

PATRÍCIA RAQUEL CANDEIAS DE AMORIM COSTA

**DIFERENÇAS NA OSSIFICAÇÃO ENTRE GALINHAS
DE APTIDÃO CARNE E GALINHAS DE APTIDÃO
DUPLA**

Orientadora: Professora Doutora Rute Noiva

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2019**

PATRÍCIA RAQUEL CANDEIAS DE AMORIM COSTA

**DIFERENÇAS NA OSSIFICAÇÃO ENTRE GALINHAS
DE APTIDÃO CARNE E GALINHAS DE APTIDÃO
DUPLA**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 10 de Janeiro de 2019, com o Despacho Reitoral nº 411/2018 de 17 de Dezembro de 2018.

Constituição do Jurí:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Joana Catita

Orientadora: Professora Doutora Rute Noiva, representada pela Professora Doutora Antonieta Alvarado

Vogal: Professora Doutora Margarida Alves

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2019

Agradecimentos

- ❖ À professora Doutora Rute Noiva, o meu muito obrigada por tudo o que fez por mim. Foi um enorme privilégio ter podido fazer parte do meu estágio curricular consigo. Tenho um carinho muito grande por si e foi realmente uma das pessoas que mais me marcou durante este capítulo da minha vida que foi a passagem e conclusão da universidade.
- ❖ Aos professores com quem mais convivi no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia durante o meu estágio curricular: Professora Doutora Margarida Alves, Professora Doutora Antonieta Alvarado, Professor Doutor Pedro Faísca. Obrigada a todos por me acolherem durante os 4 meses que aí estive e nas visitas ocasionais também, sempre com o mesmo carinho e simpatia.
- ❖ À professora Antonieta Alvarado, um enorme muito obrigada pela sua disponibilidade para me ajudar sempre que precisei, e por tudo o que fez por mim.
- ❖ Ao pessoal da Clínica Veterinária da Liga Portuguesa dos Direitos do Animal, onde fiz parte do meu estágio curricular: Dra. Célia Palma, Dra. Marta Passos, Dra. Teresa Landeiro, Dra. Dora Andrade, Dra. Joana Bolacha, Patrícia Bengalinha e Carla Hipólito. Obrigada por me ajudarem a crescer, tanto profissionalmente como a nível pessoal e pelo carinho com que me receberam e sempre me ajudaram.
- ❖ Aos meus pais porque sem eles nada disto teria sequer sido possível. A eles e à minha família, obrigada por terem estado sempre presentes, tanto nos momentos altos como nos baixos, incondicionalmente e sempre com o mesmo amor e carinho, sem o vosso apoio e optimismo constante eu não estaria onde estou hoje.
- ❖ Um especial agradecimento ao meu tio João Candeias, que foi uma ajuda preciosa.
- ❖ Por fim mas, certamente, não menos importantes, às amigas que fiz e que mais marcaram a minha jornada na universidade e que sem elas tudo teria sido diferente e muito menos divertido: Edite Ramos, Catarina Santana, Yara Zau e Carolina Soares. Há pessoas que ficam para sempre e que, independentemente do rumo que a vida tomar e do tempo que estejam afastadas, as coisas não mudam, eu espero que nós sejamos assim. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Resumo

As lesões ósseas em frangos de carne têm sido um assunto amplamente estudado ao longo dos anos. O principal factor apontado como causa destas lesões é a contínua selecção genética a que as estirpes de carne foram submetidas ao longo dos anos, com o objectivo de aumentar a taxa de crescimento, a qualidade e composição da carcaça. Este estudo teve como objectivo averiguar as diferenças histológicas na ossificação de ossos longos em frangos de aptidão carne em relação a uma estirpe de aptidão dupla, que possam ajudar a explicar a maior incidência de lesões ósseas em estirpes de frangos de carne.

Foram utilizados ambos os membros posteriores de 50 frangos *Cobb 500* na idade de abate (50-55 dias, média de 1,5 kg), perfazendo um total de 100 membros posteriores e de 5 exemplares da estirpe *ISA brown* (42-49 dias de idade e média de 700g), perfazendo um total de 10 membros posteriores. Foram colhidas secções longitudinais da epífise proximal do fémur, incluindo a respectiva cartilagem articular, que foram fixadas em formol tamponado a 10%. Estas foram posteriormente descalcificadas utilizando uma solução comercial e processadas para análise histopatológica.

As diferentes zonas de ossificação da epífise proximal do fémur foram divididas em cinco camadas: cartilagem articular / zona de reserva, zona de proliferação, zona hipertrófica, zona de ossificação superficial (> 30% de matriz ossificada) e zona de ossificação profunda (< 30% de matriz ossificada). Estas foram medidas em relação à espessura total do centro de ossificação da cabeça femoral utilizando software apropriado e os dados obtidos subsequentemente tratados estatisticamente.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (para um intervalo de confiança de 95%) entre a zona hipertrófica e a zona de ossificação profunda entre ambas as estirpes testadas, sendo a zona hipertrófica consideravelmente mais extensa e a zona de ossificação profunda notavelmente menor no grupo de galinhas de aptidão carne. Este estudo indica que as estirpes de carne, que são preferidas pelo seu crescimento rápido e elevado ganho de peso, tendem a repousar consideravelmente mais peso em ossos que se encontram fragilizados por possuírem uma camada mais espessa de cartilagem hipertrófica (pobre em matriz extracelular) e osso apenas parcialmente ossificado, comparativamente à estirpe de crescimento mais lenta usada para comparação.

Palavras-chave: galinhas de aptidão carne, ossificação, selecção genética, fémur, lesões ósseas

Abstract

Bone damage in broilers has been a widely studied subject over the years. The main cause for bone alteration of this is the continued genetic selection that broiler lines have been subjected to throughout the years, with the purpose of increasing growth performance and carcass quality and composition. This study aimed to investigate histological differences in the ossification of long bones in broiler strains, compared to a dual-purpose strain, which might help explain the higher incidence of bone lesions in broiler lines.

Both hind limbs from 50 *Cobb 500* birds at slaughter age (50-55 days, average 1.5kg) and 5 *ISA brown* exemplars (42-49 days and average 700g) were used. Longitudinal sections of the femoral proximal epiphysis and respective articular cartilage were collected and fixated in 10% buffered formalin, subsequently decalcified using a commercial solution and later routinely processed for histopathological analysis.

The different ossification zones of the femoral epiphysis were divided into five layers: joint/reserve cartilage, proliferation zone, hypertrophic zone, superficial ossification zone (>30% ossified matrix) and deep ossification zone (<30% ossified matrix). These were measured against the total thickness of the femoral head ossification center using appropriate software and the obtained data statistically analyzed.

Comparison between the thickness of the various layers of ossification in the dual purpose and the broiler group resulted in statistically significant differences (95% confidence interval) between the hypertrophic zone and the deep ossification zone of the samples tested, the hypertrophic zone being considerably more extensive, and the deep ossification zone being notably smaller in the broiler group.

This study indicates that broiler strains, which are preferred for their fast growth and weight gain will tend to rest considerably more weight on bones that are more fragile due to a thicker layer of hypertrophic cartilage (poor in extracellular matrix) and only partially ossified bone, in comparison to the slower growth strain.

Key words: broilers, ossification, genetic selection, femur, bone lesions

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos

GA – Galinhas de aptidão carne

GD – Galinhas de aptidão dupla / grupo controlo

ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso

ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação

ZH – Zona de cartilagem hipertrófica

ZOS – Zona de ossificação superficial

ZOP – Zona de ossificação profunda

H0 - Hipótese nula

GS – *Gait Score*

LACH – laboratório de análises clínicas e histopatologia

H&E – (coloração) Hematoxilina Eosina

Kg – quilogramas

g – gramas

% - percentagem

SCAHAW – *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare*

d – dias

R – resistência

BS – *breaking strenght*

P – fósforo

Ca – cálcio

NaCl – cloreto de sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

Fe - Ferro

E. coli – *Echerichia coli*

FCVE – factor de crescimento vascular endotelial

cm – centímetros

mm – milímetros

cm² – centímetros quadrados

°C – graus célsius/centígrados

μ - micrómetros

ex. - exemplo

ÍNDICE

I.	DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR	8
II.	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	10
1.	Introdução	10
1.1.	Contextualização do estudo	10
1.1.1.	Falando em números	11
1.2.	Seleção genética	12
1.2.1.	Seleção genética aplicada ao osso	15
1.3.	Causas predisponentes	16
1.4.	Lesões ósseas mais comuns	17
1.5.	Características anatómicas do esqueleto das aves	18
1.6.	Histologia	20
1.6.1.	Histologia da cartilagem articular	20
1.6.2.	Histologia do Osso	21
1.6.2.1.	Tipos de osso	23
1.6.2.2.	Ossificação	25
1.6.2.3.	Estudos da ossificação em aves	30
1.7.	Breve nota acerca do Bem-Estar	33
1.8.	Descrição das estirpes utilizadas	34
1.9.	Objectivos	35
2.	Material e Métodos	35
2.1.	Material	35
2.2.	Métodos	36
2.2.1.	Recolha de amostras e processamento histológico	36
2.2.2.	Obtenção de dados e análise estatística	37
3.	Resultados	39
3.1.	Histologia	39
3.2.	Média da espessura das diferentes zonas de ossificação	41
3.4.	Teste T- independente	43
3.5.	Teste T- emparelhado	45
3.6.	Média das medidas do fémur das galinhas de aptidão carne	46
4.	Discussão	46
4.1.	Limitações do trabalho	48

5. Conclusão.....	48
6. Referências bibliográficas	49

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo LACH - Processamento histológico de rotina e corte para microscopia.....	I
Anexo 2 – Protocolo LACH - Coloração de rotina – Hematoxilina-Eosina.....	II
Anexo 3 – Gráficos de resultados.....	III

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Comparação das zonas de ossificação da epífise proximal do fémur entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo):	43
Tabela 2 - Comparação das várias zonas de ossificação da epífise proximal do fémur do membro posterior esquerdo e direito entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo):	44
Tabela 3 - Comparação das zonas de ossificação da epífise proximal do fémur dos membros posteriores esquerdo e direito das galinhas de aptidão carne:	45
Tabela 4 - Comparação das zonas de ossificação da epífise proximal do fémur dos membros esquerdo e direito das galinhas de aptidão dupla (grupo controlo):.....	45

Índice de Figuras

Figura 1 - Comparação das alterações do peso em estirpes de galinhas Ross 308. Na imagem pode-se ver galinhas não seleccionadas em 1957, comparativamente a galinhas seleccionadas em 1978 e 2005. Dentro de cada estirpe, as imagens são da mesma ave aos 0, 28 e 56 dias de idade	13
Figura 2 - Esquema representativo das alterações do membro posterior das aves comparativamente ao dos humanos..	20
Figura 3 - Figura 3 – Secção transversal de osso compacto, para evidenciar a sua organização em sistemas de lamelas.	24
Figura 4 - Figura 4 – Secção longitudinal de osso compacto, para evidenciar a sua estrutura interna, os canais centrais (Haversianos) e os canais de perfurantes (de Volkmann).	24
Figura 5 - Representação do osso esponjoso.	25

Figura 6 - Corte longitudinal de um osso longo, corado com Hematoxilina Eosina, de modo a evidenciar as várias zonas constituintes da ossificação endocondral.....	29
Figura 7 - A – preparação histológica de um esqueleto de um embrião de galinha; B - preparação histológica de um membro posterior (*fémur, **tibiotalarso) de um embrião de galinha com 14 dias.....	30
Figura 8 - Secção longitudinal da cabeça femoral (escala corresponde a 1cm). Da direita para a esquerda: frango de carne de 8 semanas, frango de carne de 10 semanas, frango de carne de 14semanas, galinha poedeira de 5 meses e galinha poedeira de 2 anos.	32
Figura 9 - Montagem de imagens de microscopia óptica, de vários cortes histológicos em secção longitudinal, corados com Hematoxilina Eosina (400x), onde se pode observar parte da cabeça do fémur e respectiva cartilagem articular (epífise proximal) de uma galinha de aptidão dupla. Nesta imagem estão indicadas as várias zonas medidas. ...	37
Figura 10 - Montagem de imagens de microscopia óptica, de vários cortes histológicos em secção longitudinal, corados com Hematoxilina Eosina (400x), onde se pode observar a epífise proximal do fémur de uma galinha de aptidão dupla.....	39
Figura 11 - Imagem histológica macroscópica, corada a Hematoxilina Eosina, de um corte longitudinal de uma epífise proximal do fémur de uma galinha de aptidão carne. Nesta imagem pode-se observar separação epifisária no seu estadio inicial (seta).	40
Figura 12 - Montagem de imagens de microscopia óptica, de vários cortes histológicos em secção longitudinal, corados com Hematoxilina Eosina (400x), onde se pode observar parte da cabeça do fémur e respectiva cartilagem articular (epífise proximal) de uma galinha de aptidão carne. Nesta imagem é evidenciada a separação epifisária (seta)..	40

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Média da espessura de cada zona de ossificação da epífise proximal do fémur, medida microscopicamente, para ambos os grupos em estudo. Legenda: ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda.....	41
Gráfico 2 - Percentagens ocupadas por cada zona relativamente ao total da área de ossificação da epífise proximal do fémur, em ambos os grupos em estudo. Legenda: ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda.	42

I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

Foram realizados dois estágios curriculares com vista à obtenção do grau académico de Mestre em Medicina Veterinária. O primeiro decorreu no período de 1 de Setembro de 2017 a 1 de Novembro de 2017, na Clínica Veterinária da Liga Portuguesa dos Direitos do Animal, em Carcavelos, sob a orientação da Orientadora de Estágio Dra. Célia Palma, com o objectivo de aplicar os conhecimentos adquiridos durante o curso e, também, de ganhar mais experiência na área de Clínica de pequenos animais. O segundo estágio foi efectuado sob a orientação da Professora Doutora Rute Noiva e decorreu entre 13 de Novembro e 20 de Fevereiro de 2017, no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

No primeiro estágio, acima referido, foi possível fazer o acompanhamento de consultas de medicina interna e de medicina preventiva, observação de ecografia, auxiliar em procedimentos clínicos e de enfermagem veterinária, bem como o acompanhamento e realização de cirurgias.

Relativamente às consultas efectuadas, a grande maioria dos casos recebidos foram de rotinas profiláticas, nomeadamente vacinação e desparasitação, bem como a aplicação de identificação electrónica, tendo sido realizadas ainda muitas primeiras consultas de cães e gatos no primeiro mês de vida, onde para além da profilaxia foram, também, dados conselhos e esclarecidas dúvidas dos tutores de como lidar com esta fase de desenvolvimento dos seus animais; na área de medicina interna os casos que prevaleceram foram de dermatologia, gastroenterologia e nefro/urologia, respectivamente por ordem decrescente de casuística. Em menor número foi possível acompanhar também casos de ortopedia, oncologia, cardiologia, pneumologia, endocrinologia e consultas pré cirúrgicas.

Quanto aos procedimentos clínicos e de enfermagem veterinária foi realizada administração de fármacos, colheita de sangue, limpeza de feridas cutâneas, cateterização venosa, auxílio na colocação de pensos e punção aspirativa por agulha fina de massas cutâneas.

Na área de clínica cirúrgica foi possível fazer o acompanhamento de cirurgias, onde se destacam as ovariectomias, nodulectomias e orquiectomias, bem como mastectomias e amputação de membro, em menor número. Foi também possível a realização de duas orquiectomias em gatos.

Durante o estágio na clínica foi ainda feita a observação de ecografias, rondando os 40 casos observados, a maioria dos quais revelaram massas hepáticas, massas pancreáticas e cálculos urinários.

O segundo estágio foi inicialmente dedicado à preparação das amostras necessárias ao estudo a ser efectuado para realização da dissertação de mestrado, que visou a fixação em formol e descalcificação de 110 amostras, o seu corte e posterior processamento histológico. Foi também feita a observação de lâminas para diagnóstico, descrição macroscópica e corte de amostras provenientes do hospital veterinário da universidade lusófona de humanidades e tecnologias, onde se destacaram peças de mastectomia, nódulos cutâneos, peças de esplenectomia, biopsias de fígado e peças de enucleação. Também foi feito o processamento histológico de amostras provenientes de necropsias de bovinos e posterior observação das lâminas para diagnóstico, bem como a observação e acompanhamento de necrópsias.

II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1. Introdução

1.1. Contextualização do estudo

A avicultura moderna, cada vez mais focada na elevada produção e economia, descuidou a saúde e o bem-estar das aves, ao criar genótipos mais susceptíveis a desenvolver doenças (Knowles *et al.*, 2008).

Em 2008, num estudo efectuado por Knowles *et al.*, averiguou-se que 27,6% dos frangos de carne sofriam de problemas de locomoção, sendo que 3,3% estavam completamente incapacitados de andar. Estes problemas e lesões causam redução na produção como consequência do menor consumo de alimento, do aumento da frequência de carcaças fracamente desenvolvidas e de menor qualidade - que por sua vez leva a altas taxas de rejeição nos matadouros - e também, do aumento da mortalidade. Tudo isto gera perdas monetárias anuais bastante significativas, tornando-se assim, um foco de interesse e preocupação para a indústria. (Sullivan, 1998; Knowles *et al.*, 2008)

A integridade óssea das aves de produção é de grande importância na avicultura intensiva, já que grande parte das aves em idade de abate sofrem de claudicação severa e deformações ósseas, que levam a fracturas ósseas e outras lesões que contribuem para uma baixa produtividade, elevada mortalidade e rejeições de carcaça no matadouro. As aves que claudicam passam muito mais tempo deitadas e levam a uma maior contaminação do local de processamento, aumentando os riscos de segurança alimentar e aumentando as rejeições de carcaça devido a lesões como bolhas no peito, arranhões e processos inflamatórios. (Canello *et al.*, 2016)

Além disso, a fraqueza e porosidade óssea também estão relacionadas com um aumento da incidência de fragmentos ósseos em produtos cárneos desossados e com descoloração da carne adjacente ao osso devido ao extravasamento de sangue, o que diminui a qualidade comercial dos produtos. Para além do que algumas deformidades esqueléticas afectam o equipamento automático de evisceração e desossagem, exigindo corte manual que atrasa toda a linha de processamento e resultando em perdas de carne (Vaillancourt e Martinez, 2002; Canello *et al.*, 2016).

Por outro lado, inquéritos demonstram que actualmente os consumidores não têm noção das condições em que os frangos de carne são criados e ficam desagradados quando confrontados com informações sobre as actuais práticas comerciais. Tendo em conta que a sustentabilidade da produção intensiva de frangos depende fortemente da aceitação do consumidor, e com as cada vez maiores preocupações com questões relacionadas com o bem-estar animal, a indústria de frangos de carne é forçada a criar soluções para este problema causado por anos de selecção genética, garantindo ao mesmo

tempo as melhores práticas de manejo possíveis. Deste modo, o problema gerado pelo rápido aumento da taxa de crescimento e seu impacto no desenvolvimento ósseo justifica a necessidade de mais estudos nesta área com vista a criar genótipos mais robustos e saudáveis (Havenstall, 2003; Hall e Sandilands, 2007).

Estes factos demonstram que melhorar a saúde dos membros posteriores em frangos de carne pode trazer vários benefícios económicos para a indústria avícola, além de corrigir as questões relacionadas com o bem-estar.

O presente estudo, torna-se assim relevante na medida em que se foca num tema actual que afecta a indústria avícola, com o objectivo principal de perceber se existem diferenças na ossificação entre frangos de aptidão carne – cuja estirpe foi sujeita a anos de selecção genética que prejudicou o seu desenvolvimento ósseo - com frangos de aptidão ovo/dupla.

Para este fim, pretendeu-se procurar diferenças morfológicas significativas na ossificação das duas estirpes em estudo através da avaliação dos seguintes parâmetros: medição das diferentes zonas de ossificação, cálculo da média dos valores de espessura para cada zona, cálculo da percentagem que cada zona ocupa no total da cabeça do fémur, comparação dos valores obtidos em cada uma das várias zonas do membro posterior esquerdo e direito de cada galinha, comparação entre os valores obtidos nas várias zonas das galinhas de aptidão dupla e das galinhas de aptidão carne.

1.1.1. Falando em números...

Mais de 4,4 biliões de frangos são produzidos por ano na União Europeia. Actualmente, os frangos atingem o seu peso de abate em cerca de 41 dias, que é duas vezes mais rápido do que há cerca de 30 anos. No entanto o crescimento rápido apenas se aplica ao músculo (carne), enquanto que a estrutura de suporte das pernas, do coração e dos pulmões não consegue acompanhar este ritmo de crescimento (PS/MJ/ART0206).

Os números da *The Cobb Breeding Company Limited* mostram que no ano 2000 eram necessários em média 34 dias para atingir 1.82 kg de peso vivo, enquanto que em 1966 as aves demoravam em média 60 dias para atingir o mesmo peso. Se recuarmos ainda mais no tempo, para o ano de 1956, o período requerido para atingir esse peso era de 84 dias. Para além disto, van der Sluis (2000) afirma que, nos últimos 25 anos, o peso vivo dos frangos de carne aumentou cerca de 130% (1375 g).

Num estudo de Kestin *et al.* (1992) os autores descreveram um método para medir a prevalência de fraqueza nos membros posteriores, o sistema de *Gait Score* (GS), avaliando a capacidade de andar de quatro cruzamentos de linhagens comerciais de

frangos de carne. A capacidade de andar foi pontuada de 0 a 5, em que: 0 – a ave anda normalmente; 1 - a ave move-se rapidamente, mas uma ligeira deficiência de marcha é observada; 2 – a ave move-se rapidamente, mas há uma deficiência significativa na marcha; 3 - a ave move-se rapidamente, mas apresenta uma deficiência grave; 4 - a ave move-se com sérias dificuldades; e 5 - a ave passa a maior parte do tempo imóvel e geralmente usa as asas para se arrastar.

No relatório do *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* (SCAHAW) da União Europeia, de 21 de Março de 2000, relativamente aos problemas de marcha relacionados com as lesões dos membros posteriores, foi declarado que “estudos de marcha constataram que um grande número de frangos de carne têm a sua capacidade de andar prejudicada e há evidências de que aves com GS 3 ou superior sentem dor ou desconforto”.

Kestin *et al.* (1992) averiguaram que 26% das aves da estirpe *Cobb 500* tinham GS de 3, 4 ou 5 e também, pontuações mais elevadas de pododermatite e dermatite de contacto do curvilhão (*'hockburn'*), especialmente quando comparadas com aves da estirpe *Ross*.

