desenvolvimento embrionário**. 2011. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2011.

ROCHA, J. S. R. et al. Efeito do armazenamento e da cantaxantina dietética sobre a qualidade do ovo fértil e o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65:3, 792–800, 2013.

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

ROSA, A.P.; SCHER, A; SORBARA, J.O.B.; BOEMO, L.S.; FORGIARINI, J.; LONDERO, A. Effects of canthaxanthin on the productive and reproductive performance of broiler breeders. **Poultry Science**, 91, 660–666, 2012.

SANTOS, C. B. **Uso de cantaxantina e/ou 25- hidroxicolecalciferol em dietas para matrizes de corte**. 2011. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2011.

TRIQUES, G.E. **Efeito da suplementação dietética de antioxidantes sobre variáveis reprodutivas de machos reprodutores de frango de corte**. 2014. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós Graduação em Ciência Animal) - UFPR, Campus Palotina, PR, 2014.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. et al. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science**, 82:11, 1747-1754, 2003.

TERMO DE COMPROMISSO

(Em atenção à Resolução 023/2008 – CNPq)

Eu, Marcelo Leite da Veiga, SIAPE nº 1728692, uma vez contemplado(a) com cota(s) de bolsa através deste edital, afirmo o compromisso de **não indicar** bolsista que seja meu cônjuge, companheiro ou parente em linha reta, colateral ou por afinidade, até o terceiro grau, inclusive.

Declaro estar ciente de que a submissão deste documento em atendimento aos requisitos do Edital por meio de *login* institucional e senha pessoal no Portal de Projetos da UFSM caracteriza aceitação deste termo de compromisso.