

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Histomorfometria óssea de frangos de corte acometidos com a Síndrome do  
“Black Bone”**

**Elaborado por: Camila Figueiredo Carneiro Monteiro**

**Orientador: Profa. Dra. Liris Kindlein**

**Coorientador: Tamara Zinn Ferreira**

**PORTO ALEGRE**

**2013/2**

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Liris Kindlein, pela paciência e dedicação de seu tempo à mim e ao meu trabalho. Mesmo com a distância, se mostrou extremamente disponível e sempre disposta a me ajudar, buscando meu crescimento individual e profissional.

À minha coorientadora Tamara Zinn Ferreira por aguentar minhas “crises emocionais” durante o meu trabalho e por sempre tentar me ajudar a resolver meus problemas (tanto os já existentes, quanto aqueles criados por mim mesma). Mostrou-se uma pessoa que aprendi a gostar muito, sensível e dedicada.

Aos meus colegas de estágio do CEPETEC, pelo constante apoio, em especial à Laura e Ana Carina, que me ajudaram muito em algumas etapas do trabalho.

Não poderia deixar de agradecer ao pessoal do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde realizei grande parte do meu trabalho, que foi sempre muito solícito e paciente.

À minha mãe, meu namorado, família e amigos, por terem suportado minha ausência sem mágoas e por terem escutado minhas dificuldades durante o trabalho, mesmo não entendendo sobre o assunto.

Obrigada a todos que compartilham comigo esse momento e que fazem parte da minha caminhada.

## Resumo

O consumo de carne de frango vem crescendo nas últimas décadas, sendo necessário uma elevada produção animal para atender à demanda. A criação de frangos de corte visando maior rentabilidade busca animais selecionados geneticamente para maior taxa de crescimento, o que vem provocando patologias estruturais nas aves, como por exemplo, a Síndrome do Black Bone (BBS). A BBS caracteriza-se pelo escurecimento do osso e da carne adjacente, decorrente de um extravazamento de sangue proveniente da medula óssea devido à um aumento de porosidade do osso, ocorrendo principalmente na coxa e sobrecoxa das aves, causando aversão do consumidor. O presente trabalho avaliou a eficiência da suplementação da dieta de frangos de corte com vitamina D (HyD) como forma de prevenção da Síndrome, através de análise histomorfométrica. Foram coletadas tíbias de 24 frangos de corte Cobb 500, divididos em grupo controle (sem suplementação) e grupo tratado (com suplementação de vitamina D<sub>3</sub>). Os ossos foram pesados e submetidos à avaliação de luminosidade (\*L) e tom de vermelho (a\*), analisados macroscopicamente para avaliação da ocorrência da Síndrome do Black Bone, antes e após o cozimento. Foi realizada a análise histológica das tíbias, mensurando-se espessura de osso compacto e realizando-se a contagem de osteoclastos. Os valores obtidos foram avaliados pela análise de variância de acordo com o pacote computacional SAS (2001) e a comparação entre as médias efetuadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. O grupo suplementado com vitamina D apresentou menor incidência de grau severo da síndrome (36,4%) quando comparado ao grupo controle (65%). As tíbias cozidas apresentaram o mesmo peso em ambos os tratamentos, 21±2,5 g, peso estatisticamente menor (p<0,05) daquele apresentado nas tíbias cruas. A luminosidade apresentou-se maior (p<0,05) nas tíbias cruas (35,24±13,86 no grupo controle e 35,94±10,16 no grupo suplementado) em relação às cozidas (33±5,36 no grupo controle e 28,3±6,89 no grupo suplementado). Em contraposto o tom de vermelho apresentou resultados menores nas tíbias cruas em relação às cozidas, resultados que sugerem o escurecimento do osso após o cozimento. A administração da vitamina D em sua forma ativa (HyD) não influenciou na espessura do osso compacto, mas influenciou positivamente o crescimento do comprimento das tíbias. A contagem de osteoclastos foi maior (p<0,05) nos animais que receberam suplementação (77±1,26) em relação ao grupo controle (59±1,67). Os resultados indicam que a suplementação de vitamina D<sub>3</sub> ativa tem função de proteção do esqueleto, promovendo maior quantidade ou atividade dos osteoblastos.