De igual modo, o estudo de Sanotra (1999) constatou que 30,1% das aves *Cobb 500* tinham GS de 3, 4 ou 5. A prevalência de claudicação numa amostra representativa de bandos comerciais, também revelou que 36,9% das aves tinham deformações nos membros (*Valgus-Varus*) e 57,1% sofriam de discondroplasia tibial. Três anos mais tarde num estudo que avaliou 15 bandos de frangos *Ross 208* e 16 bandos de frangos *Cobb 500*, Berg e Sanotra (2002) constataram que 14,1% dos frangos de corte *Ross 208* e 26,1% dos frangos da *Cobb 500* tinham GS de 3 ou superior; 46,4% dos frangos *Ross 208* sofriam de deformações *Valgus-Varus* e 45,2% tinham discondroplasia tibial, contra 52,67% da estirpe *Cobb 500* para deformações *Valgus-Varus* e 56,3% discondroplasia tibial.

Sendo assim, de acordo com estes estudos, pode-se concluir que os frangos da estirpe *Cobb 500* são substancialmente mais susceptíveis a claudicação e lesões do membro posterior comparativamente a outras estirpes de aptidão carne.

1.2. Selecção genética

A crescente exigência por parte dos consumidores tem resultado, por parte da indústria avícola, na selecção genética de galinhas de aptidão carne com melhor qualidade de carcaça mas, também, com níveis e velocidades de crescimento cada vez maiores, de modo a que os frangos atinjam o peso desejado ao abate no menor número de dias possível, mantendo um índice de conversão alimentar idealmente baixo. Deste modo e devido à elevada heritabilidade de certas características muito apreciadas (ex. conformação corporal, maior desenvolvimento dos músculos peitorais e menos gordura abdominal, índice

de conversão alimentar) tem vindo a ser possível, com a selecção genética, conseguir um aumento de cerca de 50% no rendimento das aves, tal como se pode observar na figura 1. (Vereijken, 1992; Barton, 1994; Jago *et al.* 1995; Le Bihan-Duval *et al.*, 1998; Bednarczyk *et al.*, 2000; Hafez e Hauck, 2005; Maiorano *et al.*, 2009; Bednarczyk *et al.*, 2010; Nowaczewski *et al.*, 2010; Wolc *et al.*, 2010; Traveniello *et al.*, 2014; Zuidhof *et al.*, 2014).

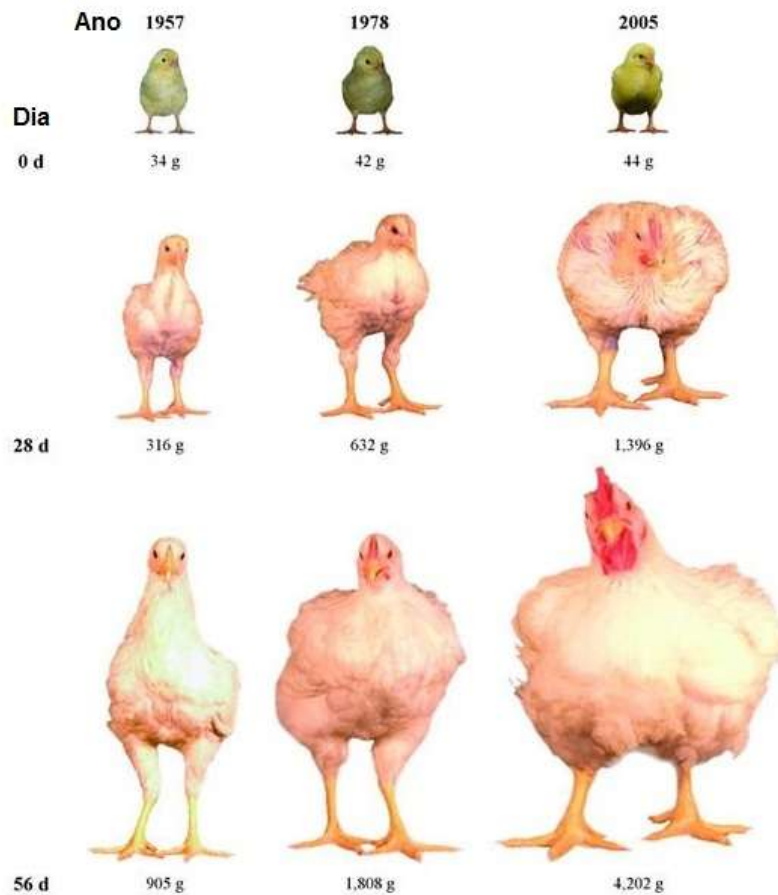


Figura 1 - Comparação das alterações do peso em estirpes de galinhas Ross 308. Na imagem pode-se ver galinhas não seleccionadas em 1957, comparativamente a galinhas seleccionadas em 1978 e 2005. Dentro de cada estirpe, as imagens são da mesma ave aos 0, 28 e 56 dias de idade. Legenda: g – gramas; d – dias. Imagem retirada e adaptada de Zuidhof *et al.* (2014)

Esta selecção genética foi igualmente aplicada a galinhas de aptidão ovo, de modo a melhorar as suas características reprodutivas (Emmerson, 1997; Buzala *et al.*, 2015; Nangsuay *et al.*, 2015), aumentando a produção de ovos (Hafez e Hauck, 2005).

No entanto, apesar de ambas as linhagens (carne e ovo) terem sido submetidas a selecção genética, apresentam diferenças significativas no que diz respeito ao seu desenvolvimento e taxa de crescimento, bem como nas consequências que daí advêm (Bednarczyk *et al.*, 1985; Rosinski e Bednarczyk, 1997; Bednarczyk e Rosinski, 1999; Sawicka *et al.*, 2015). Estas diferenças são inicialmente visíveis ao nível do metabolismo hormonal e lipídico das aves (Julian, 2005; Buzala *et al.*, 2015), no saco vitelino, nas trocas gasosas e na termogénese, o que leva às diferenças observadas à eclosão e durante o crescimento (Buzala *et al.*, 2015). Todos estes factores vão influenciar o consumo de alimento, taxa de crescimento, a eficiência na utilização de nutrientes, o desenvolvimento muscular e deposição de gordura (Havenstein *et al.*, 2003; Reyer *et al.*, 2015).

A nível do consumo de alimento está descrito que as estirpes de carne, desde os primeiros dias de vida, têm um maior consumo diário, cerca de 2 a 3 vezes superior do que as estirpes poedeiras com a mesma idade (Masic *et al.*, 1974; Nir *et al.*, 1993; Mahagna e Nir, 1996; Hocking *et al.*, 1997; Saneyasu *et al.*, 2011) e, também, um melhor índice de conversão alimentar (Mahagna e Nir, 1996). Outros autores verificaram que as estirpes de aptidão ovo tendem a parar de comer assim que ingerem o suficiente para satisfazer as suas necessidades metabólicas e que as galinhas de aptidão carne apenas param de comer quando têm o tracto digestivo inferior completamente cheio (Hafez e Hauck, 2005). Estas últimas são ainda menos activas, optando, frequentemente, por alimento que lhes é oferecido em detrimento de alimento cuja obtenção requer algum grau de esforço, ao contrário das galinhas poedeiras (Lindqvist *et al.*, 2006). Este facto indica uma realocação dos recursos energéticos disponíveis em prol de melhores características de produção, como consequência da selecção (Lindqvist *et al.*, 2006).

Deste modo o que se verifica no peso das estirpes de carne entre o nascimento e o abate é um aumento exponencial (em cerca de 60 vezes), com um peso final cinco vezes superior ao das estirpes de aptidão ovo com a mesma idade (Zhao *et al.*, 2004; Druyan, 2010), à custa de um aumento considerável na taxa de crescimento (Cooke *et al.*, 2003; Druyan, 2010).

A selecção genética direccionou-se ainda à redução da deposição de tecido adiposo, de modo a favorecer a alocação de nutrientes para o desenvolvimento, rentabilizando a produção (Chen *et al.*, 2014).

No desenvolvimento muscular, as estirpes de aptidão carne têm números e tamanhos de fibras musculares 2 a 3 vezes maiores que as estirpes de aptidão ovo, para

além de um desenvolvimento muscular que é 8 vezes mais rápido do que as últimas (Aberle e Stewart, 1983; Oshima *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009; Hassanpour *et al.*, 2010), o que resulta num rendimento de carcaça cerca de 16% superior (Sandercock *et al.*, 2009). Em ambas as estirpes os músculos peitorais desenvolvem-se mais rapidamente que os músculos dos membros posteriores durante as primeiras 2 semanas de vida (Saunderson e Leslie, 1988). Este desenvolvimento muscular coexiste com uma taxa inferior de degradação proteica (Saunderson e Leslie, 1988), devida a uma diferença na actividade enzimática (Johari *et al.*, 1993) e na expressão genética de certas proteínas associadas a proteólise muscular aquando de restrição alimentar, que resulta numa degradação mais lenta das proteínas musculares (Muramatsu *et al.*, 1987; Harper *et al.*, 1999), que pode ser uma das razões para a elevada taxa de crescimento das galinhas de aptidão carne (Saneyasu *et al.*, 2015). Incidentalmente de acordo com um estudo de Jung *et al.* (2007) os músculos dos membros posteriores das galinhas poedeiras apresentam uma maior expressão de proteínas associadas ao desenvolvimento muscular, crescimento e locomoção.

No entanto, aquando da selecção genética aplicada para aprimorar as características acima referidas, foram negligenciados outros aspectos do desenvolvimento corporal das aves com consequências ao nível de vários sistemas orgânicos, nomeadamente na performance cardiopulmonar (Olkowski, 2007), esqueleto (Julian, 2005), sistema imunitário (Leshchinsky e Klasing, 2001; Koenen *et al.*, 2002; Parmentier *et al.*, 2010), entre outros.

1.2.1. Selecção genética aplicada ao osso

Um estudo realizado por Grupioni *et al.* (2015) avaliou várias características fenotípicas de galinhas da estirpe *Cobb 500*: peso corporal aos 42 dias de idade, peso e rendimento do fémur congelado, medição da densidade mineral do fémur (cálcio, magnésio, fósforo, zinco), rigidez (R), comprimento, espessura e a força necessária para quebrar o fémur - *breaking strenght* (BS) do fémur, que permitiu obter informações relevantes acerca da selecção genética e heritabilidade de certas características. De acordo com este estudo a densidade mineral, a rigidez, a espessura e a *breaking strenght* do fémur apresentaram coeficientes de heritabilidade moderados a altos, sendo que a *breaking strenght* do fémur é um importante indicador de qualidade do osso. Há também uma associação positiva entre a *breaking strenght*, a rigidez e a densidade óssea o que indica que seleccionar um animal para uma qualidade relativa à integridade óssea (BS, R), resulta também em animais com uma densidade mineral óssea mais elevada, o que por sua vez acarreta uma estrutura óssea mais forte e resistente que contribui para a menor ocorrência de lesões. Os autores concluíram ainda que, apesar da correlação entre o peso corporal e as propriedades ósseas

não serem bem conhecidas, o peso corporal tem um efeito modulador do osso pelo que, a selecção para animais mais pesados resultaria numa densidade mineral mais baixa e logo numa menor resistência óssea que predispõe a lesões (fracturas). (Zhong *et al.*, 2012)

Yair *et al.* (2017), que estudaram os “efeitos maternos e genéticos nas propriedades ósseas das galinhas de aptidão carne durante o período de incubação”, determinaram que as galinhas de crescimento rápido tinham maior peso corporal e maior peso da tíbia do que galinhas de crescimento lento. No entanto, possuíam uma menor proporção entre o peso corporal e peso da tíbia. Foi, também, constatado que as tíbias das galinhas de crescimento lento eram mais firmes, apresentavam uma densidade mais elevada de osteócitos e a sua taxa de mineralização perióstica era igualmente mais elevada. Concluiu-se, assim, que as galinhas de crescimento rápido têm propriedades ósseas inferiores o que, acrescido ao facto de possuírem um peso corporal muito mais elevado leva a um maior risco para desenvolverem lesões ósseas.

Igualmente, em estudos realizados anteriormente que compararam linhagens de crescimento rápido e crescimento lento de galinhas de aviário, já tinha sido abordada a questão de que as galinhas de crescimento lento não sofrem tantas lesões nos membros posteriores devido ao facto de possuírem melhores características ósseas quando comparadas com galinhas de crescimento rápido, como elevado conteúdo em cinzas, baixa porosidade do osso cortical, maior rigidez óssea (Leterrier e Nys, 1992; Julian, 1998; Corr *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2008; Caplen *et al.*, 2012; Kapell *et al.*, 2012). Também Pitsillides *et al.* (1999) já tinha referido que, devido a uma menor capacidade de adaptação ao aumento de carga mecânica, o esqueleto das estirpes de crescimento rápido não consegue suportar os elevados pesos corporais destas aves de forma eficaz.

1.3. Causas predisponentes

O relatório do *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* (SCAHAW) da União Europeia, de 21 de Março de 2000 estabelece que as causas de lesões nos membros posteriores subdividem-se em 3 categorias: doenças infecciosas; alterações do desenvolvimento e doenças degenerativas (que afectam principalmente as aves mantidas até idades e pesos mais elevados, para fins de reprodução). No entanto, é geralmente aceite a classificação sugerida por Sorensen *et al.* (1999), que divide esses factores em apenas 2 categorias: aqueles de origem infecciosa e aqueles causados por alterações esqueléticas.

O aparecimento de lesões ósseas em galinhas de aptidão carne está em grande parte relacionado com a elevada taxa de crescimento destes animais, resultado de anos de

selecção genética, que originou animais com elevado peso corporal cujo esqueleto dos membros posteriores não consegue suportar, causando assim os problemas de locomoção e fraca resistência/integridade óssea que se observam (Kestin *et al.*, 1992; Thorp, 1994; Julian, 1998; Kestin *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000; Julian, 2005; McDevitt *et al.*, 2006; Dibner *et al.*, 2007; Pines, 2007; Knowles *et al.*, 2008; Talaty *et al.*, 2009; Shim *et al.*, 2012; Gonzalez-Ceron *et al.*, 2015).

Além deste factor existem outras causas subjacentes que, também, influenciam o desenvolvimento de lesões ósseas, tais como: problemas nutricionais/dietas inadequadas, elevada densidade populacional nos aviários, agentes infecciosos, inactividade devido à falta de enriquecimento ambiental, tipo de substrato utilizado, factores de manejo (ex. condições de incubação e horas de luz/escuridão), factores mecânicos e trauma (Duff 1985; Kestin *et al.*, 1992; Havenstein *et al.*, 1994; Julian, 1998; Sorensen e Kestin 2000; Pines 2007; Oviedo-Rondon *et al.*, 2008; Groves e Muir, 2014; Van der Pol *et al.*, 2014; Kaukonen *et al.*, 2017)

Segundo Groves e Muir (2014) os perfis de incubação que recorrem a temperaturas mais baixas resultam em eclosões mais tardias e numa melhoria da habilidade de os pintos se manterem em pé, complementando a informação de Oviedo-Rondon *et al.* (2008) e Van der Pol *et al.* (2014), que defendem que elevadas temperaturas de incubação levam a propriedades ósseas deficientes e maior incidência de lesões nos membros posteriores.

Quanto à relação das horas de luz com a incidência de problemas nos membros posteriores, a maioria das aves cessa a sua actividade durante períodos de escuridão, incluindo a alimentação, pelo que mais horas de escuridão levam a que as aves se alimentem menos e logo, que tenham uma menor taxa de crescimento, associada a um menor peso corporal e, por isso, a uma menor tendência para lesões. (Reiter e Kutritz, 2001).

Foi também reportada a possibilidade das estações do ano terem efeito nas anomalias dos membros posteriores, sendo o verão considerado a estação mais nefasta, com uma elevada percentagem de lesões associadas (Laster *et al.*, 1999).

1.4. Lesões ósseas mais comuns

Apesar de as lesões ósseas ocorrerem cedo na vida das aves, aquando do inicio do processo de ossificação, apenas são notados os problemas de locomoção que daí advêm quando as aves atingem idade de abate (Oviedo-Rondon *et al.*, 2008; Ferket *et al.*, 2009).

São várias as lesões ósseas que se podem observar nas galinhas de aptidão carne, derivadas do crescimento rápido, que afectam principalmente os ossos dos membros

posteriores, especialmente a tíbia e o fémur (Duff, 1985; Thorp, 1994; Julian, 1998; Dibner *et al.*, 2007; Pines, 2007; Knowles *et al.*, 2008), sendo algumas das mais comuns:

- Claudicação crónica dolorosa, que se verifica em galinhas de aptidão carne com mais idade, que apresentam claudicação sem lesões associadas (macro e microscopicamente) e permanecem a maioria do tempo sentadas/deitadas/agachadas devido à dor associada ao andar. Esta afecção, que se deduz ser resultante do elevado peso corporal e do stress que o mesmo provoca no osso imaturo, pode ser diminuída através da manipulação do crescimento por programas de exposição a quantidades específicas de luz. (Julian, 1998)
- Discondroplasia tibial, que ocorre devido à falha na hipertrofia dos condrócitos presentes na placa de crescimento, levando a uma falha da invasão vascular da cartilagem e da produção de osso e está associada ao crescimento rápido dos frangos de carne, à carência de nutrientes necessários ao desenvolvimento ósseo e possivelmente, à presença de toxinas (Leach e Nesheim, 1965; Haynes *et al.*, 1985; Edwards, 1987; Thorp *et al.*, 1991; Leach e Lilburn, 1992; Rennie *et al.*, 1993; Cook e Bai, 1994; Diaz *et al.*, 1994; Hester, 1994; Leach e Twal, 1994; Farquharson e Jefferies, 2000). Lesões severas causam o enfraquecimento da tíbia proximal que é comprimida pelo peso corporal das aves aquando da sua locomoção, o que resulta em claudicação dolorosa; ou a tíbia é estirada caudalmente pelo músculo gastrocnémio, o que vai causar uma deformação do membro ou necrose avascular da cartilagem seguida de fractura espontânea da tíbia proximal (Riddell, 1992; Farquharson e Jefferies, 2000). A idade mais frequente para o desenvolvimento desta lesão é entre as 3 e as 5 semanas de idade (Bradshaw *et al.*, 2002). A resolução do problema passa por adicionar cloreto de sódio (NaCl) na dieta com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e evitar rácios elevados de Fósforo/Cálcio (P:Ca). A discondroplasia também pode estar presente noutros centros de crescimento especialmente nos metatarsos proximais e fémur (Julian, 1998);
- Separação epifisária, que ocorre quando na desarticulação dos membros posteriores das aves durante a necrópsia, a cartilagem articular se separa da cabeça do fémur. Isto ocorre maioritariamente em aves com discondroplasia ou osteomielite, devido ao crescimento rápido que não permite a formação de tecidos resistentes. (Julian, 1998)

1.5. Características anatómicas do esqueleto das aves

O sistema músculo-esquelético das aves sofreu várias modificações e adaptações de modo a criar uma estrutura leve que lhes permite o voo: formação de ossos compostos pela fusão de ossos individuais (especialmente na cabeça e região distal dos membros), redução do número de ossos, reduzida densidade óssea e perda de matriz óssea interna. O seu esqueleto é leve comparativamente a um mamífero do mesmo tamanho devido à

presença de ossos pneumáticos, que estão ligados aos sacos aéreos e insuflados com ar que corresponde a 85% ou mais do seu volume. Estes ossos estão localizados na cabeça, vértebras, pélvis, esterno, costelas, úmero e por vezes, fémur. Alguns ossos longos são ossos medulares (um tipo único nas aves) com paredes finas, mais duros e com elevados níveis de cálcio, comparativamente aos ossos de mamíferos. Os ossos restantes são ossos esponjosos. (Kaiser, 2008; Colville e Bassert, 2016; Mayr, 2016).

Os ossos das aves desenvolvem-se exclusivamente a partir de cartilagem durante um certo período de tempo (vários meses) após a eclosão e são uma estrutura composta, onde outros tecidos têm um papel importante. Interna e externamente os ossos encontram-se ligados por uma resistente camada de tecido esclerótico que é contínuo à pele e com as fibras de colagénio do osso. Foi sugerido que a sua grande força de tensão previne o osso de se deformar sob stress. (Kaiser, 2008; Gillespie e Flanders, 2009)

A fusão de alguns dos seus ossos permite diminuir o peso geral da ave e aumenta a força/rigidez dos ossos em questão. Outras alterações para promover a aerodinâmica necessária para o voo incluem: atlas com um único côndilo que aumenta o movimento do pescoço, esterno largo que suporta os músculos peitorais necessários para o voo, uma grande porção das vértebras lombares, sagradas e caudais fundidas num sinsacro, e as últimas vértebras caudais fundidas num pigóstilo, que estabilizam a coluna vertebral durante o voo e consegue suportar pressões relacionadas com *perching* (quando o animal se equilibra num poleiro) e aterragem. (Kaiser, 2008; Colville e Bassert, 2016; Mayr, 2016).

No esqueleto apendicular, enquanto o membro anterior sofreu modificações para a facilitar o voo, o membro posterior manteve a sua função de locomoção e sofreu uma reorganização na sua estrutura, com 3 ossos longos em vez de 2 e alongamento exuberante dos dígitos, como se pode observar na figura 2, comparativamente ao membro posterior humano. O membro posterior é formado por quatro ossos no total: o fémur, o tibiotarso, fíbula e tarsometatarso. O fémur é um osso relativamente curto em todas as aves, o osso mais longo da perna das aves é o tibiotarso (fusão da porção distal da tíbia com os ossos proximais do tarso) e a zona geralmente glabra do membro posterior é o tarsometatarso. (Colville e Bassert, 2016; Lovette e Fitzpatrick, 2016).

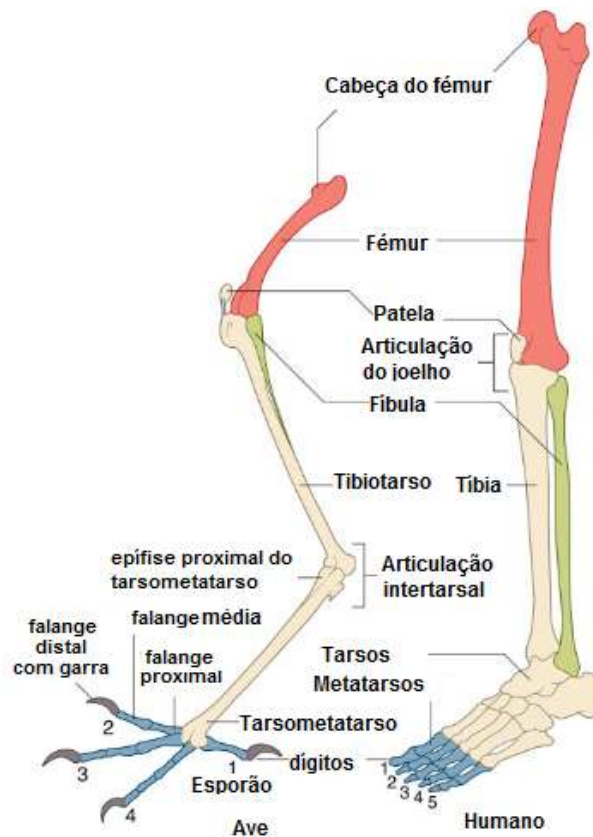


Figura 2 - Esquema representativo das alterações do membro posterior das aves comparativamente ao dos humanos. Legenda: vermelho – fêmur, verde – fibula, azul – metatarsos. Imagem adaptada de Lovette and Fitzpatrick (Eds) (2016).

1.6. Histologia

1.6.1. Histologia da cartilagem articular

A cartilagem é um tipo de tecido conjuntivo especializado, cuja função é de suporte dos tecidos moles que proporciona superfícies deslizantes para articulações e moldes de crescimento para ossos longos. Não é um tecido enervado nem vascularizado, tendo de ser nutrido por tecidos adjacentes ou por líquido sinovial. A cartilagem articular é composta por cartilagem hialina - um dos 3 tipos de tecido cartilagineo existente - que recobre a superfície das articulações sinoviais. Nos locais em que forma a cartilagem articular a cartilagem hialina é nutrida pelo líquido sinovial, não necessitando do pericôndrio que fornece os nutrientes necessários para o crescimento dos condrócitos nas restantes cartilagens. A sua formação no embrião ocorre a partir do tecido mesenquimatoso quando este se encontra pouco vascularizado e sem oxigenação suficiente. Aqui, os fibroblastos adquirem uma forma arredondada, formando os condrócitos em centros de condrificação, sendo que o crescimento progressivo da cartilagem articular ocorre apenas pela forma intersticial. No crescimento intersticial os condrócitos dividem-se, dando origem a grupos isogénicos que

são envolvidos por uma cápsula de matriz condensada não fibrosa, sendo este o processo que diferencia o tecido cartilágneo dos demais tecidos conjuntivos. Este tipo de crescimento também ocorre nas placas epifisárias de ossos longos para promover o seu crescimento em comprimento sendo que nestas, os condrócitos encontram-se dispostos em filas de orientação longitudinal, paralelas entre si e em relação ao eixo longo do osso em formação. (Samuelson, 2007; Ovalle and Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

A cartilagem hialina é constituída por condrócitos organizados em pares ou grupos de 4 a 6 células (grupos isogénicos) provenientes do mesmo condrócito 'progenitor' e assentes numa matriz extracelular; na periferia podem observar-se os condroblastos mais achatados e nas zonas mais profundas, observam-se os condrócitos mais arredondados. A matriz extracelular é composta por água (60-70%), sais inorgânicos, proteínas não colagénicas, colagénio tipo II (que representa 90-95% dos colagénios presentes na cartilagem) organizado em feixes, e substância fundamental, constituída maioritariamente por glicosaminoglicanos que conferem basofilia à matriz extracelular (Ovalle and Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

Os condroblastos são um tipo especializado de fibroblastos que têm como função a síntese e secreção dos compostos da matriz extracelular cartilaginea, na qual ficam depois retidos, denominando-se condrócitos. Os condroblastos situam-se na sua lacuna rodeada por matriz extracelular e são células arredondadas de membrana citoplasmática pediculada, núcleo ovóide eucromático, ribossomas livres abundantes, retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e com cisternas dilatadas, aparelho de Golgi justanuclear com vacúolos de diversos tamanhos e poucas mitocôndrias (devido ao seu metabolismo anaeróbio/glicolítico). Quando diminuem a sua produção e se tornam menos activos (mais maduros), os condroblastos transformam-se em condrócitos e perdem organelos, passando a conter gotículas lipídicas e agregados de glicogénio (Samuelson, 2007; Ovalle and Nahirney, 2014).

1.6.2. Histologia do Osso

O osso é constituído por vários tipos de tecidos: tecido ósseo, tecido conjuntivo denso, medula óssea, entre outros. O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado que tem como função a sustentação, ligação, movimentação, protecção e reserva de minerais sendo, por isso, um tecido forte, rígido e resistente, com pouca elasticidade (Gartner, 2017).

A principal característica que o diferencia dos demais tecidos conjuntivos é a sua capacidade de armazenamento de minerais, nomeadamente cálcio, sob a forma de cristais de hidroxiapatite (Samuelson, 2007; Gartner, 2017). A superfície do osso encontra-se, com

excepção das zonas articulares, coberta pelo perióstio que é constituído por duas camadas: uma camada externa (fibrosa) de tecido conjuntivo denso modelado, com fibroblastos entrelaçados em fibras de colagénio tipo I e fibras elásticas, muito vascularizada e nervada e uma camada interna (osteogénica) de tecido conjuntivo laxo, igualmente vascularizado, com células osteogénicas e osteoblastos. Internamente, incluindo na cavidade medular, o osso é revestido por tecido conjuntivo laxo, também vascularizado, enervado e com células tronco ósseas, o endóstio (Samuelson, 2007; Ovalle and Nahirney, 2014).

No tecido ósseo podem encontrar-se vários tipos de células:

- **células osteoprogenitoras/osteogénicas:** células tronco derivadas do mesênquima embrionário com a capacidade de se dividir e originar osteoblastos (Gartner, 2017);
- **osteoblastos:** encontram-se na periferia do osso onde produzem e depositam a matriz óssea não mineralizada (osteóide), bem como fosfatase alcalina que promove a mineralização da matriz (Gartner, 2017);
- **osteócitos:** osteoblastos maduros após terem cessado a sua actividade produtora de osteóide e ficam encapsulados pela matriz óssea mineralizada (Gartner, 2017);
- **osteoclastos:** células gigantes multinucleadas que se encontram na superfície do tecido ósseo e cuja função é a reabsorção da matriz óssea durante processos de crescimento, reparação e remodelação óssea (Gartner, 2017).

Os osteócitos encontram-se em espaços específicos na matriz óssea, as lacunas, e a sua função primária é manter a integridade da matriz. A matriz óssea possui canalículos onde se encontram os processos (prolongamentos celulares filamentosos) dos osteócitos que se ligam a osteócitos adjacentes através de junções comunicantes e a vasos sanguíneos por onde ocorrem trocas de nutrientes e metabolitos celulares entre o sangue, osteócitos e líquido extracelular presente nos canalículos (Samuelson, 2007; Gartner, 2017).

A matriz óssea é constituída por duas porções: uma porção inorgânica, que representa cerca de 65% do total da matriz, que tem na sua composição minerais como cálcio e fosfato na forma de cristais de hidroxiapatite e fosfato de cálcio amorfo bem como outros componentes, nomeadamente bicarbonato, citrato, magnésio, sódio, potássio e oligoelementos (zinco, cobre, etc.); e uma porção orgânica que compõe cerca de 35% da matriz, maioritariamente constituída por fibras de colagénio tipo I dispostas em feixes bem como, alguns proteoglicanos e glicoproteínas (osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea) e, ainda, substância amorfa que confere à matriz rigidez e força. Os proteoglicanos da matriz inibem e inibem a mineralização da matriz sendo que, a sua quantidade vai diminuindo à medida que esta vai ficando mineralizada. As glicoproteínas têm uma função adesiva, ligando-se os cristais de hidroxiapatite, outros componentes da matriz e células de

formação óssea. (Samuelson, 2007; Bacha Jr. e Bacha, 2012; Ovalle e Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

A medula óssea presente no interior da cavidade medular pode ser de dois tipos: vermelha, mais activa na produção de células sanguíneas, ou amarela, com menor actividade hematopoiética e maior conteúdo em adipócitos (Gartner, 2017).

1.6.2.1. Tipos de osso

Existem 2 tipos de tecido ósseo, de acordo com a sua configuração: tecido ósseo compacto (lamelar) e tecido ósseo esponjoso (trabecular). Por norma, o osso compacto possui mais matriz e o osso esponjoso tem aspecto de rede deixando espaços entre a matriz, sendo que o osso compacto normalmente circunda o osso esponjoso, encontrando-se este, então, no interior dos ossos e o osso compacto no córtex (Bacha Jr. e Bacha, 2012; Ovalle e Nahirney, 2014).

O osso compacto é constituído por densas camadas de matriz bem compactadas, com osteócitos presos entre as camadas. As camadas estão organizadas em sistemas de lamelas (figura 3), mais evidentes na diáfise dos ossos longos: lamelas circunferenciais internas e externas, próximas do perióstio a formar a região mais externa da diáfise que contém fibras de Sharpey que fazem a ligação do perióstio ao tecido ósseo; lamelas concêntricas, que formam canais cilíndricos com várias camadas, os sistemas Haversianos/osteons (Bacha Jr. e Bacha, 2012; Ovalle e Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

Os osteons têm uma orientação paralela ao eixo longo do osso possuindo no seu centro, o canal de Havers (central) (figura 4), que contém vasos sanguíneos e nervos de pequeno calibre e é circundado pelas lamelas concêntricas. Os osteócitos encontram-se organizados em torno do canal central, dentro das suas lacunas, que se apresentam paralelas às lamelas e conectadas entre si pelos canalículos que contém os prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos. Os canais de Volkmann (perfurantes) são canais pequenos que contém igualmente vasos sanguíneos e nervos que comunicam com os vasos e nervos presentes no perióstio, canal de Havers e cavidade medular (figura 4). Podem, ainda, encontrar-se lamelas irregulares entre os sistemas de Havers - as lamelas intersticiais - correspondentes a vestígios de osteons antigos destruídos durante a remodelação óssea e delimitados por linhas cimentantes (Bacha Jr. e Bacha, 2012; Ovalle e Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

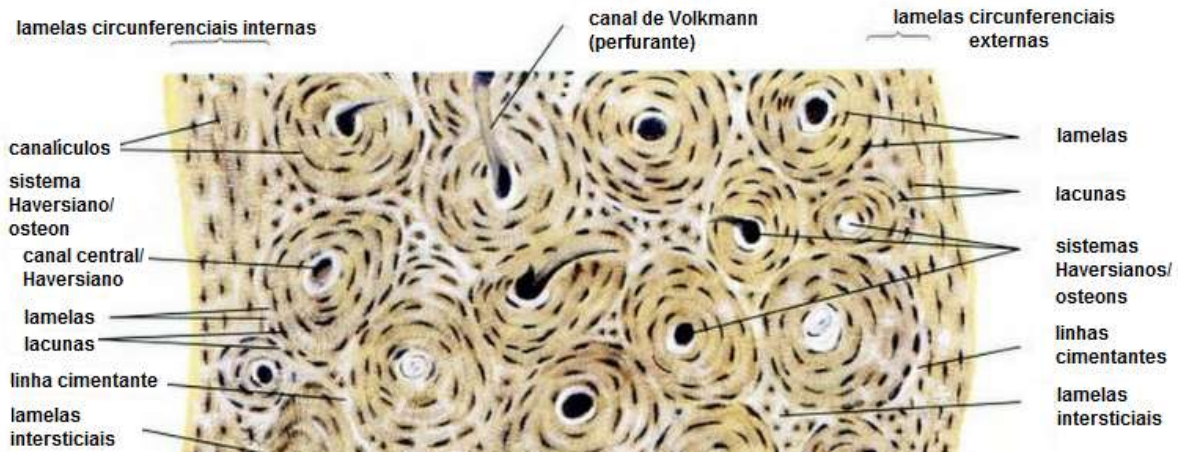


Figura 4 - Figura 3 – Secção transversal de osso compacto, para evidenciar a sua organização em sistemas de lamelas. Imagem adaptada de Eroschenko (2008).



Figura 3 - Figura 4 – Secção longitudinal de osso compacto, para evidenciar a sua estrutura interna, os canais centrais (Haversianos) e os canais de perfurantes (de Volkmann). Imagem adaptada de Eroschenko (2008).

O osso esponjoso é formado por trabéculas conectadas entre si, formadas por tecido ósseo secundário/lamelar coberto por endósteo, que originam uma estrutura tridimensional com inúmeros espaços medulares entre essas espículas ósseas, tal como pode ser observado no esquema representativo da figura 5. Este tecido ósseo não possui sistemas de Havers, pelo que, as lamelas de colagénio apresentam-se paralelas às trabéculas ósseas e contem osteócitos que são nutridos através dos canaliculos que estão ligados à cavidade medular (Samuelson, 2007; Bacha Jr. e Bacha, 2012; Ovalle e Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

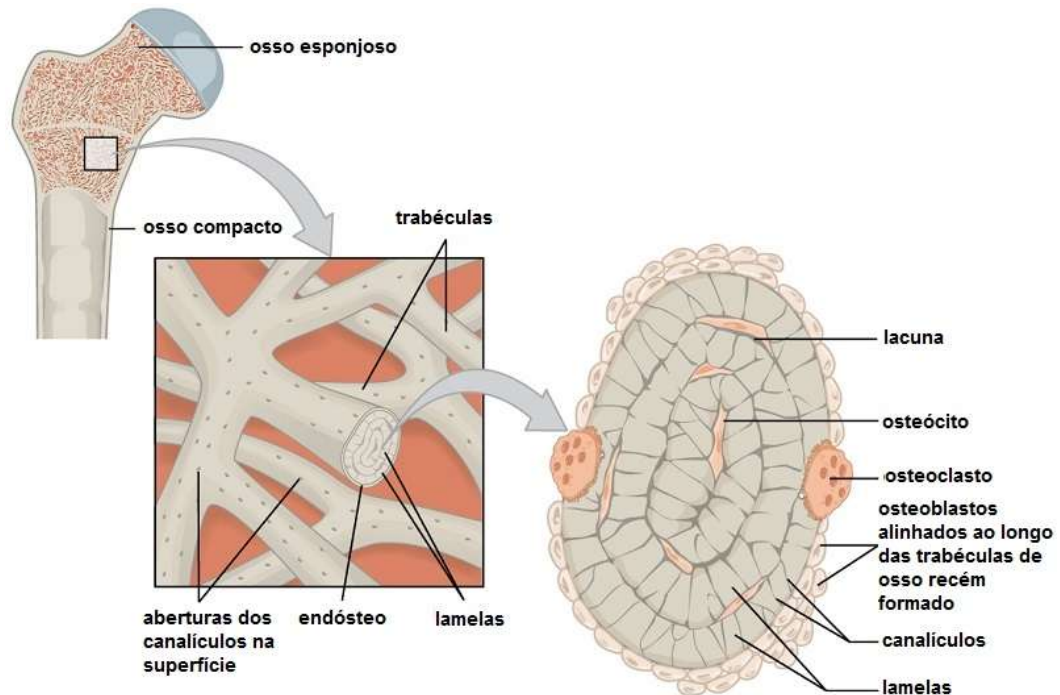


Figura 5 - Representação do osso esponjoso. Imagem adaptada de OpenStax, Anatomy & Physiology (2017).

Com base no desenvolvimento, o osso pode ser classificado como imaturo e maturo, sendo o primeiro formado nos centros de ossificação primários e secundários, consistindo em numerosas células com lacunas grandes, dispersas por toda a matriz, com colagénio distribuído aleatoriamente (não birrefringente) e que forma, inicialmente, osso esponjoso. O segundo é geralmente mais compacto, com matrizes arranjadas de forma ordenada, com fibras de colagénio dispostas em arranjos helicoidais (birrefringentes). (Samuelson, 2007; Bacha Jr. e Bacha, 2012; Ovalle e Nahirney, 2014; Gartner, 2017).

1.6.2.2. Ossificação

A histogénese do osso pode ocorrer de duas formas: por ossificação intramembranosa e por ossificação endocondral (Gartner, 2017).

A ossificação intramembranosa ocorre maioritariamente em ossos planos, sem um molde cartilágneo, originando-se no mesênquima à medida que grupos de células formam blastemas ósseos que se tornam os centros primários de ossificação. As células mesenquimatosas surgem apinhadas e hiperplásicas, formando condensações mesenquimatosas, que segregam a matriz extracelular inicial. Outras células mesenquimatosas diferenciam-se em osteoblastos, que se organizam numa fila/membrana de células e sintetizam e depositam o osteóide unidireccionalmente que, posteriormente, calcifica e aprisiona alguns osteoblastos. Os osteoblastos aprisionados tornam-se

osteócitos, que auxiliam o desenvolvimento e mineralização do osso em formação, sendo que o primeiro osso a ser formado é o osso esponjoso (osso primário). Este assume a forma de espículas que se fundem em trabéculas e posteriormente em camadas ou lamelas que substituem, gradualmente, o osso esponjoso por osso compacto/lamelar. O perióstio dos ossos longos também é formado desta forma, através da combinação de células fibroblásticas periféricas com células não diferenciadas que se transformam em células osteoprogenitoras. (Henrikson e Mazurkiewicz, 1997; Samuelson, 2007; Eroschenko, 2008; Gartner, 2017).

A ossificação endocondral ocorre tanto durante o período fetal como durante o crescimento, em ossos longos e curtos, promovendo o seu crescimento em comprimento a partir de um molde cartilágneo de cartilagem hialina. Tem início no centro de ossificação primário que corresponde à região de cartilagem que depois irá formar a diáfise do osso longo e seguidamente, nas placas de crescimento epifisárias e nos centros de ossificação secundários entre a placa de crescimento e a superfície articular medular. Esta forma de ossificação inicia-se com a migração de células mesenquimatosas para o local de formação de osso e transformação das mesmas em condrócitos, que proliferam numa densa massa de células desprovida de vasos sanguíneos e formam o molde de cartilagem na forma do osso em formação (Eroschenko, 2008; Gartner, 2017).

Nos centros de ossificação primários os vasos sanguíneos invadem o pericôndrio e as células mesenquimatosas diferenciam-se em células osteogénicas. Estas células diferenciam-se em osteoblastos que sintetizam matriz óssea e formam um colar ósseo subperióstico (por ossificação intramembranosa). Posteriormente, ocorre hipertrofia dos condrócitos que sintetizam fosfatase alcalina e a depositam na matriz extracelular o que, induz o início da sua calcificação nas zonas em torno dos condrócitos hipertrofiados, num processo chamado de crescimento intersticial. No pericôndrio, as células também segregam matriz extracelular, adicionando mais camadas à cartilagem pelo processo de crescimento aposicional. (Eroschenko, 2008; Gartner, 2017).

A presença do colar ósseo na região mediana da diáfise e a matriz mineralizada impedem a difusão de nutrientes até aos condrócitos mais internos, causando a sua degenerescência e morte, o que deixa lacunas vazias separadas por trabéculas de cartilagem mineralizada. Os osteoclastos escavam orifícios no colar ósseo subperióstico o que permite a entrada de capilares sanguíneos e células osteoprogenitoras, provenientes das células mielóides, que invadem a matriz cartilaginea mineralizada e se localizam nas trabéculas mineralizadas diferenciando-se em osteoblastos. Assim formam-se delgadas trabéculas ósseas de tecido ósseo esponjoso primário sobre o remanescente da cartilagem mineralizada, que são reabsorvidas por osteoclastos no centro da diáfise de modo a

umentar o tamanho da cavidade medular (canal medular). O colar ósseo começa a espessar e a crescer em direcção às epífises, substituindo todo o tecido cartilágneo da diáfise por tecido ósseo. O crescimento em comprimento deve-se ao crescimento intersticial enquanto que a expansão em largura deve-se ao crescimento aposicional de novo material ósseo a partir do perióstio (Eroschenko, 2008; Gartner, 2017).

A ossificação nos centros de ossificação secundários ocorre por um processo semelhante ao descrito anteriormente, diferente apenas por não necessitar de um colar ósseo para iniciar o processo. Tem início com a invasão da cartilagem por vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras ao longo das extremidades do molde nas porções laterais da epífise e sua diferenciação em osteoblastos que depositam matriz extracelular nas trabéculas de cartilagem mineralizada, resultando na substituição progressiva da cartilagem hialina da epífise por tecido ósseo esponjoso, excepto na superfície articular e no disco epifisário. (Eroschenko, 2008; Gartner, 2017).

Entre a epífise e metáfise, proximal e distal, formam-se as placas de crescimento cartilágneas que dão origem ao osso trabecular, onde podem ser identificadas várias zonas (figura 6), junto às duas extremidades do molde de cartilagem e afastadas do colar ósseo em desenvolvimento (Gartner, 2017):

- **Zona de cartilagem em repouso (de reserva):** localizada mais perto da superfície articular, onde as lacunas e respectivos condrócitos são pequenos e aparentemente não organizados. É uma zona larga, de cartilagem em crescimento rápido, sendo que diminui de tamanho à medida que se aproxima o final do crescimento (Gartner, 2017).

- **Zona de cartilagem em proliferação:** caracterizada pela presença de condrócitos em divisão e proliferação rápida, organizados em filas verticais paralelas entre si (grupos isogénicos axiais) e ao crescimento do osso. Os condrócitos desta zona secretam proteínas que retardam a sua hipertrofia. O crescimento em comprimento ocorre nesta zona. (Gartner, 2017).

- **Zona de cartilagem hipertrófica (em maturação):** caracterizada por um amadurecimento estrutural e funcional dos condrócitos. Estes e as respectivas lacunas aumentam em volume devido a tumefacção do núcleo e citoplasma por acumulação de glicogénio e lípidos e iniciam a secreção de fosfatase alcalina para a matriz extracelular. Também segregam FCVE (factor de crescimento vascular endotelial) que estimula a invasão da cartilagem mineralizada por capilares sanguíneos, células osteoprogenitoras e células hematopoiéticas. (Gartner, 2017).

- **Zona de cartilagem calcificada (de calcificação):** onde a matriz cartilaginea sofre mineralização e as lacunas confluem à medida que os condrócitos hipertróficos morrem. Aqui a matriz calcificada é parcialmente quebrada pelos condroclastos permanecendo, no

entanto, alguma cartilagem calcificada em forma de espículas finas, orientadas longitudinalmente na diáfise, que formam a rede tridimensional onde se irá formar a medula óssea. (Gartner, 2017).

• **Zona de ossificação:** onde as células osteoprogenitoras trazidas pelos capilares sanguíneos invadem a cartilagem calcificada e se diferenciam em osteoblastos, que fazem a deposição de osteóide sobre esta. Os osteoblastos promovem a mineralização da matriz óssea, formando uma fina camada de osso entrelaçado entre si que recobre a cartilagem calcificada (espículas mistas) e que fica rodeado por medula óssea. Estas espículas mistas são características deste tipo de ossificação. Os osteoblastos presos dentro do osteóide calcificado tornam-se osteócitos. As espículas mistas são reabsorvidas pela acção de osteoclastos formados por percussores específicos derivados dos macrófagos, recrutados anteriormente pelos condrócitos hipertrofiados. (Gartner, 2017).

Enquanto o índice mitótico da zona de proliferação é igual ao índice de reabsorção da zona de ossificação a placa epifisária permanece com a mesma espessura e o osso continua a crescer em comprimento. As cartilagens dos discos epifisários são progressivamente substituídas por trabéculas ósseas com eixos cartilagineos calcificados que vão sendo reabsorvidos pelos osteoclastos, o que permite que o canal medular da diáfise se torne confluyente com as cavidades medulares das epífises. Após a substituição total das placas epifisárias cartilaginosa por osso, o seu crescimento em comprimento cessa. (Henrikson, Mazurkiewicz, 1997; Samuelson 2007; Eroschenko, 2008; Gartner, 2017).