## Abstract

The consumption of poultry meat has increased in recent decades and a high animal production is needed to meet the demand. Rearing broilers searching greater profitability requires animals genetically selected for increased growth rate, activity that has caused structural pathologies in birds, such as Black Bone Syndrome (BBS). The BBS is characterized by blackening of the adjacent bone and meat caused by a blood extravasation from the bone marrow due to increased bone porosity, occurring mainly in the thigh and drumstick of birds, causing consumer aversion. This study evaluated the effectiveness of supplementing the diet of broiler chickens with vitamin D (HyD) in order to prevent the syndrome throughout a histomorphometric analysis. Tibias of 24 Cobb 500 broilers were divided into control group (no supplementation) and treated group (vitamin D<sub>3</sub> supplementation) were collected. The bones were weighed, examined for lightness (L\*) and redness (a\*) and macroscopically analyzed for assessing the occurrence of Black Bone Syndrome before and after cooking. Histological analysis was performed on the tibias, measuring thickness of compact bone and performing the counting of osteoclasts. Data were analyzed by variance analysis according to using SAS (2001) and the means were compared by Tukey test at 5% significance level. The group supplemented with vitamin D showed a lower incidence of severe syndrome (36.4%) when compared to the control group (65%). After cooking process, tibias showed the same weight in both of the treatments, 21±2.5 g, weight statistically lower (p <0.05) from that found in raw tibias. The luminosity was higher (p <0.05) in raw bones (35.24±13.86 in the control group and 35.94±10.16 in the supplemented group) compared to cooked (33 ± 5.36 in control group and 28.3±6.89 in the treated group). In the opposite, redness had the lowest results in the raw tibias in relation to the cooked tibias, results that suggest the darkening of the bone after cooking. The administration of vitamin D through its active form (HyD) did not affect the thickness of the compact bone, but positively influenced the growth of tibia length. The counting of osteoclasts was higher (p <0.05) in the animals receiving supplementation (77±1.26) compared to control group (59±1.67). The results indicate that supplementation of vitamin D<sub>3</sub> has active protection function of the skeleton, resulting in greater osteoblasts quantity or activity.

## Sumário

<b>1</b>	<b>Avicultura</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Tecido Ósseo</b> .....	<b>2</b>
2.1	Tipos de tecido ósseo .....	4
2.2	Histogênese .....	6
<b>3</b>	<b>Cálcio e fósforo</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Má formação óssea</b> .....	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Síndrome do Black Bone</b> .....	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Metodologia</b> .....	<b>12</b>
<b>8</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>17</b>
8.1	Considerações finais .....	26
<b>9</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>

## 1. Avicultura

A avicultura sempre esteve presente na história do Brasil em forma de agricultura familiar, onde carne e ovos eram produzidos para consumo próprio. A partir do século XX, os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro iniciaram um projeto de melhoria das condições da atividade baseado nas inovações introduzidas na Inglaterra e Estados Unidos. A integração foi amplamente utilizada e consolidada em todo o país, impulsionada pela oferta de crédito a investimentos a longo prazo.

No início da década de 80, houve uma retração no mercado avícola devido à alta competitividade nas exportações devido aos subsídios americanos e ingleses e à recessão econômica. No final da década, a avicultura volta a crescer e, no início de 1990, com a abertura da economia e estabilização da inflação, evidenciou-se uma nova era tecnológica e de competitividade, quando foram lançados métodos para agregar valor ao produto, como a criação dos cortes industriais (EMBRAPA, 2010).