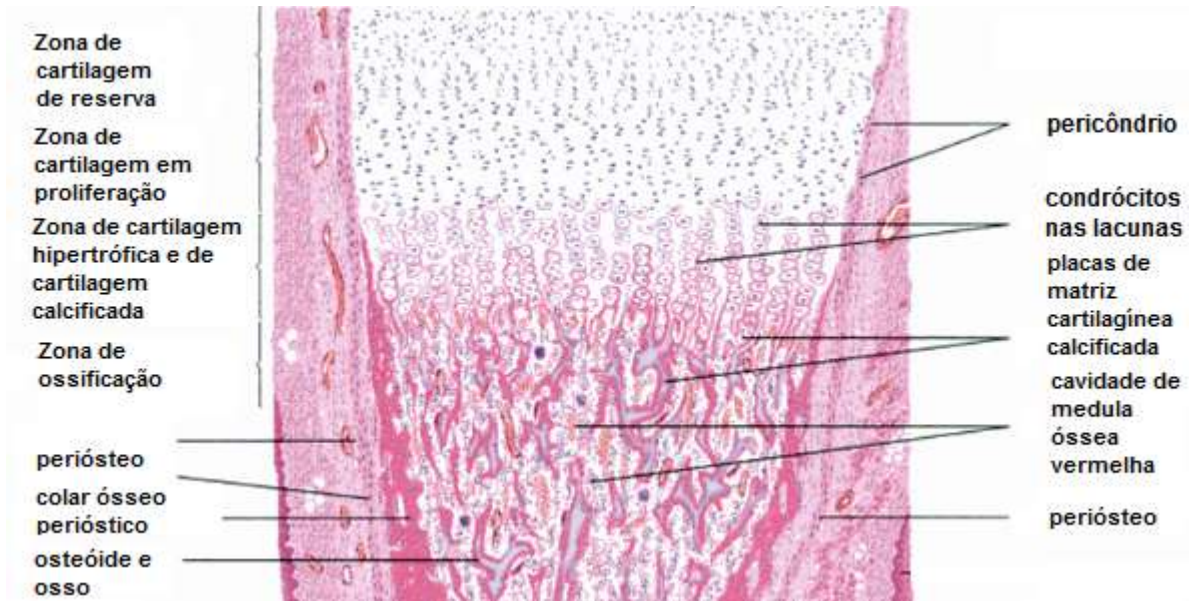


Figura 6 - Corte longitudinal de um osso longo, corado com Hematoxilina Eosina, de modo a evidenciar as várias zonas constituintes da ossificação endocondral. Imagem adaptada de Eroschenko (2008).

Nas aves, à semelhança dos mamíferos, existe um centro de ossificação primário que se gera antes da eclosão no centro da cartilagem da diáfise dos ossos longos (Fell, 1925), como se pode ver na figura 7 (A e B). No entanto, os centros de ossificação secundários nas epífises do esqueleto apendicular das aves são praticamente inexistentes e as placas de crescimento epifisárias existem apenas no tíbiotarso distal e no tarsometatarso proximal (Church and Johnson, 1964; Hogg, 1980; Naldo *et al.*, 1998). Assim, as epífises são cartilaginosas quando as aves são imaturas (figura 7) e são quase inexistentes nas aves adultas (Silver, 1970; Hildebrand, 1982; Higgins, 1999). Segundo Hogg (1980) os centros de ossificação presentes à eclosão no membro posterior são centros únicos no fêmur, tíbiotarso, fíbula, tarsometatarso distal e falanges; triplos no tarso e duplos no tarso proximal. Após a eclosão apenas um centro secundário se forma, na epífise proximal do tíbiotarso, correspondendo ao único verdadeiro centro secundário nos ossos longos (Hogg, 1980).

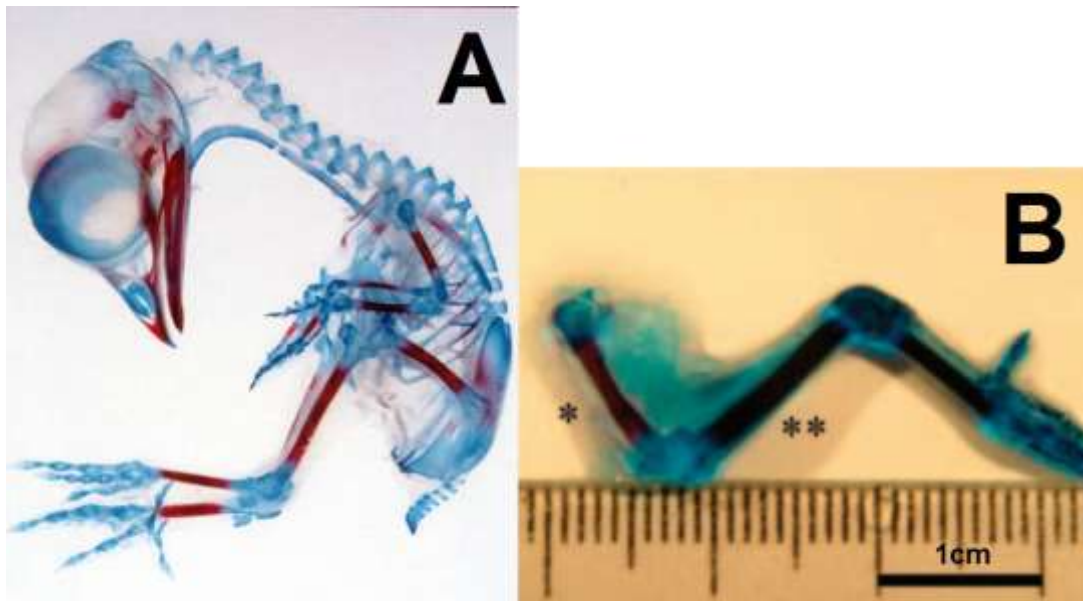


Figura 7 - A – preparação histológica de um esqueleto de um embrião de galinha; B - preparação histológica de um membro posterior (*fémur, **tibiotalarso) de um embrião de galinha com 14 dias. Ambas as preparações foram coradas com Alizarin Red que cora osso a ve a vermelho e *Alcian Blue* que cora cartilagem a azul, para evidenciar o processo de ossificação Endocondral dos ossos longos, que ocorre do centro da diáfise em direcção às epífises. Imagem A pertence ao Dr. Thomas Caceci e foi retirada de *Life as a medical student* (2008). Imagem B adaptada de Favero *et al.* (2013)

1.6.2.3. Estudos da ossificação em aves

Segundo um estudo realizado por Yair *et al.* (2017), a comparação visual (qualitativa) de padrões de mineralização de pintos de estirpes de crescimento rápido e crescimento lento, revelou que embora os padrões de mineralização sejam semelhantes entre ambas, a intensidade de mineralização e a espessura da zona perióstica mineralizada são evidentemente maiores nos pintos de crescimento lento. No entanto, esta discrepância não leva a diferenças na estrutura óssea entre os grupos estudados, o que leva a crer que a geometria óssea é um parâmetro altamente conservado e não afectado pela selecção genética (Yair *et al.*, 2017). Foi ainda possível observar, em pintos pré-eclosão, a formação de osso esponjoso seguido por osso lamelar, que corresponde a um osso fibro-lamelar de crescimento rápido, bem como depósitos minerais ao longo da periferia, para reforçar a estrutura óssea (Currey, 2002; Reznikov *et al.*, 2014). Nos últimos 2 dias de incubação os autores verificaram uma intensa deposição mineral na zona do perióstio, bem como um aumento da cavidade medular de 46% a 72%, que implica uma intensa reabsorção de osso mineralizado no endóstio, pelo que seria de esperar uma redução da densidade mineral óssea que se verifica noutras espécies, mas não ocorre nos frangos. Isto leva a crer que a

intensa mineralização perióstica seja um mecanismo específico das galinhas, que previne o decréscimo da densidade mineral óssea de modo a manter a rigidez óssea aquando da eclosão (Yair et al, 2017).

Pitsillides *et al.* (1999) fizeram a comparação entre culturas ósseas de frangos de crescimento rápido e de crescimento lento e concluíram que as primeiras têm menor capacidade de responder adequadamente à deformação mecânica, provavelmente, devido ao facto de a densidade em osteócitos ser significativamente mais baixa, já que estes actuam como sensores de tensão no osso (Palumbo *et al.*, 2004; Pearson e Lieberman, 2004; Bonewald, 2011).

No estudo de Breugelmans *et al.* (2007) acerca da determinação da idade através dos ossos em aves domésticas foram efectuadas várias medições, macroscópica e radiograficamente, ao comprimento, largura e espessura de diferentes ossos e respectivas cartilagens (esterno, tibiotarso, tarsometatarso, fémur). Estes autores observaram um aumento considerável do comprimento e largura do fémur entre as 7 e as 14 semanas em frangos de carne (de $8.75\text{cm} \pm 0.19\text{cm}$ para $11.6\text{cm} \pm 0.15\text{cm}$ de comprimento e de $1.05\text{cm} \pm 0.06\text{cm}$ para $1.2\text{cm} \pm 0.06\text{cm}$ de largura), sendo que a sua cartilagem apresentava uma espessura de mais de 3mm e não foram observadas placas de crescimento proximal ou distalmente (figura 8). O aumento dos ossos e diminuição gradual da cartilagem com a idade foi consistente em todos os ossos avaliados. No entanto, há uma diferença notável entre galinhas de aptidão carne e aptidão ovo, tendo as primeiras ossos mais largos e com maior comprimento. Este estudo concluiu, também, que a ossificação dos ossos de galinhas ainda não está completa em galinhas de aptidão carne de 14 semanas de idade. Comparando as medições efectuadas ao comprimento do fémur neste estudo com estudos anteriores de Latimer (1927) e Church e Johnson (1964), que obtiveram comprimentos máximos do fémur de 9 cm às 20 semanas de idade em galinhas de aptidão carne, consegue-se perceber o impacto da selecção genética para crescimento rápido.

Segundo Latimer (1927) o comprimento dos ossos está sujeito a variação de acordo com o género das aves, tendo os machos ossos mais longos que as fêmeas, possivelmente devido ao facto de a ossificação estar completa mais cedo nas fêmeas (Naldo *et al.*, 1998); o desaparecimento das placas de crescimento é, também, influenciado pelo género e pela estirpe das aves (Church e Johnson, 1964; Breugelmans *et al.*, 2007; Latimer, 1927).

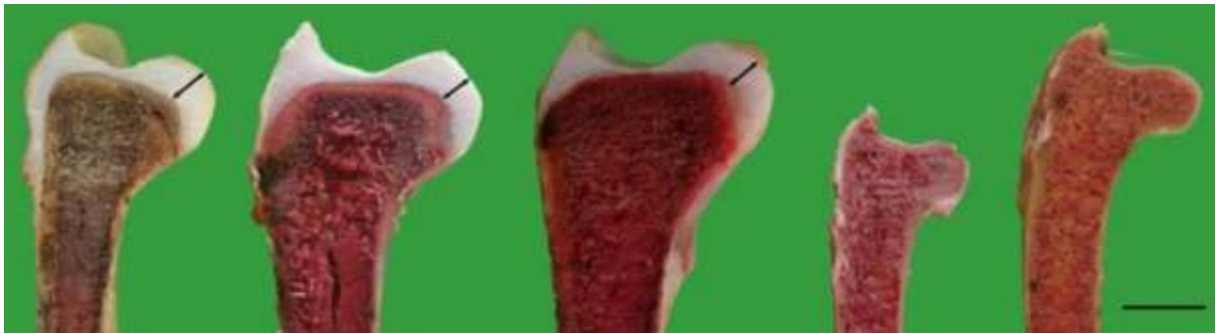


Figura 8 - Secção longitudinal da cabeça femoral (escala corresponde a 1cm). Da direita para a esquerda: frango de carne de 8 semanas, frango de carne de 10 semanas, frango de carne de 14semanas, galinha poedeira de 5 meses e galinha poedeira de 2 anos. Setas pretas indicam a diminuição da cartilagem que cobre a cabeça femoral. Imagem retirada de Breugelmans et al. (2007)

Kember (1978), Kember e Kirkwood (1987), Kirkwood *et al.* (1989) e Kember *et al.* (1990) demonstraram que as diferenças na taxa de alongamento ósseo resultam de diferenças no comprimento e espessura da zona de proliferação, bem como do tamanho da população de células. No geral, não ocorre uma grande diferença no tempo da ossificação entre espécies, mas espécies precociais, como é o caso das galinhas, apresentam camadas de cartilagem de crescimento menos espessas relativamente a espécies altriciais. Deste modo, a sua taxa de alongamento ósseo é mais baixa devido ao facto de o esqueleto de crias precociais estar mais sujeito a stress, o que restringe o tamanho da cartilagem da zona de proliferação e os limites da taxa de alongamento, não obstante a sua taxa de crescimento pós-natal poder ser ajustável dentro dos limites de tamanho da cartilagem presente. (Starck and Ricklefs, 1998).

A organização topográfica da proliferação de células na epífise dos ossos longos das aves foi descrita por Lufti (1970) como “um disco achatado que se estende horizontalmente através da epífise” pela produção de células em direcção à diáfise. A actividade proliferativa é bastante baixa aquando da eclosão, sendo este parâmetro bastante variável entre espécies. (Starck, 1996)

Williams *et al.* (2000) comparou estirpes de frangos de crescimento rápido e de crescimento lento, tendo as primeiras revelado uma menor mineralização, um aumento na proporção cálcio/fósforo e osso cortical com maior porosidade, resultante de uma rápida formação de osteon na superfície perióstica e de um preenchimento incompleto do canal resultante por osteoblastos. Estas alterações são responsáveis por lesões e fracturas ósseas durante a apanha, transporte e processamento dos frangos. (Pines, 2007)

1.7. Breve nota acerca do Bem-Estar

As afecções podais e lesões ósseas previamente abordadas violam as cinco liberdades estabelecidas em 1988 pelo *Farm Animal Welfare Council*, causando dor, desconforto e induzindo stress, para além de impedirem os animais de manifestar os comportamentos naturais da espécie e reduzirem ou eliminarem completamente o acesso dos animais afectados à comida e água, o que, em ultimo caso, leva à morte dos animais (Julian, 1998; Angel, 2007; Dibner *et al.*, 2007; Nääs *et al.*, 2009; Shim *et al.*, 2012)

Apesar de tudo, tem sido feita uma tentativa, ao longo do tempo, para remediar a situação, com directivas que contêm especificações com vista a melhorar a qualidade de vida e o bem-estar das aves de produção.

Na União Europeia, a Directiva 88/166/EEC (Comissão da Comunidade Europeia, 1986) especificou um tamanho mínimo para as gaiolas e actualmente, a Directiva 1999/74/CE estabeleceu os padrões mínimos para o bem-estar de aves poedeiras nos diversos sistemas de criação, pretendendo banir o sistema de criação em gaiolas a partir de 2012. Nessa directiva pode ler-se que as gaiolas convencionais tinham de ter um mínimo de 550cm²/ave e a partir de 01/2003 a sua construção ia ser banida, para serem substituídas definitivamente em 2012 por gaiolas enriquecidas, com um mínimo de 750cm²/ave. Para os sistemas alternativos essa mesma directiva citava que a densidade máxima permitida é de 9 aves/m², com camas com 250cm²/ave, ninhos com proporção 1 para 7 aves e poleiros com 15 cm/ave, sendo este o sistema recomendado.

Relativamente aos frangos de carne, o relatório do *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* (SCAHAW) da União Europeia, de 21 de Março de 2000, concluiu que as lesões dos membros posteriores, incluindo as mudanças consequentes na sua biologia e comportamento, são uma das principais causas de deficiência no bem-estar dos frangos, sendo estas uma consequência directa da selecção genética para produção mais rápida e eficiente de carne.

Assim sendo, tendo em conta as fracas condições de bem-estar e saúde a que estavam expostos os frangos de carne, foi publicada a Directiva 43/2007/CE que determinou que a densidade animal máxima numa instalação não pode exceder os 33 kg/m², a menos que medidas para manutenção da qualidade do ambiente sejam tomadas, podendo então a densidade ser aumentada até 39 kg/m². Foram também especificados requisitos para proporção de bebedouros e comedouros, frequência de inspecção das aves, nível sonoro, luminosidade, condições de higiene e cuidados no maneo.

Mesmo assim, continua a ser necessário desenvolver medidas no sentido de melhorar o bem-estar das aves, visto que nem todos os problemas foram resolvidos com as soluções propostas pelas várias Directivas. A longo prazo, deveriam ser produzidos

genótipos mais robustos, com menor susceptibilidade para lesões dos membros posteriores e idealmente, encontrar um equilíbrio sustentável entre a produção a um nível aceitável para a indústria avícola e as práticas de bem-estar. (PS/MJ/ART0206, 2003)

1.8. Descrição das estirpes utilizadas

Para este estudo foram utilizadas 2 estirpes, uma de galinhas de aptidão carne – *Cobb 500* - e outra de galinhas de aptidão dupla – *ISA Brown*.

A estirpe *Cobb500* foi originalmente seleccionada e desenvolvida em Inglaterra durante a década de 1970. São galinhas com mais carne no peito, tornando a sua aparência mais atraente para os consumidores. Embora esta estirpe tenha sido inicialmente seleccionada para carne no peito, foi aprimorada ao longo dos anos, sendo que hoje em dia é considerado um frango de corte mais eficaz, com um baixo índice de conversão alimentar, uma elevada taxa de crescimento e boa uniformidade da carcaça (*COBB500™*, The poultry site, 2008).

As galinhas *ISA Brown* são originárias dos Estados Unidos da América, sendo *ISA* não o nome da estirpe mas a sigla para "Institut de Selection Animale", o nome da empresa que desenvolveu esta raça híbrida em 1978 para uma óptima produção de ovos. São estirpes de baixa manutenção e bom temperamento, muito prolíficas, mas com uma esperança de vida curta, comparada com galinhas de raça pura, que ronda os 2-3 anos. Têm elevada rusticidade e boa adaptabilidade a diferentes climas, sistemas de manejo e de alojamento, para além de um baixo índice de conversão alimentar. A sua postura inicia-se mais cedo que a das galinhas de raça pura, às 20-22 semanas de idade e gera mais de 300 ovos por ano, sendo que, algumas galinhas desta estirpe mantêm uma postura estável ao longo de todo o ano. No entanto, esta elevada prolificidade só tem a duração de 2 anos. São galinhas de tamanho médio, cor castanha avelã, geralmente com penas brancas na cauda e uma crista singular. Esta estirpe não deve ser cruzada já que, sendo uma estirpe híbrida, as suas falhas genéticas têm uma elevada probabilidade de ser passadas à descendência (August, 2014).

1.9. Objectivos

O principal objectivo deste estudo foi procurar diferenças morfológicas significativas na ossificação de estirpes de aptidão carne (*Cobb 500*) comparativamente a estirpes de aptidão dupla (*ISA brown*).

Os objectivos secundários, englobados na pesquisa realizada de modo a chegar ao objectivo principal, foram:

- Medir a espessura de cada zona e a fracção/percentagem no total da zona de ossificação que ocupa, assim como o valor real;
- Comparar os valores obtidos em cada uma das várias zonas entre ambas as estirpes
- Comparar os valores obtidos nas várias zonas dos membros posteriores esquerdos e direitos entre ambas as estirpes (membros posteriores esquerdos versus membros posteriores esquerdos e membros posteriores direitos versus membros posteriores direitos)
- Comparar os valores obtidos nas várias zonas do membro posterior esquerdo e direito entre dentro da mesma estirpe (membros posteriores esquerdos versus membros posteriores direitos)
- Obter imagens histológicas da zona de ossificação da epífise proximal do fémur

2. Material e Métodos

2.1. Material

Para este estudo foram recolhidos membros posteriores de galinhas de aptidão carne da estirpe *Cobb 500*, com cerca de 50-55 dias e peso médio de 1.5Kg.

Todos os animais morreram durante o transporte para o matadouro, presumivelmente por falência cardiorrespiratória secundária a golpe de calor e sobrepopoamento das caixas de transporte, apresentando os animais apenas sinais de congestão generalizada dos órgãos internos e músculos peitorais, compatível com insuficiência cardíaca congestiva.

Foram incluídas galinhas cujas cartilagens articulares se apresentavam aparentemente normais e galinhas cujas cartilagens articulares se destacavam com facilidade do osso subcondral uni ou bilateralmente, sendo esta uma lesão comum (mas não saudável) nas aves de aptidão carne, denominada de separação epifisária (Julian, 1998). Foram rejeitados para efeitos de estudo quaisquer animais que apresentassem lesões compatíveis com doenças infecciosas ou fracturas nos ossos estudados.

Para as galinhas de aptidão dupla do grupo controlo, recolheram-se 10 membros posteriores de galinhas de aptidão dupla, da estirpe *ISA Brown* com cerca de 6-7 semanas (42-49 dias) e um peso vivo médio de 700g, abatidas por deslocamento cervical e sangria para posterior consumo doméstico.

2.2. Métodos

2.2.1. Recolha de amostras e processamento histológico

Os membros foram recolhidos e mantidos aos pares (por ave analisada), tendo sido removidos e utilizados apenas os fémures para efeitos de estudo. Recolheram-se assim 50 pares de fémures que foram fixados em formol tamponado a 10% (NBF 10%), durante pelo menos 24 horas.

Posteriormente, na hotte do laboratório foi retirada a pele e musculatura das amostras por maceração manual. Seguidamente, ainda na hotte, foram medidos os fémures das galinhas de aptidão carne (comprimento, largura e espessura da cartilagem articular) e posteriormente com o auxílio de uma serra oscilante foi cortada uma secção longitudinal da epífise proximal do fémur e respectiva cartilagem articular de todas as 100 peças e colocadas em cassetes, tendo sido identificados numericamente os pares aos quais as amostras pertenciam (ex. 1A, 1B). As cassetes foram colocadas novamente em formol 10%, onde permaneceram por mais 24 horas, para uma fixação melhorada. Após esse tempo procedeu-se à descalcificação das amostras, tendo estas sido submersas em solução descalcificadora Osteomoll® (Merck), durante pelo menos 24 horas.

Após a descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente e submetidas a processamento histológico de rotina (Anexo 1).

Finalizado o processamento histológico transferiram-se as cassetes para a mesa de inclusão (Microm EC 350-1/350-2), onde as amostras foram retiradas das cassetes e incluídas em parafina (62°C), orientadas no molde de modo a ser obtida uma vista cranial da epífise proximal. Colocaram-se os blocos de parafina com as amostras a arrefecer na placa fria (-10°C). Após estarem solidificados, os blocos foram removidos do molde e foi aparado o excesso de parafina em torno dos mesmos. Seguidamente procedeu-se à remoção do excesso de parafina da face de corte dos blocos, com auxílio do micrótopo rotativo a 20 micrómetros de espessura e colocaram-se de novo na placa fria.

Fizeram-se os cortes histológicos no micrótopo rotativo (microm HM325) a 3 micrómetros de espessura, sendo estes colocados em água fria e escolhidos os melhores cortes para colocação numa lâmina. Mergulharam-se as lâminas com os cortes em água quente no banho-maria para extensão e identificaram-se as mesmas com o número do respectivo bloco. A secagem foi realizada em estufa a 37°C 'overnight'.

Após incubação na estufa as lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina segundo o protocolo de rotina do Laboratório (Anexo 2)

Deixaram-se secar completamente as lâminas à temperatura ambiente e montaram-se com meio de montagem sintético hidrofóbico Tissue-Tek® Film® (Sakura).

O procedimento acima descrito foi repetido para as amostras do grupo controlo, com excepção da descalcificação que foi efectuada antes do corte das amostras, enquanto as epífises do fémur se encontravam completas, devido ao reduzido tamanho destas em comparação com as galinhas de aptidão carne (cerca de 2 vezes menor). O corte da amostra foi executado após a descalcificação e lavagem em água corrente, com auxílio de um bisturi.

2.2.2. Obtenção de dados e análise estatística

Após as lâminas estarem completamente secas procedeu-se à sua observação no microscópio óptico, o qual tem acoplado uma câmara fotográfica que permitiu a visualização da imagem no computador, tornando assim possível a medição das diferentes zonas de ossificação, recorrendo ao *software* analySIS:

- Zona cartilagem de reserva (ZR);
- Zona de cartilagem em proliferação (ZP);
- Zona de cartilagem hipertrófica (ZH);
- Zona de ossificação total (ZOT), que para efeitos deste trabalho foi dividida em zona de ossificação superficial (ZOS), que apresentava <30% de matriz ossificada e zona de ossificação profunda (ZOP), com <30% cartilagem.

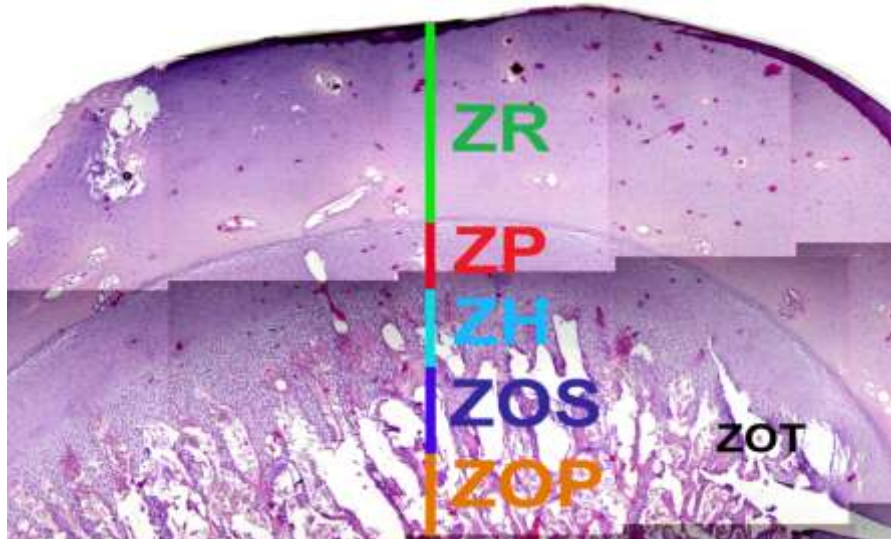


Figura 9 - Montagem de imagens de microscopia óptica, de vários cortes histológicos em secção longitudinal, corados com Hematoxilina Eosina (400x), onde se pode observar parte da cabeça do fémur e respectiva cartilagem articular (epífise proximal) de uma galinha de aptidão dupla. Nesta imagem estão indicadas as várias zonas medidas. Legenda: ZR – Zona de reserva (verde); ZP – Zona de cartilagem em proliferação (vermelho); ZH – Zona de cartilagem hipertrófica (azul claro); ZOS – Zona de ossificação superficial (azul escuro); ZOP – Zona de ossificação profunda (laranja); ZOT – Zona de ossificação total (preto). Imagem original da autora.

Com essas medições criou-se uma base de dados no programa Microsoft Excel 2013, a partir do qual foram calculados para cada um dos grupos: a média dos valores de espessura para cada zona referida e a percentagem que cada zona ocupa no total da cabeça e colo do fémur.

De seguida, recorreu-se ao programa IBM SPSS® Statistics para fazer o tratamento estatístico dos dados obtidos. Utilizou-se o teste T-independente para um intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), designado tendencialmente significativo, para fazer a comparação entre as várias zonas dos membros posteriores das galinhas de aptidão dupla e as galinhas de aptidão carne, tendo como Hipótese nula (H_0) que não há diferença entre as duas zonas; foi também utilizado o mesmo teste para comparar as várias zonas do membro posterior esquerdo e direito das galinhas de aptidão dupla com as zonas esquerda e direita das galinhas de aptidão carne, respectivamente, assumindo H_0 = não há diferença entre as duas zonas. Foi ainda usado o teste T-paired para um intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) para comparar a zona esquerda e a zona direita da mesma galinha de cada grupo, tendo sido realizado tanto para as galinhas de aptidão dupla como para as galinhas de aptidão carne, assumindo H_0 = não há diferença entre as duas zonas.

No programa Microsoft Excel 2013 foi também calculada a média do comprimento, largura e espessura da cartilagem articular, para as galinhas de aptidão carne, com as medições realizadas anteriormente aquando da preparação das amostras.

3. Resultados

3.1. Histologia

Durante a observação histológica, tornou-se óbvio que, enquanto na observação macroscópica a cartilagem parecia destacar-se do osso subcondral, na realidade esta separação epifisária acontece por fractura completa e sagital da cartilagem acima da zona hipertrófica (ZH), mantendo-se parte da cartilagem hipertrófica e toda a zona de ossificação incólumes.



Figura 10 - Montagem de imagens de microscopia óptica, de vários cortes histológicos em secção longitudinal, corados com Hematoxilina Eosina (400x), onde se pode observar a epífise proximal do fémur de uma galinha de aptidão dupla. Imagem original da autora.

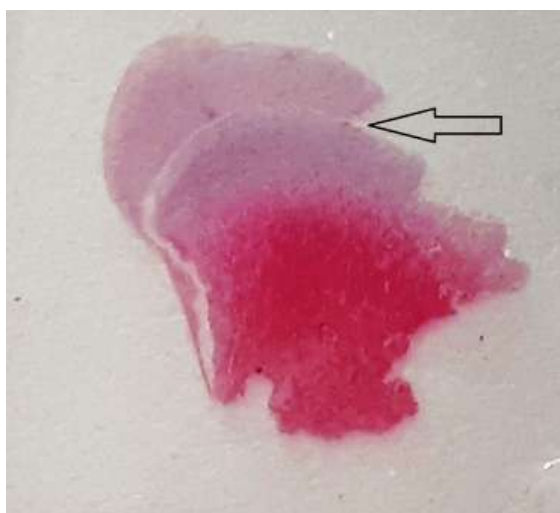


Figura 11 - Imagem histológica macroscópica, corada a Hematoxilina Eosina, de um corte longitudinal de uma epífise proximal do fémur de uma galinha de aptidão carne. Nesta imagem pode-se observar separação epifisária no seu estadio inicial (seta). Imagem original da autora.

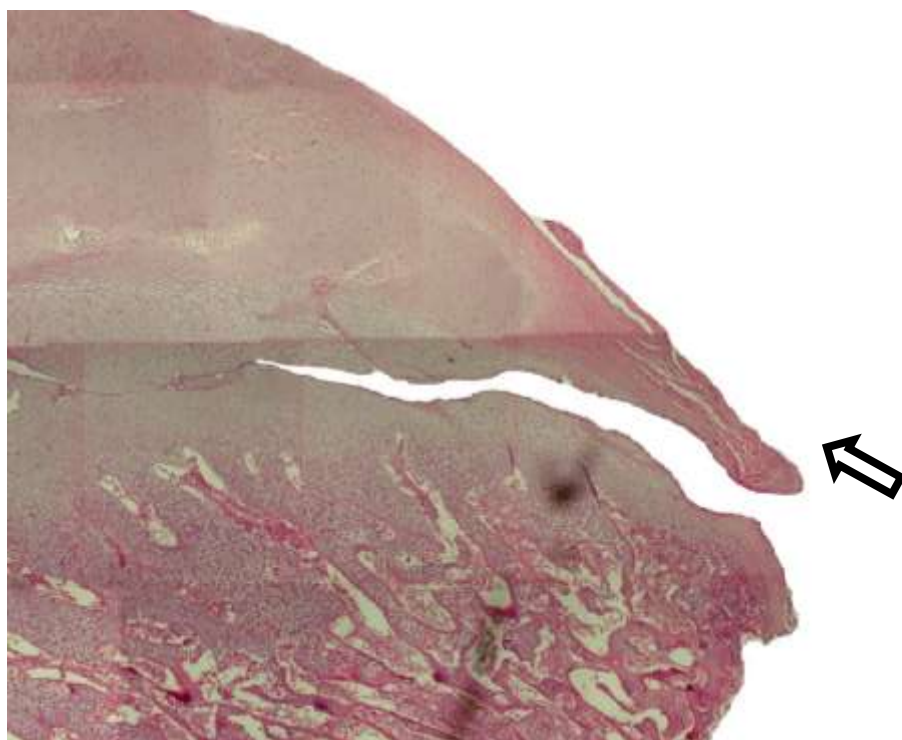


Figura 12 - Montagem de imagens de microscopia óptica, de vários cortes histológicos em secção longitudinal, corados com Hematoxilina Eosina (400x), onde se pode observar parte da cabeça do fémur e respectiva cartilagem articular (epífise proximal) de uma galinha de aptidão carne. Nesta imagem é evidenciada a separação epifisária (seta). Imagem original da autora.

3.2. Média da espessura das diferentes zonas de ossificação

Com o cálculo da média da espessura de cada zona de ossificação para ambos os grupos em estudo (gráfico 1), foi possível uma comparação directa entre as referidas zonas entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo), o que logo à partida revelou a diferença notável de tamanho dos ossos, que já tinha sido observada durante a preparação das amostras.

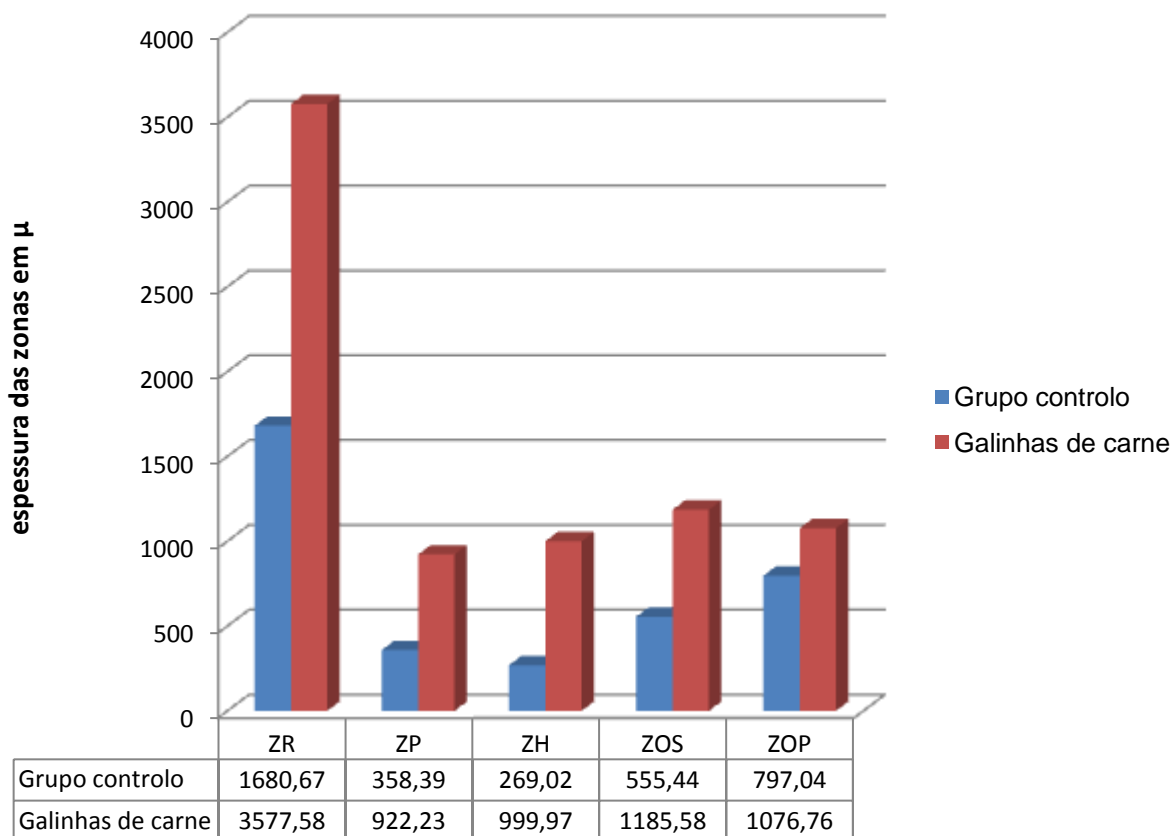


Gráfico 1 - Média da espessura de cada zona de ossificação da epífise proximal do fémur, medida microscopicamente, para ambos os grupos em estudo. Legenda: ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda.

3.3. Percentagens ocupadas por cada zona no total da zona de ossificação

No entanto, aquando do cálculo das percentagens ocupadas por cada zona relativamente ao total da área de ossificação da epífise proximal do fémur (gráfico 2) observou-se que aparentemente estas não diferiam muito entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo).

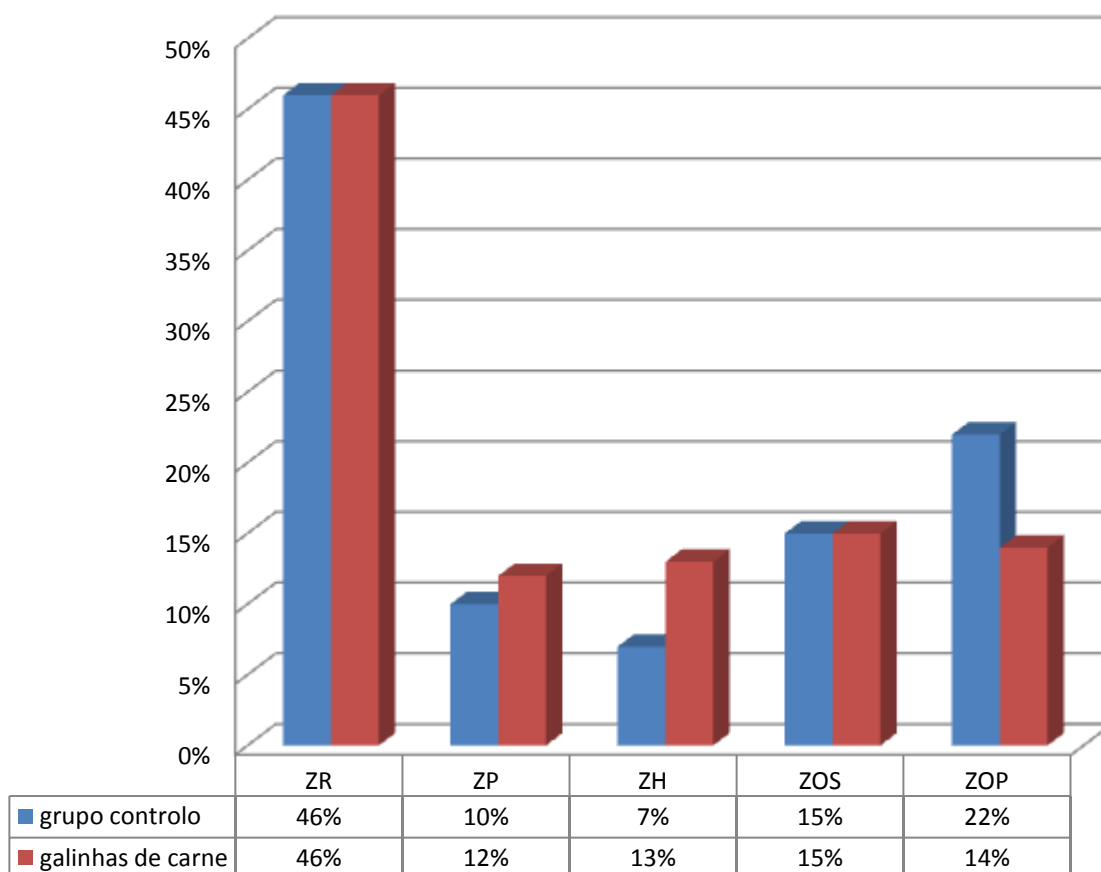


Gráfico 2 - Percentagens ocupadas por cada zona relativamente ao total da área de ossificação da epífise proximal do fémur, em ambos os grupos em estudo. Legenda: ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda.

3.4. Teste T- independente

Assim sendo, para averiguar se existe uma diferença estatisticamente significativa entre os valores calculados anteriormente:

A. Foi conduzido um teste T- independente para comparar a média das várias zonas de ossificação da epífise proximal do fémur, entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo). Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 1:

Tabela 1 - Comparação das zonas de ossificação da epífise proximal do fémur entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo):

Zona	Média grupo controlo	Média Galinhas de carne	<i>p-value</i>
ZR	0.46± 0.05	0.45± 0.08	0.543
ZP	0.1± 0.02	0.12± 0.04	0.078
ZH	0.07± 0.01	0.13± 0.04	0
ZOT	0.37± 0.05	0.30± 0.09	0.004
ZOS	0.15± 0.03	0.16± 0.05	0.899
ZOP	0.21± 0.07	0.15± 0.06	0.001

Legenda: ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda. Destacado a negrito: *p-value* cujos valores são inferiores a 0.05.

Como é possível observar na tabela, apenas as zonas de cartilagem hipertrófica, de ossificação profunda e de ossificação total demonstram uma diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0.05$). As restantes zonas de ossificação não apresentam diferenças significativas na fracção que ocupam na cabeça do fémur ($p > 0.05$).

B. Foi também conduzido um teste T- independente para comparar as várias zonas do membro posterior esquerdo e direito das galinhas de aptidão carne com as zonas esquerda e direita das galinhas de aptidão dupla (grupo controlo), respectivamente. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 2:

Tabela 2 - Comparação das várias zonas de ossificação da epífise proximal do fémur do membro posterior esquerdo e direito entre as galinhas de aptidão carne e as galinhas de aptidão dupla (grupo controlo):

Zona	Média grupo controlo	Média Galinhas de carne	<i>p-value</i>
ZR esquerda	0.48±0.05	0.45±0.07	0.317
ZR direita	0.44±0.04	0.45±0.09	0.742
ZP esquerda	0.095±0.02	0.12±0.04	0.115
ZP direita	0.10±0.03	0.12±0.04	0.384
ZH esquerda	0.07±0.01	0.13±0.04	0
ZH direita	0.08±0.02	0.12±0.04	0
ZOT esquerda	0.35±0.05	0.29±0.08	0.162
ZOT direita	0.38±0.06	0.31±0.01	0.093
ZOS esquerda	0.17±0.04	0.15±0.06	0.584
ZOS direita	0.14±0.02	0.16±0.05	0.165
ZOP esquerda	0.22±0.08	0.15±0.06	0.012
ZOP direita	0.21±0.06	0.15±0.06	0.041

ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda. Destacado a negrito: *p-value* cujos valores são inferiores a 0.05

Como é possível observar na tabela, apenas as zonas de cartilagem hipertrófica esquerda e direita e de ossificação profunda esquerda e direita demonstram uma diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0.05$). As restantes zonas de ossificação, tanto esquerda como direita, não apresentam diferenças significativas entre grupos ($p > 0.05$).

3.5. Teste T- emparelhado

Foi conduzido um teste T- emparelhado para comparar as várias zonas de ossificação da epífise proximal do fémur do membro posterior esquerdo e direito da mesma estirpe (Tabelas 3 e 4). Os resultados obtidos são os seguintes:

Tabela 3 - Comparação das zonas de ossificação da epífise proximal do fémur dos membros posteriores esquerdo e direito das galinhas de aptidão carne:

Zona	Média lado esquerdo	Média lado direito	p-value
ZR	0.45±0.07	0.45±0.09	0.579
ZP	0.12±0.04	0.12±0.04	0.424
ZH	0.13±0.04	0.12 ±0.04	0.210
ZOT	0.29±0.08	0.31±0.09	0.503
ZOS	0.15±0.06	0.16±0.05	0.330
ZOP	0.15±0.06	0.15±0.06	0.908

ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda.

De acordo com estes resultados ($p>0.05$) não há diferenças significativas entre o lado esquerdo e direito de nenhuma das zonas das galinhas de aptidão carne.

Tabela 4 -Comparação das zonas de ossificação da epífise proximal do fémur dos membros esquerdo e direito das galinhas de aptidão dupla (grupo controlo):

Zona	Média lado esquerdo	Média lado direito	p-value
ZR	0.48±0.05	0.44±0.04	0.329
ZP	0.09±0.02	0.10±0.03	0.671
ZH	0.74±0.01	0.75±0.02	0.872
ZOT	0.39±0.06	0.35±0.07	0.417
ZOS	0.17±0.04	0.14±0.02	0.181
ZOP	0.22±0.08	0.20±0.06	0.798

ZR – Zona de reserva/ Zona de cartilagem em repouso; ZP – Zona proliferativa/ Zona de cartilagem em proliferação; ZH – Zona de cartilagem hipertrófica; ZOS – Zona de ossificação superficial; ZOP – Zona de ossificação profunda.

De acordo com estes resultados ($p>0.05$) não há diferenças significativas entre o lado esquerdo e direito de nenhuma das zonas das galinhas de aptidão dupla (grupo controlo).

3.6. Média das medidas do fémur das galinhas de aptidão carne

Os resultados obtidos relativamente às medições do fémur foram os seguintes:

- Comprimento médio de 9.3cm – medida da extremidade mais saliente da epífise proximal até à extremidade mais saliente da epífise distal;
- Largura média de 1.2cm – medida no centro da diáfise femoral;
- Cartilagem com espessura média de 3,71mm – medida na zona central da cartilagem articular da cabeça femoral.

4. Discussão

Mesmo antes de iniciado o estudo histológico, são possíveis duas observações que corroboram (e são corroboradas) os dados descritos na literatura disponível.

A primeira situação é a diferença no tamanho das aves, sendo as galinhas de carne evidentemente maiores (1500g), com cerca do dobro do peso médio das galinhas de aptidão dupla (700g). Estas observações corroboram o que foi descrito por Zhao *et al.* (2004), Druyan (2010) e Yair *et al.* (2017), em que o peso das estirpes de carne, entre o nascimento e o abate, sofre um aumento exponencial, com um peso final que pode ser até cinco vezes superior ao das estirpes de aptidão ovo com a mesma idade. Os mesmos autores afirmam que as estirpes de aptidão carne têm números e tamanhos de fibras musculares 2 a 3 vezes maiores que as estirpes de aptidão ovo apresentando, igualmente, um desenvolvimento muscular que é 8 vezes mais rápido do que o das últimas, descrito por Aberle and Stewart, (1983), Oshima *et al.* (2007), Zheng *et al.* (2009) e Hassanpour *et al.* (2010).