O consumo mundial de carne de frango vem mostrando crescimento nas últimas décadas, sendo a segunda carne mais consumida no mundo nos dias atuais, precedida pela carne suína. O Brasil é o terceiro maior consumidor de carne de frango do mundo, atingindo 45 kg *per capita* em 2012 (BRASIL, 2013). Desde 2011, o Brasil encontra-se em terceiro lugar no ranking mundial de produção de carne de frango, antecedido por Estados Unidos e China, ano em que atingiu 13,058 milhões de toneladas. Segundo os dados do IBGE (2012), estima-se que essa produção ainda aumente consideravelmente nos próximos 10 anos, e consequentemente o consumo *per capita*. Desde 2004, o Brasil lidera o ranking mundial de exportação, atingindo 3,9 milhões de toneladas, para mais de 150 países, no ano de 2011 (BRASIL, 2011). De acordo com a União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2012), o setor emprega mais de 3,6 milhões de pessoas no Brasil e contribui com quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do país.

Os consumidores tornaram-se cada vez mais exigentes na tomada de decisão valorizando os fatores sensoriais dos alimentos, como textura e maciez, o que exige que o mercado priorize altos padrões de qualidade da carne. Praticidade, segurança alimentar, qualidade nutricional, aparência geral e preços acessíveis são essenciais na escolha do produto (Alves *et al.*, 2012).

Para abastecer a demanda e aumentar a rentabilidade, o setor avícola investiu na seleção de linhagens genéticas que apresentassem maior taxa de crescimento. Porém, acredita-se que tal prática tenha favorecido o surgimento de patologias estruturais nas aves, principalmente dos tecidos ósseo e muscular. O elevado crescimento muscular muitas vezes é acompanhado por uma baixa maturidade do esqueleto, aumentando a incidência de fragilidade e deformação óssea. Segundo Vázquez e Soto-Solanova (2009), trabalhando com frangos de corte, aves jovens são mais suscetíveis, provavelmente pela baixa mineralização óssea, assim como machos, pois esses apresentam uma maior porosidade óssea em relação às fêmeas.

Patologias esqueléticas, frequentemente associadas à fraqueza óssea, acentuam a mortalidade na granja e a condenação de carcaças na planta de processamento, levantando questões econômicas e de bem-estar animal (Rath *et al.*, 2000).

## **1. Tecido Ósseo**

O osso consiste em células vivas e matriz intracelular impregnada em sais minerais e constitui-se aproximadamente 70% de minerais, 20% de matéria orgânica e 10% de água. O osso é um tecido dinâmico influenciado por fatores fisiológicos, nutricionais e físicos, como atividades físicas e mecânicas (Rath *et al.*, 2000).

As superfícies externa e interna dos ossos são envolvidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, formando o perióstio e o endóstio, respectivamente. O perióstio é formado externamente por tecido conjuntivo denso, muito fibroso e internamente é mais rico em células e vasos sanguíneos. As células da camada externa do osso transformam-se facilmente em osteoblastos e têm papel essencial no crescimento ósseo e na reparação de fraturas. O endóstio é constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas, revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkman (Pizauro Júnior, 2002).

O osso é um tecido de suporte vascularizado, que é depositado por osteoblastos e osteócitos e removido e remodelado por osteoclastos e osteócitos (Villem *et al.*, 1989).

### **Osteócitos**

Os osteócitos são células achatadas que se encontram no interior da matriz óssea e são essenciais para a manutenção desta. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz (Junqueira e Carneiro, 2004). Segundo Liu (2000), a função dos osteócitos ainda é desconhecida,

estudos sugerem que eles devem transmitir sinais aos osteoblastos ao longo das superfícies dos ossos medular e cortical durante a formação do osso (Cowin *et al.*, 1991).

O osteócito é o tipo de célula mais abundante do osso, sendo esse número dez vezes maior que o número de osteoclastos e uma pequena porção do número de osteoblastos (Pizauro Júnior, 2002).

## **Osteoblastos**

Os osteoblastos são as células que formam o tecido ósseo, são responsáveis por sintetizar e secretar a matriz orgânica, além de sintetizar uma série de proteínas. Os osteoblastos também são responsáveis pela produção de fatores regulatórios, que estimulam a formação e a reabsorção óssea, como citocinas e fatores de crescimento (Garcia Faitarone *et al.*, 2012).