A segunda, observada aquando da colheita de amostras, foi o facto de as cartilagens articulares das galinhas de aptidão carne se destacarem com facilidade uni ou bilateralmente, o que ocorreu em 97 dos membros posteriores recolhidos. Esta lesão, descrita por Julian (1998), denominada separação epifisária, ocorre em aves de crescimento rápido e indica a presença de outras lesões subjacentes nomeadamente discondroplasia ou osteomielite. Esta situação apenas se verificou em um dos 10 membros posteriores recolhidas das galinhas do grupo controlo. Fazendo uma extrapolação deste número para um total de 100 membros posteriores, de modo a ter uma dimensão comparável com as galinhas de aptidão carne, o número de membros posteriores com esta lesão é apenas de 10 em 100, mantendo-se muito aquém do obtido nas galinhas de aptidão carne. Deste modo confirma-se que, de facto, as galinhas sujeitas a um crescimento rápido apresentam maior ocorrência de separação epifisária.

Para além das situações descritas anteriormente foi também observado, aquando da sua manipulação, que os ossos das galinhas de carne se revelaram maiores tanto em comprimento como em largura relativamente aos das galinhas do grupo controlo.

No estudo de Breugelmans *et al.* (2007) verificou-se que às 7 semanas de idade, os frangos de carne apresentavam um comprimento médio do fémur de 8,75cm e largura média de 1,05cm, sendo que a sua cartilagem apresentava uma espessura de mais de 3mm e não foram observadas placas de crescimento proximal ou distalmente. Os resultados obtidos no presente trabalho apoiam os dados do estudo acima referido, com um valor médio de comprimento de 9,3cm, largura de 1,2cm, cartilagem com espessura média de 3,71mm e, também, não foi observada uma placa de crescimento na epífise proximal (a única observada para fins deste estudo), o que está de acordo com informações de estudos anteriores de Church and Johnson (1964), Hogg (1980) e Naldo *et al.* (1998), os quais observaram que as placas de crescimento epifisárias clássicas dos mamíferos existem apenas no tíbiotarso distal e no tarsometatarso proximal das aves.

Relativamente às diferenças nas zonas de ossificação que eram espectáveis entre ambos os grupos de galinhas em estudo, observou-se que existem diferenças significativas nas zonas de cartilagem hipertrófica e na zona de ossificação total (nesta última aparentemente devido a diferenças significativas na zona de ossificação profunda).

As galinhas de aptidão carne apresentam uma zona de cartilagem hipertrófica (em maturação) maior e uma zona de ossificação profunda menor, comparativamente às galinhas de aptidão dupla (grupo controlo).

Estas diferenças podem ser uma das causas para a fragilidade conhecida dos ossos das galinhas de carne e para o facto de '*o esqueleto das estirpes de crescimento rápido não conseguir suportar os elevados pesos corporais destas aves de forma eficaz*' como afirmado por Pitsillides *et al.* (1999). Na zona de cartilagem hipertrófica, que se encontra aumentada nesta estirpe, há um aumento em volume dos condrócitos e das respectivas lacunas, devido à tumefacção do núcleo e citoplasma por acumulação de glicogénio e lípidos, sendo por isso, pobre em matriz extracelular, responsável por conferir resistência ao tecido ósseo. Pelo contrário, a zona de ossificação, onde os osteoblastos promovem a mineralização da matriz óssea depositada e se inicia a formação de osso, está bastante diminuída. Esta informação é suportada por Williams *et al.* (2000), cujo estudo também revelou que estirpes de frangos de crescimento rápido apresentam menor mineralização óssea relativamente a estirpes de crescimento lento.

Quanto aos resultados dos testes T- emparelhado para comparar a zona esquerda e a zona direita dentro do mesmo grupo de galinhas, estes foram os esperados, sem

diferenças significativas entre o lado esquerdo e direito de nenhuma das zonas das galinhas de aptidão carne.

4.1. Limitações do trabalho

A medição das várias zonas, para todas as amostras em estudo, foi realizada manualmente, estando, por isso, sujeita a erro humano.

O tratamento estatístico foi efectuado sem recurso a empresas ou pessoal especializado; ainda assim, a análise e a interpretação dos resultados foi a mais cuidadosa possível.

Outra limitação do estudo poderá estar relacionada com a não representatividade da amostra utilizada como “grupo controlo”, na qual foram apenas utilizados 5 frangos da estirpe de aptidão dupla.

Finalmente a falta de informação e estudos na área de histologia relacionada com este tema, não permitiu extensa comparação directa de resultados com o presente estudo.

5. Conclusão

Numa sociedade cada vez mais exigente ao nível dos produtos que compra mas, também, cada vez mais preocupada e informada acerca do bem-estar animal, torna-se cada vez mais importante atingir um equilíbrio sustentável entre a produção a um nível aceitável para a indústria avícola e ao mesmo tempo, manter práticas de bem-estar. Sendo que o bem-estar das galinhas de aptidão carne encontra-se intimamente ligado à saúde e integridade dos seus membros posteriores.

Pensa-se que terão sido alcançados os objectivos deste estudo, apesar das limitações já referidas, tendo sido possível observar que os fémures destas galinhas apresentam uma zona de cartilagem hipertrófica mais espessa e uma zona de ossificação mais fina, cuja coexistência poderá explicar, pelo menos parcialmente, a maior fragilidade dos ossos longos destas aves, contribuindo para os vários problemas podais.

Seria interessante fazerem-se mais estudos na área da histologia/histopatologia relacionada com os problemas podais, por exemplo com a utilização de animais mais jovens e mais velhos que os utilizados neste estudo, para se perceber como se processa a ossificação destes animais a nível histológico, dado que não há muita informação específica desta área disponível actualmente.

6. Referências bibliográficas

- Favero, S. L., Vieira, C. R., Angel, A., Bos-Mikich, N., Lothhammer, D., Taschetto, R. F., Cruz, A. e Ward, T. L. (2013). Development of bone in chick embryos from Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *Poultry Science*, 92(2):402–411
- Aberle, E. D. e Stewart, T. S. (1983). Growth of fiber types and apparent fiber number in skeletal muscle of broiler- and layer-type chickens. *Growth. Summer*, 47(2):135-44.
- Angel, R. (2007). Metabolic Disorders: Limitations to Growth of and Mineral Deposition into the Broiler Skeleton after Hatch and Potential Implications for Leg Problems. *The Journal of Applied Poultry Research*, 16(1):138–149.
- Appleby, M. C. (2003). The European Union ban on conventional cages for laying hens: History and prospects. *J. Appl. Anim. Welfare. Sci.*, 6:10-12.
- Bacha Jr, W.J. e Bacha, L.M. (2012). *Color Atlas of Veterinary Histology*. (3a Ed.). Londres: Wiley-Blackwell publishing / John Wiley & sons, ltd.
- Barton, N. F. (1994). Breeding meat type poultry for the future targets for selection, limits to performance and market requirements for chicken. Page 33–38 in: *Proceedings of the 9th European Poultry Conference, 7–12 August, Glasgow, U.K.*
- Bednarczyk, M. e Rosinski, A. (1999). Comparison of egg hatchability and in vitro survival of goose embryos of various origins. *Poult. Sci.*, 78:579–585.
- Bednarczyk, M., Kiecz lewski, K., and Szwaczkowski, T. (2000). Genetic parameters of the traditional selection traits and someclutch traits in a commercial line of laying hens. *Arch. Geflugelk.*, 64:129–133.
- Bednarczyk, M., Mazanowski, A. e Sobek, Z. (1985). Conservation et incubation des oeufs d'oies. Comparaison entre deux races. *Arch. Geflugelk.*, 49:46–49.
- Bednarczyk, M., Paolone, A., Ricciuto, G., Benkova, J., Elminowska-Wenda, G., Koncekova, Z., Rutkowski, A., e Maiorano, G. (2010). Nutritional and sensorial meat quality of different selected Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Ital. J. Anim. Sci.*, 6:725.
- Berg C. e Sanotra G.S., (2001). A survey of the prevalence of leg weakness in Swedish broiler chickens – A pilot study. *Svensk-Veterinertidning*, 53 (1): 5-13.
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *J. Bone Min. Res.*, 26:229–238.
- Bradshaw, R.H., Kirkden, R.D. e Broom, D.M. (2002). A review of the aetiology and pathology of leg weakness in broilers in relation to welfare. *Avian Poultry Biology Reviews*, 13: 45-103.

Breugelmans, S., Muylle, S., Cornillie, P., Saunders, J. e Simoens, P. (2007). Age determination of poultry: a challenge for customs. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, 76:423-430

Buzala, M., Janicki, B., e Czarnecki, R. (2015). Consequences of different growth rates in broiler breeder and layer hens on embryogenesis, metabolism and metabolic rate: a review. *Poult. Sci.*, 94:728–733.

Canello, S., Gasparini, G., Luisetto, P., Di Cerbo, A. e Pomerri, F. (2016). Bone computed tomography mineral content evaluation in chickens: effects of substances in homeopathic concentration. *Homeopathy*, 105:92-95.

Caplen, G., Hothersall, B., Murrell, J. C., Nicol, C. J., Waterman-Pearson, A. E., Weeks, C. A., e Colborne, G. R. (2012). Kinematic analysis quantifies gait abnormalities associated with lameness in broiler chickens and identifies evolutionary gait differences. *PLoS One.*, 7(7):e40800.

Chen, P., Suh, Y., Choi, Y. M., Shin, S., e Lee, K. (2014). Developmental regulation of adipose tissue growth through hyperplasia and hypertrophy in the embryonic Leghorn and broiler. *Poult. Sci.*, 93:1809–1817.

Church, L.E. e Johnson, L.C. (1964). Growth of long bones in the chicken – Rates of growth in length and diameter of the humerus, tibia, and metatarsus. *American Journal of Anatomy*, 114: 521-538.

Classen, H. L., e Riddell, C. (1989). Photoperiodic effects on performance and leg abnormalities in broiler chickens. *Poultry Sci.*, 68:873–879.

Colville, T. P. e Bassert, J.M. (2016). *Clinical anatomy and physiology for veterinary technicians*. (3^a Ed.) St. Louis, Missouri : Elsevier,

Cook, M. E. e Bai, Y. (1994). Factors influencing growth plate cartilage turnover. *Poultry Sci.*, 73:889–896.

Cooke, V. E., Gilpin, S., Mahon, M., Sandercock, D. A. e Mitchell, M. A. (2003). A comparison of skeletal muscle fibre growth in broiler and layer chickens. *Br. Poult. Sci.*, 44:33–34.

Corr, S. A., Gentle, M. J., McCorquodale, C. C., e Bennett, D. (2003). The effect of morphology on walking ability in the modern broiler: A gait analysis study. *Anim. Welf.*, 12:159–171

Currey, J. D. (2002). The structure of bone tissue. in *Bones: Structure and Mechanics* (17-19). NY, USA: Princeton University Press.

Diaz, G. J., Julian, R. J. e Squires, E. J. (1994). Lesions in broiler chickens following experimental intoxication with cobalt. *Avian Dis.*, 38:308–316

Dibner, J. J., Richards, J. D., Kitchell, M. L. e Quiroz, M. A. (2007). Metabolic challenges and early bone development. *J. Appl. Poult. Res.*, 16:126–137.

Druyan, S. (2010). The effects of genetic line (broilers vs. layers) on embryo development. *Poult. Sci.*, 89:1457–1467

Duff, S.R. (1985). Dyschondroplasia/osteochondrosis of the femoral trochanter in the fowl. *J Comp Pathol.*, 95(3):363-71.

Edwards Jr., H. M. (1987). Effects of thiuram, disulfiram and a trace element mixture on the incidence of tibial dyschondroplasia in chickens. *J. Nutr.*, 117:964–969.

Emmerson, D. A. (1997). Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry. *Poult. Sci.*, 76:1121–1125.

Eroschenko, V. P. (2008). DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. (11^a Ed.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Farquharson, C. e Jefferies, D. (2000). Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poultry Sci.*, 79:994-1004.

Favero, S., Vieira, L.C., Angel, R., Bos-Mikich, A., Lothhammer, N., Taschetto, D., Cruz, R. F. A. e Ward, T. L. (2012). Development of bone in chick embryos from Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *Poultry Science*, 92:402–411

Fell, H.B.(1925). The histogenesis of cartilage and bone in the long bones of the embryonic fowl. *Journal of Morphology and Physiology*, 40:417-459.

Ferket, P. R., Oviedo-Rondón, E. O., Mente, P.L., Bohorquez, D.V., Santos, A. A., Grimes, J. L. e Felts, V. 2009. Organic trace minerals and 25-hydroxycholecalciferol affect performance characteristics, leg abnormalities, and biomechanical properties of leg bones of turkeys. *Poult. Sci.*, 88:118–131.

Fontana, E. A., Weaver, W. D., Watkins, B. A. e Denbow, D.M. (1992). Effect of early feed restriction on growth, feed conversion, and mortality in broiler chickens. *Poultry Sci.*, 71:1296–1305.

Gartner, L. (2017). *Tratado de Histologia*. (4^a Ed.). Brasil: Elsevier Editora Ltda.

Gillespie, J.R. e Flanders, F. (2009). *Modern Livestock & Poultry Production*. (8^a Ed.). USA: Delmar. Cengage Learning.

Gonzalez-Ceron, F., Rekaya, R., e Aggrey, S. E. (2015). Genetic analysis of bone quality traits and growth in a random mating broiler population. *Poult. Sci.*, 94:883–889.

Gordon, S. H. (1994). Effects of day length and increasing day length programmes on broiler welfare and performance. *World's Poult. Sci.*, J. 50:269–282.

Griffin, H. D., Windsor, D. e Goddard, C. (1991). Why are young broiler chickens fatter than layer–strain chicks? *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 100:205–210.

Groves, P. J. e Muir, W. I. (2014). A meta-analysis of experiments linking incubation conditions with subsequent leg weakness in broiler chickens. *PLoS One.*, 9(7):e102682

Grupioni, N. V., Cruz, V. A. R., Stafuzza, N. B., Freitas, L. A., Ramos, S. B., Savegnago, R. P., Peixoto, J. O., Ledur, M. C. e Munari, D. P. (2015). Phenotypic, genetic and environmental parameters for traits related to femur bone integrity and body weight at 42 days of age in a broiler population. *Poult Sci.*, 94(11):2604-7

Hafez, H. M. e Hauck, R. (2005). Genetic selection in turkeys and broilers and their impact on health conditions. In: World Poultry Science Association, 4th European Poultry Genetics Symposium, Dubrovnik, Croatia.

Hall, C. e Sandilands, V. (2007). Public attitudes to the welfare of broiler chickens. *Animal Welfare*, 16: 499–512.

Harper, J. M., Mee, M. P., Arnold, J. E., Boorman, K. N., Mayer, R. J. e Buttery, P. J. (1999). Ubiquitin gene expression and ubiquitin conjugation in chicken muscle do not reflect differences in growth rate between broiler and layer birds. *J. Anim. Sci.*, 77:1702–1709.

Hassanpour, H., Teshfam, M., Momtaz, H., Brujeni, G. N. e Shahgholian, L. (2010). Up-regulation of endothelin-1 and endothelin type A receptor genes expression in the heart of broiler chickens versus layer chickens. *Res. Vet. Sci.*, 89:352–357.

Havenstein, G. B., Ferket, P. R. e Qureshi, M. A. (2003). Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.*, 82:1509–1518.

Havenstein, G. B., Ferket, P. R. e Qureshi, M. A. (2003). Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.*, 82:1500–1508.

Havenstein, G. B., Ferket, P. R., Scheideler, S. E. e Larson, B. T. (1994). Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed “typical” 1957 and 1991 broiler diets. *Poultry Sci.*, 73:1785–1794

Henrikson, R.C e Mazurkiewicz, J.E. (1997). *The National Medical Series for Independent Studies: Histology*, Volume 518. USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Hester, P. Y. (1994). The role of environment and management on leg abnormalities in meat-type fowl. *Poultry Sci.*, 73:904–915.

Higgins, J. (1999). Túnel: A Case Study of Avian Zooarchaeology and Taphonomy. *Journal of Archaeological Science*, 26(12):1449-1457

Hildebrand, M. (1982). *Analysis of vertebrate structure*. (2^a Ed.). New York: John Wiley

Hocking, P. M., Hughes, B. O. e Keer-Keer, S. (1997). Comparison of food intake, rate of consumption, pecking activity and behaviour in layer and broiler breeder males. *Br. Poult. Sci.*, 38:237–240.

Hogg, D. A. (1980). A re-investigation of the centers of ossification in the avian skeleton at and after hatching. *J. Anat.*, 130(4):725-743

Jego, Y., Besbes, B. e Donal, J. L. (1995). Analyse de la variabilité génétique et de la réponse à la sélection dans deux lignées commerciales de poulets de chair. (125–127) in: *Proceedings of the Ieres Journées de la Recherche Avicole*. 28–30 mars, Angers, France.

Johari, S., Maeda, Y., Okamoto, S. e Hashiguchi, T. (1993). Comparison of calpain and calpastatin activities in skeletal muscle of broiler and layer chickens. *Br. Poult. Sci.*, 34:819–824.

Julian, R.J. (1990). Avian Skeletal Disease Symposium. (1–11) in: *Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists/AVMA*, San Antonio, TX.

Julian, R.J. (1998). Rapid growth problems: Ascites and skeletal deformities in broilers. *Poult. Sci.*, 77:1773–1780.

Julian, R.J. (2005). Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry – A review. *Vet. J.*, 169:350-369.

Jung, K. C., Jung, W. Y., Lee, Y. J., Yu, S. L., Choi, K. D., Jang, B. G., Jeon, J. T. e Lee, J. H. (2007). Comparisons of chicken muscles between layer and broiler breeds using proteomics. *Asian–Aust. J. Anim. Sci.*, 20:307–312.

Kaiser, G.W. (2008). *The Inner Bird: Anatomy and Evolution*. Canada: UBC Press

Kapell, D. N. R. G., Hill, W. G., Neeteson, A.M., McAdam, J., Koerhuis, A. N. M. e Avendano, S. 2012. Twenty-five years of selection for improved leg health in purebred broiler lines and underlying genetic parameters. *Poult. Sci.*, 91:3032–3043

Kaukonen, E., Norring, M. e Valros, A. (2017). Perches and elevated platforms in commercial broiler farms: use and effect on walking ability, incidence of tibial dyschondroplasia and bone mineral content. *Animal*, 11(5):864-871

Kember, N. F., e Kirkwood, J. K. (1987). Cell kinetics and longitudinal bone growth in birds. *Cell Tissue Kinet.*, 20(6):625–629.

Kember, N. F., Kirkwood, J. K., Duignan, P. J., Godfrey, D., e Spratt, D. J. (1990). Comparative cell kinetics of avian growth plates. *Res. Vet. Sci.*, 49:283–288.

Kember, N.F. (1978). Cell kinetics and the control of growth in long bones. *Cell tissue kinet.*, 11:477-485

Kestin, S., Su, G. e Sorensen, P. (1999). Different commercial broiler crosses have different susceptibilities to leg weakness. *Poult. Sci.*, 78:1085–1090

- Kestin, S.C., Knowles, T.G., Tinch, A. E. e Gregory, N.G. (1992). Prevalence of leg weakness in broiler chickens and its relationship with genotype. *Veterinary Record*, 131:190-194
- Kirkwood, J.K., Duignan, P.J., Kember, N.F., Bennett, P.M., e Price, D.J., (1989). The growth rate of tarsometatarsus bone in birds. *J. Zool. Lond.*, 217:403-416
- Kirkwood, J.K., Spratt, D.M. e Duignan, P.J. (1989). Patterns of cell proliferation and growth rate in limb bones of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Res. In Vet. Sci.*, 47:139-147
- Knowles, T.G., Kestin, S.C., Haslam, S.M., Brown, S.N., Green, L.E., Butterworth, A., Pope, S. J., Pfeiffer, D. e Nicol, C. J. (2008). Leg disorders in broiler chickens: Prevalence, risk factors and prevention. *PLoS One*. 3(2):e1545.
- Koenen, M. E., Boonstra-Blom, A. G., e Jeurissen, S. H. M. (2002). Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 89:47–56
- Laster, C.P., Hoerr, F.J., Bilgili, S.F. e Kincaid, S.A. (1999). Effects of dietary roxarsone supplementation, lighting program, and season on the incidence of leg abnormalities in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 78:197–203.
- Latimer, H.B. (1927). Postnatal growth of the chicken skeleton. *Studies from the Zoölogical and Anatomical Laboratories of the University of Nebraska*, 147.
- Le Bihan-Duval, E., Mignon-Grasteau, S., Millet, N. e Beaumont, C. (1998). Genetic analysis of a selection experiment on increased body weight and breast muscle weight as well as on limited abdominal fat weight. *Br. Poult. Sci.*, 39:346–353.
- Leach, R. M. e Nesheim, M. C. (1965). Nutritional, genetic and morphological studies of an abnormal cartilage formation in young chicks. *J. Nutr.*, 86:236–244.
- Leach, R. M. e Twal, W. O. (1994). Autocrine, paracrine and hormonal signals involved in growth plate chondrocyte differentiation. *Poultry Sci.*, 73:883–888
- Leclercq, B., Blum, J. C. e Boyer, J. P. (1980). Selecting broilers for low or high abdominal fat: initial observations. *Br. Poult. Sci.*, 21:107–113.
- Lee, S. R., Britton, W. M. e Rowland, G. N. (1980). Magnesium toxicity: bone lesions. *Poultry Sci.*, 59:2403–2411.
- Leshchinsky, T. V. e Klasing, K. C. (2001). Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Dev. Comp. Immunol.*, 25:629–638.
- Leterrier, C. e Nys, Y. (1992). Composition, cortical structure and mechanical properties of chicken tibiotarsi: Effect of growth rate. *Br. Poult. Sci.*, 33:925–939.
- Lindqvist, C., Zimmerman, P. e Jensen, P. (2006). A note on contrafreeloading in broilers compared to layer chicks. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 101:161–166.

- Howard, E. (2016). Avian Anatomy. *In*: Lovette, I. J. and Fitzpatrick, J.W. (Eds), *The Cornell lab of ornithology: Handbook of Bird Biology* (3^a Ed.). UK: John Wiley and sons, Lda
- Lufti, A.M. (1970). Study of cell multiplication in the cartilaginous upper end of the tibia of the domestic fowl by tritiated thymidine autoradiography. *Acta Anat.*, 776:454-463.
- Mahagna, M., e Nir, I. (1996). Comparative development of digestive organs, intestinal disaccharidases and some blood metabolites in broiler and layer-type chicks after hatching. *Br. Poult. Sci.*, 37:359–371.
- Maiorano, G., Elminowska-Wenda, G., Mika, A., Rutkowski, A. e Bednarczyk, M. (2009). Effects of selection for yolk cholesterol on growth and meat quality in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Ital. J. Anim. Sci.*, 8:457–466.
- Maiorano, G., Knaga, S., Witkowski, A., Cianciullo, D. e Bednarczyk, M. (2011). Cholesterol content and intramuscular collagen properties of pectoralis superficialis muscle of quail from different genetic groups. *Poult. Sci.*, 90:1620–1626.
- Masic, B., Wood-Gush, D.G.M., Duncan, I.J.H., McCorquodale, C. e Savory, C. J. (1974). A comparison of the feeding behaviour of young broiler and layer males. *Br. Poult. Sci.*, 5:499–505.
- Mayr, G. (2016). *Avian Evolution: The Fossil Record of Birds and its Paleobiological Significance*. UK: Wiley Blackwell
- McDevitt, R. M., McEntee, G. M. e Rance, K. A. (2006). Bone breaking strength and apparent metabolisability of calcium and phosphorus in selected and unselected broiler chicken genotypes. *Br. Poult. Sci.*, 47:613–621.
- McNamee, P.T., McCullagh, J.J., Thorp, B.H., Ball, H.J., Graham, D.G., McConagh, C.J. e Smith, J.A. (1998). Study on the weakness in two commercial broiler flocks. *Veterinary Record*, 143: 131-135.
- Muramatsu, T., Aoyagi, Y., Okumura, J. e Tasaki, I. (1987). Contribution of whole-body protein synthesis to basal metabolism in layer and broiler chickens. *Br. J. Nutr.*, 57:269–277.
- Nääs, I. A., Paz, I. C. L. A., Baracho, M. S., Menezes, A. G., Bueno, L. G. F., Almeida, I. C. L. e Moura, D. J. (2009). Impact of lameness on broiler well-being. *J. Appl. Poult. Res.*, 18(3):432–439.
- Naldo, J.L., Samour, J.H. e Bailey, T.A. (1998). Radiographic monitoring of the ossification of long bones in kori (*Ardeotis kori*) and white-bellied (*Eupodotis senegalensis*) bustards. *Research in Veterinary Science*, 65:161-163.
- Nangsuay, A., Molenaar, R., Meijerhof, R., van den Anker, I., Heetkamp, M. J.W., Kemp, B. e van den Brand, H. (2015). Differences in egg nutrient availability, development, and nutrient metabolism of broiler and layer embryos. *Poult. Sci.*, 94:415–442

Nir, I., Nitsan, Z. e Mahagna, M. (1993). Comparative growth and development of the digestive organs and of some enzymes in broiler and egg type chicks after hatching. *Br. Poult. Sci.*, 34:523–532.

Nowaczewski, S., Kontecka H., Elminowska-Wenda, G., Bednarczyk, M. e Kucharska, A. (2010). Eggs quality traits in Japanese quail divergently selected for yolk cholesterol level. *Arch. Geflugelk.*, 74:141–144.

Oshima, I., Iwamoto, H., Tabata, S., Ono, Y., Ishibashi, A., Shiba, N., Miyachi, H., Gotoh, T. e Nishimura, S. (2007). Comparative observations on the growth changes of the histochemical property and collagen architecture of the musculus pectoralis from Silky, layer-type and meat-type cockerels. *Anim. Sci., J.* 78:619–630

Ovalle, W. e Nahirney, P.C. (2014). *Netter Bases da Histologia*. (2ª Ed, pp 133-138 e 140-150). Brasil: Elsevier Editora Ltda.

Oviedo-Rondon, E. O., Small, J., Wineland, M. J., Christensen, V. L., Grimes, J. L., Funderburk, S. V. L. e Mann, K. M. (2008). Effects of incubator temperature and oxygen concentration during the plateau stage of oxygen consumption on turkey embryo long bone development. *Poult. Sci.*, 87:1484–1492.

Oviedo-Rondon, E. O., Small, J., Wineland, M. J., Christensen, V. L., Mozdziak, P. S, Koci, M. D., Funderburk, S. V. L., Ort, D. T. e Mann, K. M. (2008). Broiler embryo bone development is influenced by incubator temperature, oxygen concentration and eggshell conductance at the plateau stage in oxygen consumption. *Br. Poult. Sci.*, 49:666–676.

Palumbo, C., Ferretti, M. e Marotti, G. (2004). Osteocyte dendrogenesis in static and dynamic bone formation: An ultrastructural study. *Anat. Rec. A: Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, 278A:474–480.

Parmentier, H. K., de Vries Reilingh, G., Freke, P., Koopmanschap, R. E. e Lammers, A. (2010). Immunological and physiological differences between layer- and broiler chickens after concurrent intratracheal administration of lipopolysaccharide and human serum albumin. *Int. J. Poult., Sci.* 9:574–583.

Pearson, O. M. e Lieberman, D. E. (2004). The aging of Wolff's "law": Ontogeny and responses to mechanical loading in cortical bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 125:63–99.

Pines, M. (2007). *Poultry bone disorders*. In *Proceedings of the 19th Australian Poultry Science Symposium*, Sydney, New South Wales, Australia, 12-14 February 2007 2007 pp.110-121.

Pitsillides, A. A., Rawlinson, S. C. F., Mosley, J. R. e Lanyon, L. E. (1999). Bone's early responses to mechanical loading differ in distinct genetic strains of chick: Selection for enhanced growth reduces skeletal adaptability. *J. Bone Min. Res.*, 14:980–987.

PS/MJ/ART0206. 2003. Leg and Heart problems in broiler chickens.

- Reiter, K. e Kutritz, B. (2001). Behaviour and leg weakness in different broiler breeds. *Archiv fur Geflugelkunde*, 65: 137–141
- Rennie, J. S., Whitehead, C. C. e Thorp, B.H. (1993). The effect of dietary 1, 25-dehydroxycholecalciferol in preventing tibial dyschondroplasia in broilers fed on diets imbalanced in calcium and phosphorus. *Br. J. Nutr.*, 69:809–816.
- Reyer, H., Hawken, R., Murani, E., Ponsuksili, S. e Wimmers, K. (2015). The genetics of feed conversion efficiency traits in a commercial broiler line. *Sci. Rep.*, 5:16387
- Reznikov, N., Shahar, R., e Weiner, S. (2014). Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater.*, 10:3815–3826.
- Riddell, C. (1992). Non-infectious skeletal disorders of poultry: an overview (pp 119–145). In: *Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry*. Whitehead, C. C. (Ed) UK: Carfax Publishing Co.
- Rosinski, A. e Bednarczyk, M. (1997). Influence of genotype on goose egg hatchability. *Arch. Gefl" ugelk.*, 61:33–39.
- Samuelson, D.A. (2007). *Tratado de histologia veterinária*. (1ª Ed.). Brasil: Elsevier Editora Ltda.
- Sandercock, D. A., Nute, G. R. e Hocking, P. M. (2009). Quantifying the effects of genetic selection and genetic variation for body size, carcass composition, and meat quality in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Poult. Sci.*, 88:923–931.
- Saneyasu, T., Honda, K., Kamisoyama, H., Ikura, A., Nakayama, Y. e Hasegawa, S. (2011). Neuropeptide Y effect on food intake in broiler and layer chicks. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.*, 159:422–426.
- Saneyasu, T., Kimura, S., Inui, M., Yoshimoto, Y., Honda, K. e Kamisoyama, H. (2015). Differences in the expression of genes involved in skeletal muscle proteolysis between broiler and layer chicks during food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 186:36–42.
- Sanotra, G.S. (1999). *Registrering af aktuel benstyrke hos slagtekyllinger*. (Velfaerdsmoniteringsprojekt). Copenhaga, Dinamarca: Dyrenes Beskyttelse.
- Saunderson, C. L. e S. Leslie. (1988). Muscle growth and protein degradation during early development in chicks of fast and slow growing strains. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89:333–337.
- Sawicka, D., Samek, K., Chojnacka-Puchta, L., Witkowski, A., Knaga, S., Debowska, M., e Bednarczyk, M. (2015). Changes in quail blastodermal cell status as a result of selection. *Folia Biol. (Krakow)*, 63:63–67

Shim, M. Y., Karnuah, A. B., Mitchell, A. D, Anthony, N. B., Pesti, G. M., e Aggrey, S. E. (2012). The effects of growth rate on leg morphology and tibia breaking strength, mineral density, mineral content, and bone ash in broilers. *Poult. Sci.*, 91:1790–1795

Shim, M.Y., Karnuah, A.B., Anthony, N.B., Pesti, G.M. e Aggrey, S. E. (2012). The effects of broiler chicken growth rate on valgus, varus, and tibial dyschondroplasia. *Poultry Science*, 91(1):62-65.

Silver, I.A. (1970). The Ageing of Domestic Animals. In: *Science in Archaeology*. Brothwell, D. e Higgs, E. (Eds). NY, USA: Prager Publishers.

Starck J.M. e Ricklefs, R.E. (Eds) (1998). *Avian Growth and Development: Evolution Within the Altricial-precocial Spectrum*. UK: Oxford university press, Inc.

Starck, J.M. (1996). Comparative morphology and cytokinetics of skeletal growth in hatchlings of altricial and precocial birds. *Zool. Anz.*, 235:53-75.

Su, G., Sørensen, P. e Kestin, S.C. (2000). A note on the effects of perches and litter substrate on leg weakness in broiler chickens. *Poult Sci.*, 79(9):1259-63.

Sullivan, T. W. (1994). Skeletal problems in poultry: estimated annual cost and descriptions. *Poult. Sci.*, 73:879–882.

Talaty, P. N., Katanbaf, M. N. e Hester, P. Y. (2009). Variability in bone mineralization among purebred lines of meat-type chickens. *Poult. Sci.*, 88:1963–1974.

Tavaniello, S., Maiorano, G., Siwek, M., Knaga, S., Witkowski, A., Di Memmo, D., e Bednarczyk, M. (2014). Growth performance, meat quality traits, and genetic mapping of quantitative trait loci in 3 generations of Japanese quail populations (*Coturnix japonica*). *Poult. Sci.*, 93:2129–2140.

Thorp, B. H. (1994). Skeletal disorders in the fowl: A review. *Avian Pathol.*, 23:203–236.

Thorp, B.H., Farquharson, C., Kwan, A.P.L., e Loveridge, N. (1993). Osteochondrosis / dyschondroplasia: a failure of chondrocyte differentiation. *Equine Vet. J. Suppl.*, 16:13–18.

Thorp, B. H., Jakowlew, S. B. e Goddard, C. (1995). Avian dyschondroplasia: local deficiencies in growth factors are integral to the aetiopathogenesis. *Avian Pathol.*, 24:135–148.

Thorp, B.H., Whitehead, C.C. e Rennie, J. S. (1991). Avian tibial dyschondroplasia: a comparison of the incidence and severity as assessed by gross examination and histopathology, *Res. Vet. Sci.* 51:48–54.

Vaillancourt, J.P. e Martinez, A. (2002). Inflammatory process (IP) causes and control strategies. *Zootec. Int.*, 25:48-53.

Van Der Sluis, W. (2000). Clostridial enteritis is an often underestimated problem. *World Poult.*, 16:42–43.

Vander Pol, C.W., Molenaar, R., Buitink, C.J., vanRoover-Reijrink, I.A.M., Maatjens, C. M., van den Brand, H. e Kemp, B. (2015). Lighting schedule and dimming period in early life: Consequences for broiler chicken leg bone development. *Poult. Sci.*, 94:2980–2988

Vereijken, A.L.J. (1992). Genetics of body conformation and breast meat yield in broilers. Page 98–100 in: *Proceedings of the XIX World's Poultry Congress*. Vol. 3. 20–24 September, Amsterdam, The Netherlands.

Williams, B., Waddington, D., Murray, D.H. e Farquharson, C. (2004). Bone strength during growth: Influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. *Calcif. Tissue Int.*, 74:236–245.

Williams, B., Solomon, S., Waddington, D., Thorp, B. e Farquharson, C. (2000). Skeletal development in the meat-type chicken. *Br. Poult. Sci.*, 41:141–149.

Wolc, A., Bednarczyk, M., Lisowski, M. e Szwaczkowski, T. (2010). Genetic relationships among time of egg formation, clutch traits and traditional selection traits in laying hens. *J. Anim. Feed Sci.*, 648:127.

Yair, R., Cahaner, A., Uni, Z. e Shahar, R. (2017). Maternal and genetic effects on broiler bone properties during incubation period. *Poultry Science*, 96:2301–2311

Yu, M. W. e Robinson, F. E. (1992). The application of short-term feed restriction to broiler chicken production: A review. *J. Appl. Poult. Res.*, 1:147–153.

Zhao, R., Muehlbauer, E., Decuypere, E. e Grossmann, R. (2004). Effect of genotype–nutrition interaction on growth and somatotropic gene expression in the chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 136:2–11.

Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X. J. e Zhu, D. (2009). Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens. *BMC Genomics*, 10:87.

Zhong, Z., Muckley, M., Agcaoglu, S., Grisham, M.E., Zhao, H., Orth, M., e Karcher, D.M. (2012). The morphological, material level, and ash properties of turkey femurs from 3 different genetic strains during production. *Poult. Sci.*, 91:2736–2746.

Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R. e Robinson, F. E. (2014). Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poult. Sci.*, 93:2970–2982.

Publicações electrónicas:

August, K.S. (2014). Isa Browns: A Comprehensive Guide. Acedido em 24/04/2018 em <https://www.backyardchickencoops.com.au/isa-browns-a-comprehensive-guide>

COBB500™. Broiler Performance & Nutrition Supplement. Acedido em 24/04/2018 em <https://cobbstorage.blob.core.windows.net/guides/a71b8bc0-bbd4-11e6-bd5d-55bb08833e29.pdf>.

COBB500™. Cobb 500 Sales Brochure: “Cobb 500 The world’s most efficient”. Acedido em 24/04/2018 em http://cobbsa.co.za/wp-content/uploads/2017/05/Cobb500_Sales_Brochure_2008.pdf ~

Comissão europeia (1999). Diretiva 1999/74/CE — normas mínimas relativas à proteção das galinhas poedeiras. Acedido em 24/04/2018 em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=LEGISSUM%3AI12067>

Comissão europeia (2006). Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho sobre um Plano de Acção Comunitário relativo à Protecção e ao Bem-Estar dos Animais 2006-2010. Bruxelas, 23 de Janeiro. Acedido em 24/04/2018 em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=CELEX:52006DC0013>

Comissão Europeia (2007). Directiva do Conselho 2007/43/EC de 28 de Julho de 2007, relativa ao estabelecimento de regras mínimas para a protecção dos frangos de carne. Jornal Oficial da União europeia (ISSN 1725-2601, L 182). Acedido em 24/04/2018 em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=OJ:L:2007:182:TOC>

European Commission (2002). Communication from the commission to the council and the European parliament on animal welfare Legislation on farmed animals in Third Countries and the Implications for the EU. Acedido em 24/04/2018 em <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f059a665-a9f6-48e1-8b73-9608b9dbbf6c/language-en>.

European Commission (2005). Special Eurobarometer. Attitudes of consumers towards the welfare of farmed animals. Acedido em 24/04/2018 em https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/.../aw_arch_euro_barometer25_en.pdf

European Food Safety Authority (2005). Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) on a request from the Commission related to the welfare aspects of various systems of keeping laying hen. EFSA Journal. Acedido em 24/04/2018 em <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/197>

ISA, Isa Brown. Acedido em 24/04/2018 em <https://www.isa-poultry.com/en/product/isa-brown/> acedido em 24/04/2018.

The poultry site (2008). How the Cobb 500 Changed the US Market. Acedido em 24/04/2018 em

<http://www.thepoultrysite.com/articles/1200/how-the-cobb-500-changed-the-us-market/>

The poultry site. Cobb 500. Acedido em 24/04/2018 em
<http://www.thepoultrysite.com/focus/cobb/59/cobb-500-the-worlds-most-efficient>

Figuras:

Breugelmans, S., Muylle, S., Cornillie, P., Saunders, J. e Simoens, P. (2007). Age determination of poultry: a challenge for customs. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, 76:423-430

Eroschenko, V. P. (2008). *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations.* (11^a Ed.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Favero, S. L., Vieira, C. R., Angel, A., Bos-Mikich, N., Lothhammer, D., Taschetto, R. F., Cruz, A. e Ward, T. L. (2013). Development of bone in chick embryos from Cobb 500 breeder hens fed diets supplemented with zinc, manganese, and copper from inorganic and amino acid-complexed sources. *Poultry Science*, 92(2):402–411

Life as a medical student (2008). Histology. Acedido em 11/04/2018
<http://lifeasamedicalstudent.blogspot.com/2008/10/histology.html>

Lovette, I. J. e Fitzpatrick, J.W. (Eds) (2016). *The cornell lab of ornithology: Handbook of Bird Biology* (3^a Ed.). UK: John Wiley and sons, Lda

OpenStax, Anatomy & Physiology (2017). OpenStax CNX. Acedido em 11/04/2018 em <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.81>.

Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R. e Robinson, F. E. (2014). Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poult. Sci.*, 93:2970–2982

ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo LACH - Processamento histológico de rotina e corte para microscopia

As amostras provenientes de biópsia cirúrgica ou de necrópsia são acondicionadas em frascos de vidro ou de plástico, de boca larga e com tampa estanque, devidamente identificadas com os dados do animal, proprietário e data de colheita

- Após um mínimo de 24 horas de fixação em formol, as amostras são examinadas e cortadas para processamento histológico na hote
- Cada amostra é colocada numa cassete de processamento histológico, identificada (a lápis) com o número da análise a que corresponde a amostra
- As amostras são colocadas no cesto do processador de tecidos e processadas de acordo com o seguinte protocolo:

a. Álcool 70%	30 minutos
b. Álcool 70%	1:20 horas
c. Álcool 96%	30 minutos
d. Álcool 96%	1:20 horas
e. Álcool 100%	30 minutos
f. Álcool 100%	1:20 horas
g. Álcool 100%	2 horas
h. Clear Rite*	30 minutos
i. Clear Rite*	1:30 horas
j. Clear Rite*	2 horas
k. Parafina	1:30 horas
l. Parafina	2 horas

* ou outro substituto de xilol apropriado. Este processador não contém xilol

Uma vez que o processador não contém banhos de formol, é importante assegurar que a amostra está completamente fixada antes de ser posta a processar

O processador é posto a (ou programado para) funcionar **apenas durante a noite** e a extracção da hotte ligada enquanto o processador estiver a funcionar

O processador só deve ser mudado com o laboratório vazio e o operador presente deve usar protecção pessoal (luvas, máscara e óculos de protecção)



- Depois de retiradas do processador, as amostras são transferidas para o aparelho de inclusão (62°C) e incluídas em parafina
- Os moldes são colocados na placa fria (-10°C) e deixados a arrefecer para depois remover os blocos
- Aparado o excesso de parafina dos blocos, cada bloco é “desbastado” no micrótomo rotativo (remoção do excesso de parafina na face de corte do bloco)

- Os blocos desbastados são arrefecidos na placa fria e depois cortados (cortes de 3 µm) no micrótomo rotativo
- Os cortes são colocados em água fria para escolha do melhor corte e alinhamento na lâmina
- Os cortes são transferidos para água quente no banho-maria (40-50°C) para extensão
- Após identificação da lâmina com o número da análise e do bloco, as lâminas são secas em estufa a 60°C (1 hora) ou 37°C (overnight)

Anexo 2 – Protocolo LACH - Coloração de rotina – Hematoxilina-Eosina

- Após incubação das lâminas em estufa a 60° C (1 hora) ou 37° C (overnight), proceder à desparafinização das lâminas em xilol, e reidratação em concentrações decrescentes de etanol da seguinte forma:

- a. Xilol _____ 15 minutos
- b. Xilol _____ 5 minutos
- c. Álcool 100% _____ 5 minutos
- d. Álcool 95% _____ 3 minutos
- e. Álcool 75% _____ 1 minuto

- Lavar em água destilada durante 5 minutos.
- Corar com Hematoxilina de Gill2 durante 30 segundos
- Lavar e diferenciar em água morna corrente durante aproximadamente 2 minutos
- Imergir as lâminas em álcool a 70% durante 1 minuto
- Corar com Eosina durante 1 minuto
- Diferenciar em álcool a 95% durante 3 minutos
- Desidratar em concentrações crescentes de etanol e xilol da seguinte forma:

- a. Álcool 100% _____ 5 minutos
- b. Xilol _____ 5 minutos
- c. Xilol _____ 20 minutos

- Deixar secar completamente as lâminas à temperatura ambiente e montar em entellan.