As células osteoprogenitoras são precursoras dos osteoblastos e dos osteócitos e são fundamentais para o crescimento e reparo ósseo. Localizam-se nas proximidades da superfície do tecido ósseo e, quando estimuladas, dividem-se e diferenciam-se em osteoclastos (Pizauro Júnior, 2002).

## **Osteoclastos**

Os osteoclastos são as células responsáveis pela desmineralização óssea e digestão da matriz óssea. Durante o processo de crescimento do osso, essas células são necessárias para a reabsorção da cartilagem calcificada e para a modelação óssea (Garcia Faitarone *et al.*, 2012.). São células multinucleadas e eosinofílicas, derivadas de precursores hematopoiéticos de monócitos/macrófagos (Moreki, 2005). Segundo Pizauro Júnior (2002), essas células reabsorvem o osso em resposta a fatores liberados pelos osteoblastos e alguns componentes da matriz extracelular que podem atrair e/ou ativar osteoclastos.

A reabsorção óssea consiste na retirada de tecido ósseo mineralizado e é necessária para aumentar o tamanho dos espaços internos dos ossos. Além disso, o processo de reabsorção fornece um estoque de cálcio metabolicamente ativo (Moreki, 2005).

Além de serem responsáveis pela reabsorção do osso maduro e totalmente mineralizado, os osteoclastos foram encontrados reabsorvendo ossos recém-formados, na camada esponjosa primária e secundária abaixo da placa epifisária em um animal em



crescimento. A absorção osteoclástica contribui para o remodelamento em resposta ao crescimento ou mudanças mecânicas no esqueleto (Moreki, 2005).

No processo de reabsorção óssea, ocorre primeiramente a diferenciação de osteoclastos, sob influência da 1,25-(OH) D<sub>3</sub>, solubilizando o mineral e degradando a matriz do colágeno. Após a ação dos osteoclastos, a cavidade é invadida por células mononucleares, precursoras dos osteoblastos, iniciando a formação de um novo osso (Pizauro Júnior, 2002).

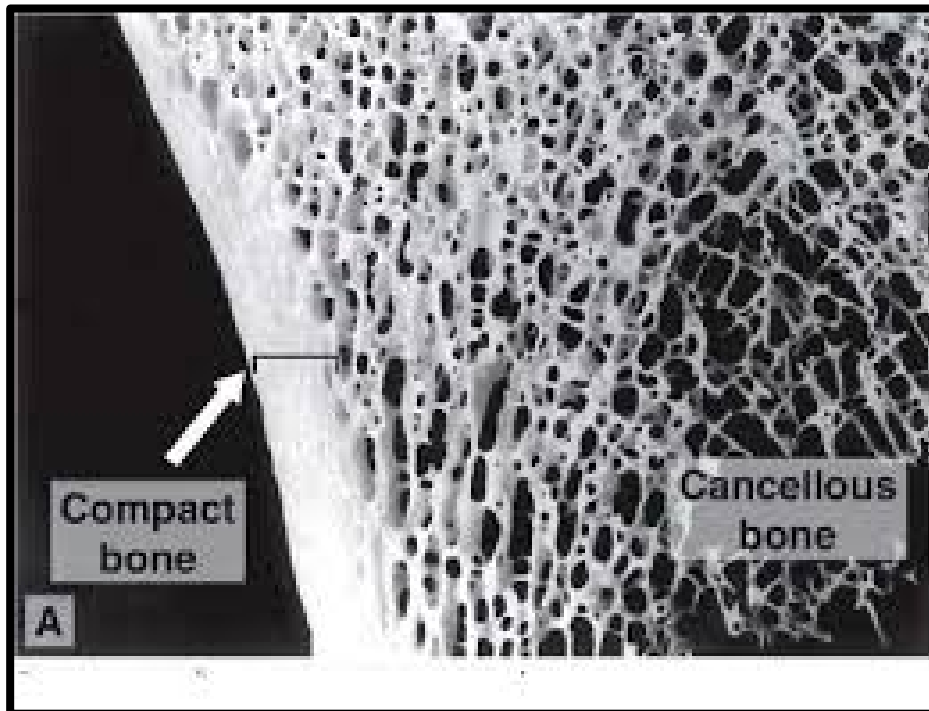
Os osteoclastos também participam da manutenção da homeostase do cálcio a longo prazo, através da resposta ao paratormônio (PTH) e à calcitonina. O paratormônio estimula a reabsorção e a liberação de íons cálcio do osso, enquanto a calcitonina inibe a atividade dos osteoclastos, realizando o feedback negativo e limitando esta liberação de íons (Moreki, 2005). Desta forma, a calcitonina é secretada quando o cálcio sérico encontra-se em taxas elevadas, propiciando à deposição de cálcio e fósforo no tecido ósseo, a fim de reduzir a concentração plasmática dos íons. O PTH tem efeito inverso, sendo ativado por baixos níveis de cálcio no sangue, causando reabsorção do cálcio do osso, a fim de elevar essa concentração sérica (Pizauro Júnior, 2002).

## **2.1 Tipos de tecido ósseo**

A superfície de um osso serrado, quando observado a olho nu, é formada por partes sem cavidades visíveis, o osso compacto, e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso (Figura 1). Histologicamente, os tabiques que separam as cavidades do osso esponjoso e do compacto tem a mesma estrutura histológica básica (Junqueira e Carneiro, 2004).

O osso compacto, também chamado de osso cortical, é a camada mais externa e o tipo de osso predominante na diáfise de ossos longos. O osso esponjoso é a rede interna do osso que predomina nas vértebras e nas metáfises dos ossos longos (Liu, 2000), suas cavidades contém medula óssea ou tecido adiposo (Pizauro Júnior, 2002).

Figura 1 - Corte de osso seco, evidenciando o osso compacto (compact) e esponjoso (cancellous).



Fonte: Junqueira e Carneiro, [2004].

A medula óssea tem coloração vermelha em recém nascidos, devido ao elevado teor de hemácias, já que é muito ativa no início da vida. Com o avançar da idade, a medula vai sendo infiltrada por tecido adiposo, diminuindo a atividade hematológica, sendo chamada de medula óssea amarela (Junqueira e Carneiro, 2004).

O osso compacto contém os canais de Havers, pelos quais passam vasos sanguíneos no sentido longitudinal; e os canais de Volkmann, orientados no sentido horizontal, contendo ramificações vasculares (Aveiro, 2005).

O osso compacto denso e a malha trabecular do osso esponjoso são tecidos capazes de resistir à tração, compressão e forças cortantes, normalmente ao mesmo tempo (Junqueira de Mattos, 2002).

Segundo Pizauro Júnior (2002), a diferença entre o osso esponjoso e o cortical deve-se, além de suas propriedades estruturais, às suas propriedades funcionais; pois o primeiro possui função metabólica, enquanto o segundo têm função mecânica e de proteção.

O osso medular, exclusividade de aves e crocodilianos, está localizado nas superfícies do osso estrutural e em espículas nas cavidades medulares, especialmente nos ossos das

pernas. O desenvolvimento do osso medular na fêmea durante o ciclo reprodutivo é único da classe das aves. O depósito de osso medular permite que o animal armazene uma quantidade considerável de cálcio prontamente disponível sem o envolvimento do esqueleto estrutural, servindo como suplementação para a formação da casca do ovo (Moreki, 2005).

## 2.2 Histogênese

O tecido ósseo é formado por dois processos, a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa ocorre no interior de uma membrana de tecido conjuntivo, formado por células mesenquimatosas, que aos poucos vai sendo substituída por osteoblastos, que sintetizam o osteóide (matriz ainda não mineralizada), e após se mineraliza. Este é o processo formador dos ossos frontal, parietal, de partes do occipital, temporal e dos maxilares superior e inferior. Adicionalmente, o crescimento de ossos curtos e o aumento em espessura dos ossos longos também ocorrem através deste processo (Junqueira e Carneiro, 2004).