Anexo 3 – Gráficos de resultados

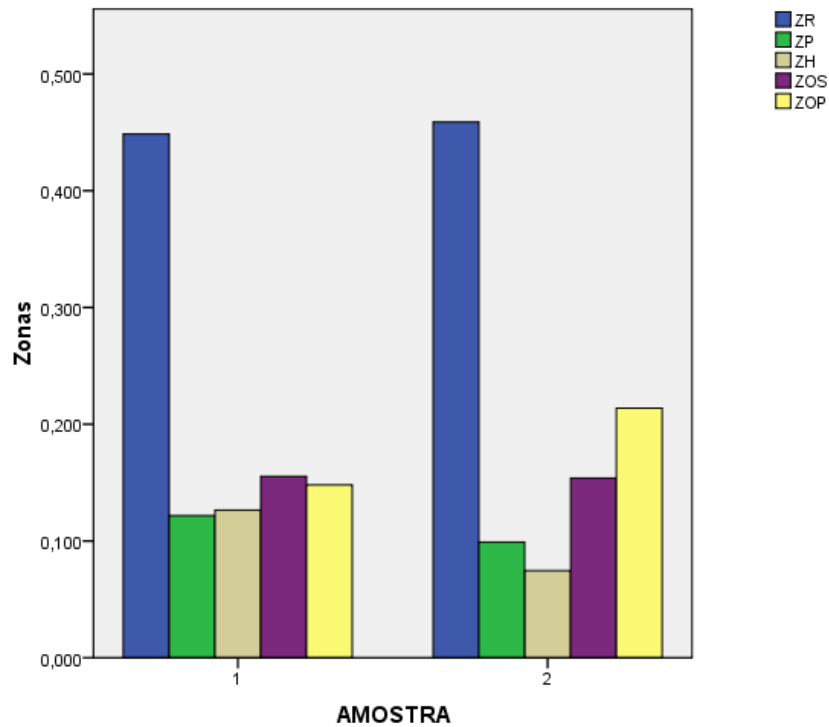


Gráfico 1 - Comparação da média das fracções que cada zona ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2). Legenda: ZR – zona de cartilagem de reserva, ZP- zona cartilagem em proliferação, ZH – zona de cartilagem hipertrófica, ZOS

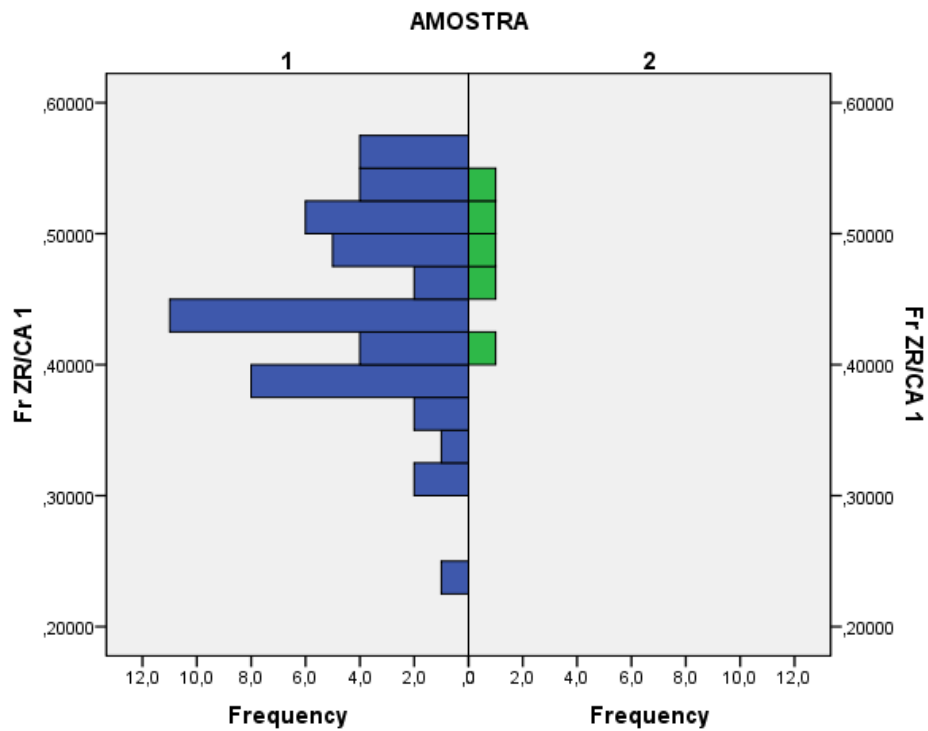


Gráfico 2 - Comparação das fracções que a zona de reserva esquerda ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

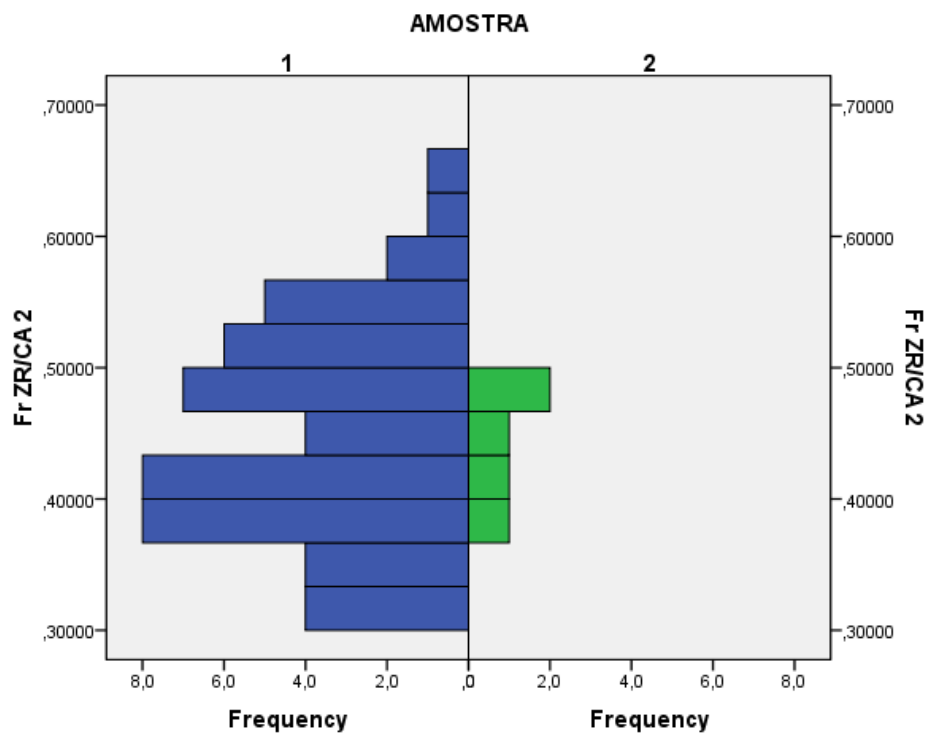


Gráfico 3 - Comparação das fracções que a zona de reserva direita ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

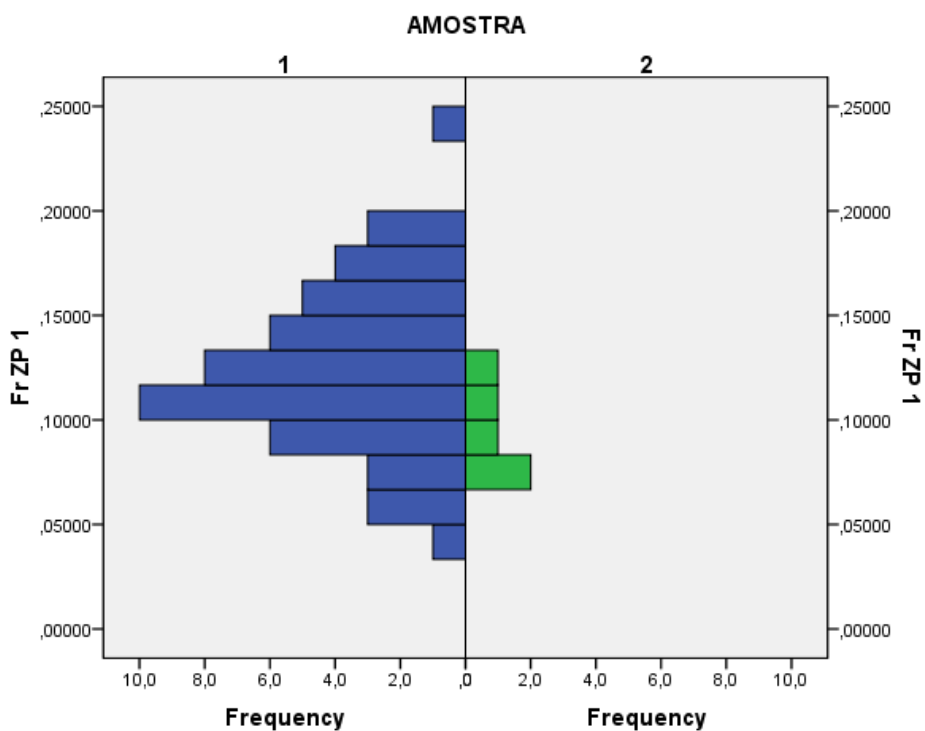


Gráfico 4 - Comparação das fracções que a zona de proliferação esquerda ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

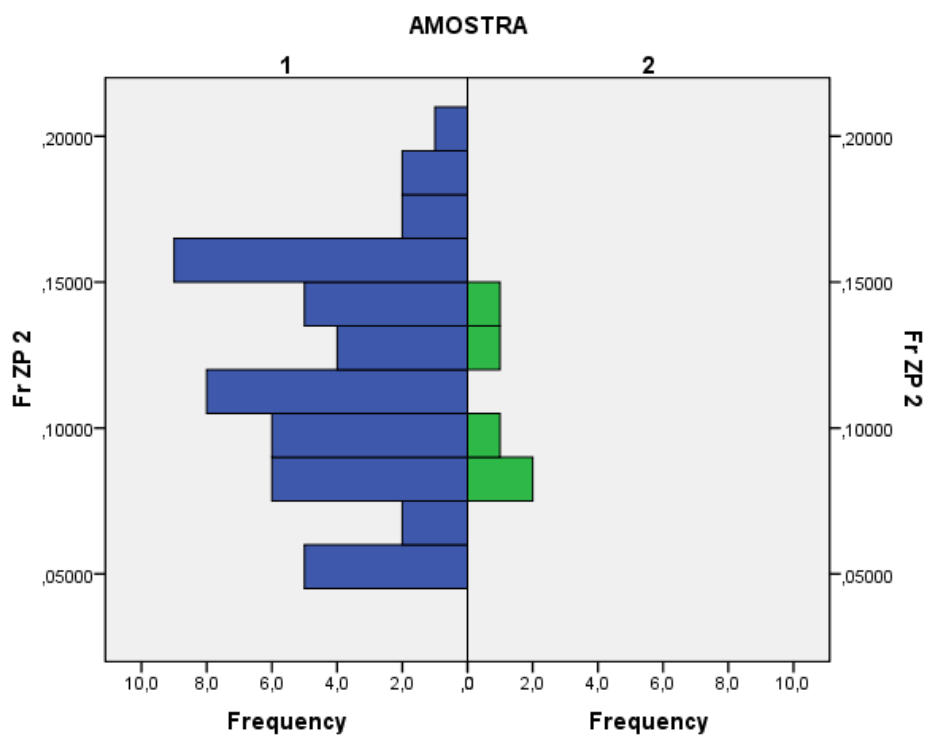


Gráfico 5 - Comparação das fracções que a zona de proliferação direita ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

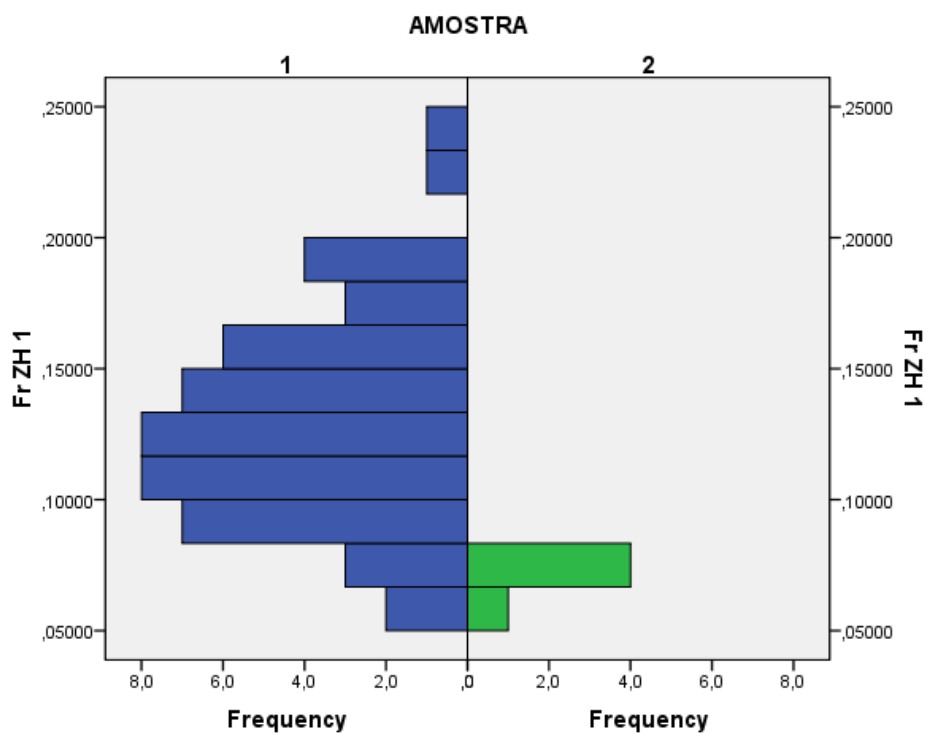


Gráfico 6 - Comparação das fracções que a zona hipertrófica esquerda ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

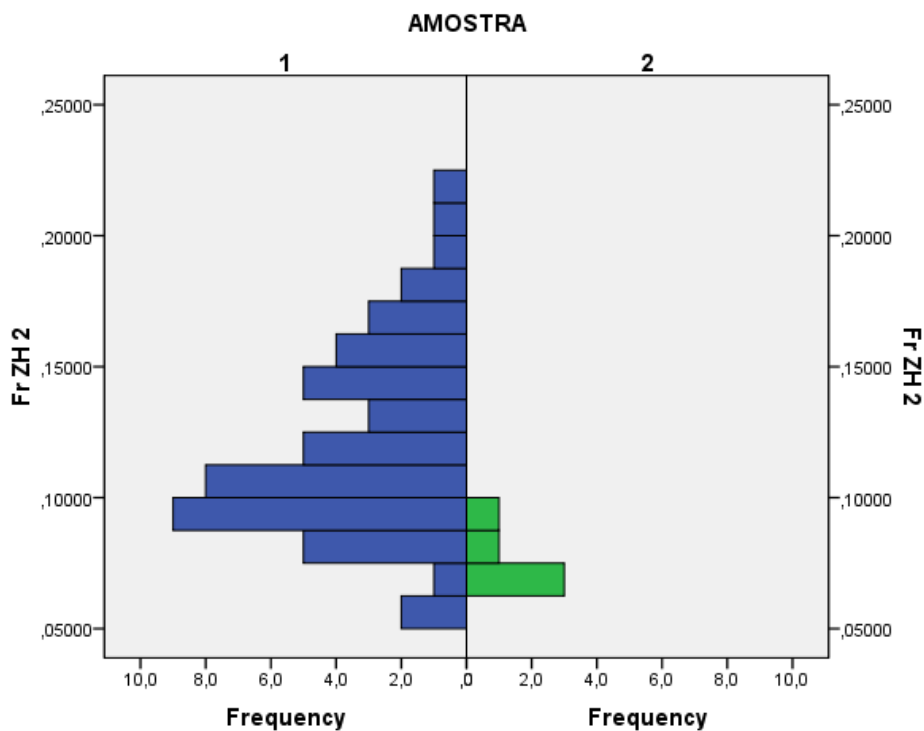


Gráfico 7 - Comparação das frações que a zona hipertrófica direita ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

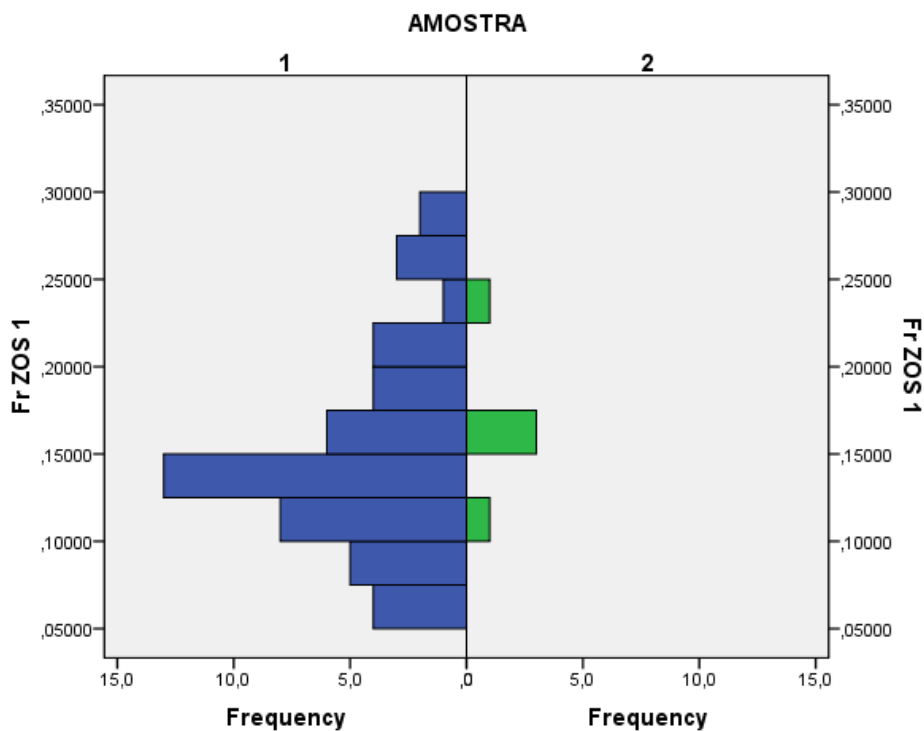


Gráfico 8 - Comparação das frações que a zona de ossificação superficial esquerda ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

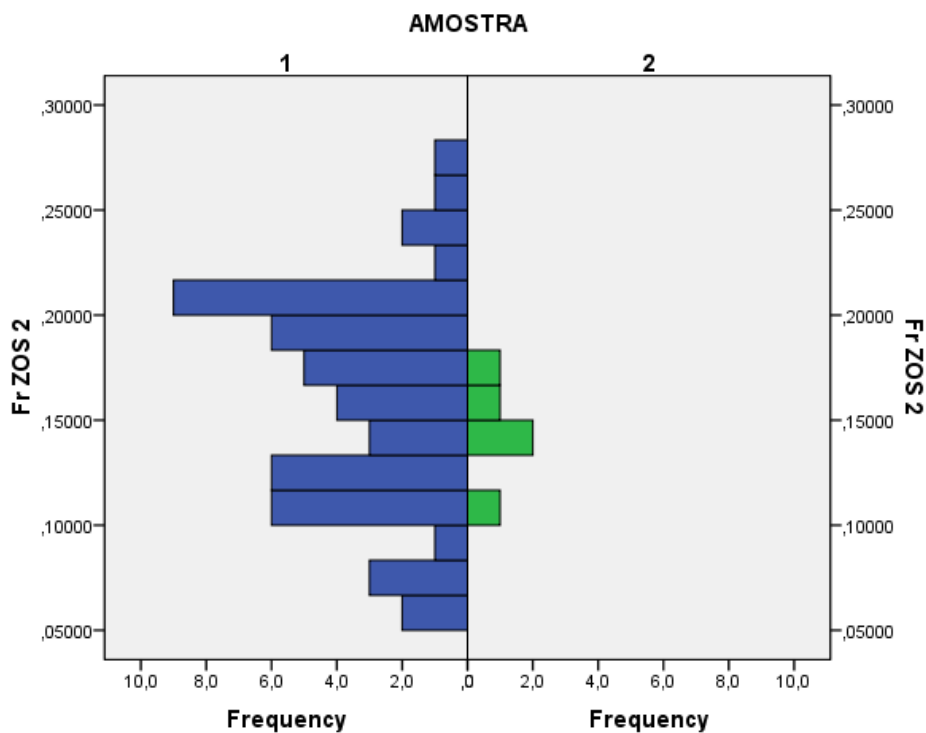


Gráfico 9 - Comparação das fracções que a zona de ossificação superficial direita ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

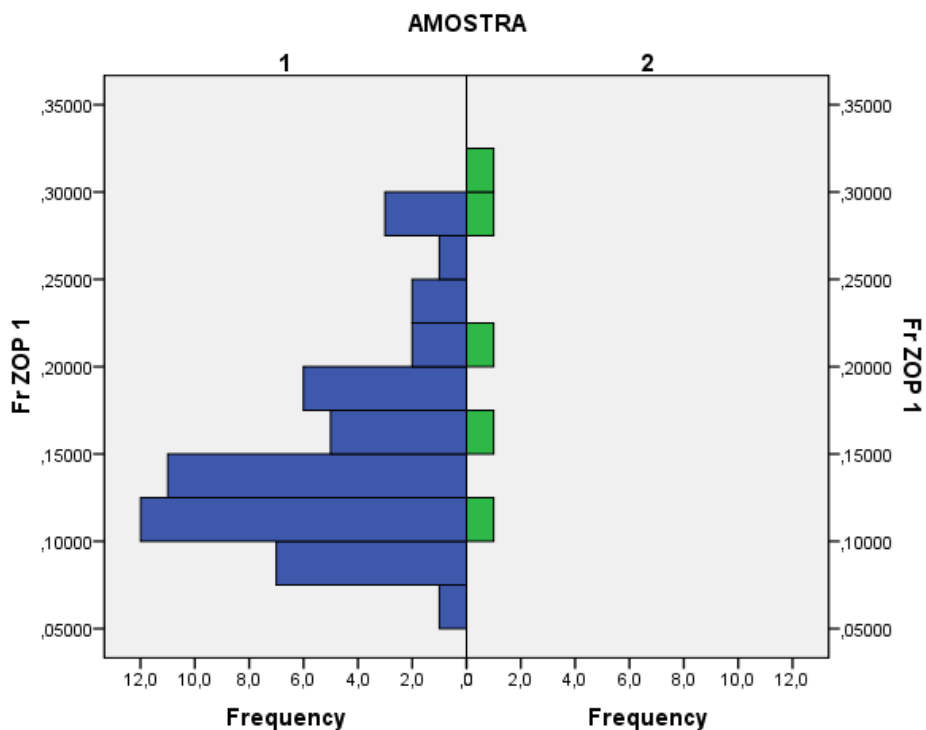


Gráfico 10 - Comparação das fracções que a zona de ossificação profunda esquerda ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)

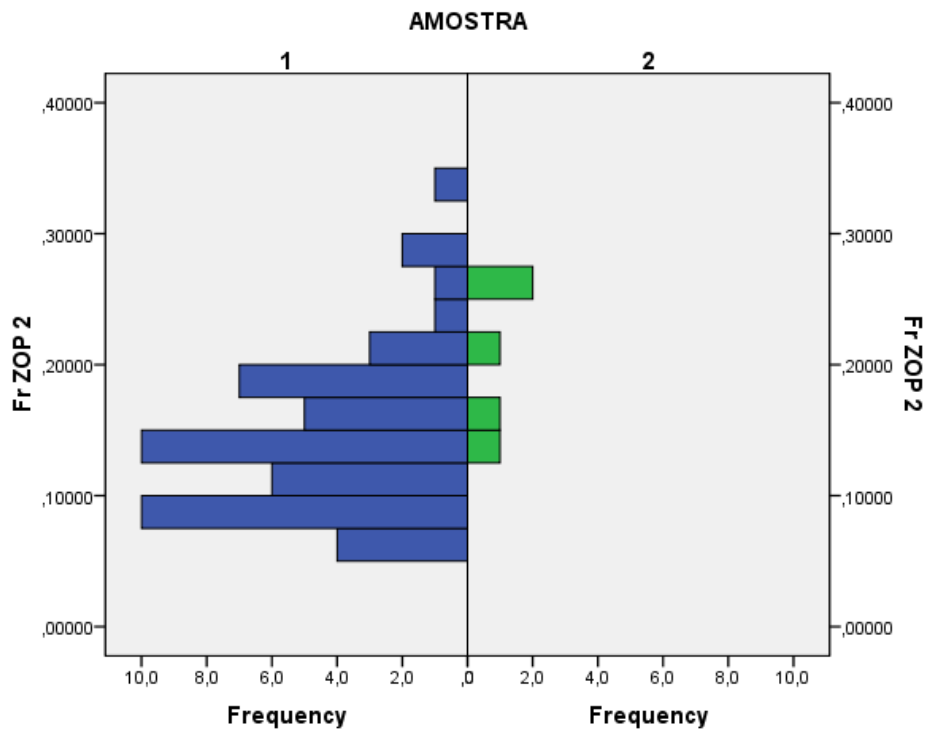


Gráfico 11 - Comparação das fracções que a zona de ossificação profunda direita ocupa no total da área de ossificação, entre as galinhas de aptidão carne (1) e o grupo controlo (2)