A ossificação endocondral inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que é gradualmente destruído e substituído por tecido ósseo. A cartilagem não é substituída completamente até que o crescimento ósseo finalize. Esse processo é responsável pelo desenvolvimento em comprimento e aumento do esqueleto durante o crescimento, formando a maioria dos ossos do esqueleto e da base do crânio (Pizauro Júnior, 2002).

Os ossos crescem em comprimento a partir de discos planos de cartilagem, chamados de placas de crescimento. Nestas existem células – os osteoblastos - que sintetizam e secretam osteóide, uma proteína rica em colágeno. O osteóide forma uma matriz na qual é absorvida os íons cálcio e fosfato, com posterior cristalização (Rose, 1997).

No interior do disco de crescimento existem células de cartilagem conhecidas como condrócitos, que se encontram em diferentes estágios, dependendo da sua localização na placa. A placa epifisária permanece até o fim da puberdade, quando o crescimento ósseo termina e esta se fecha (Pizauro Júnior, 2002).

A formação e mineralização do osso é um processo complexo, regulado por hormônios, fatores de crescimento locais e sistêmicos, como insulina, IGF-1 e prostaglandinas (Moreki, 2005).

A vitamina D e seus metabólitos desempenham um importante papel na absorção e retenção de cálcio e estão intimamente ligados à formação e reabsorção indireta do osso. O

1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), a forma hormonal ativa da vitamina D, aprimora a diferenciação de células da cartilagem em células ósseas (Fraser, 1988).

### 3. Cálcio e Fósforo

Entre os macrominerais, o cálcio destaca-se por ser essencial à estrutura óssea e ao metabolismo corporal, distribuído nos fluidos e tecidos do corpo. Alguns exemplos da necessidade de cálcio pelas aves referem-se à formação e manutenção dos ossos, formação da casca do ovo, transmissão de impulsos nervosos, contração muscular, entre outros (Muniz *et al.*, 2007).

A deposição de cálcio no esqueleto é mais intensa na fase de crescimento, chegando ao final do primeiro mês de vida a 80% do total de cálcio da ave adulta. Uma suplementação mineral inadequada durante a fase de crescimento terá como consequência um desequilíbrio na homeostase mineral e desenvolvimento inapropriado dos ossos das aves, ou seja, uma calcificação anormal dos ossos (Muniz *et al.*, 2007).

O cálcio, o fósforo e a vitamina D são elementos intimamente associados no metabolismo, geralmente são combinados entre si, de modo que a carência de um deles na dieta limita o desempenho das aves (Macari *et al.*, 2002).

Em dietas de crescimento, é extremamente importante garantir a suplementação de cálcio e fósforo disponível na proporção de 2:1. A excreção de altos níveis de complexos Ca:P podem prejudicar a formação tanto de osso medular quanto de cortical. Excesso de cálcio na dieta irá contribuir na diminuição da ingestão de alimentos, calcificação visceral, e outras complicações (Moreki, 2005).

A vitamina D, precursor da vitamina D<sub>3</sub>, é um nutriente essencial na utilização do cálcio da dieta para manter ou regular sua homeostase e sustentar funções metabólicas no corpo da ave. Em uma ave jovem normal, em torno de 70% da absorção de cálcio, que ocorre principalmente no duodeno, é vitamina D dependente (Moreki, 2005).

A vitamina D<sub>3</sub> exigida pelos animais pode ser formada através do colesterol da pele seguida de exposição à iluminação ultravioleta, como a luz solar. Entretanto, a maioria dos frangos comerciais são criados em confinamento e, não são capazes de produzir sua própria vitamina D<sub>3</sub>. Por esse motivo, rações de frango são normalmente suplementadas com essa vitamina (Saunders-Blades and Korver, 2008).

A vitamina D<sub>3</sub> só é funcional após duas conversões. A primeira delas ocorre no fígado e resulta na formação da 25-OH vitamina D<sub>3</sub>, principal forma de vitamina D<sub>3</sub> no sangue. A segunda conversão é a de 25-OH vitamina D<sub>3</sub> em 1,25-(OH) vitamina D<sub>3</sub>, sua forma ativa.

Em algumas circunstâncias, como no caso de frangos muito jovens, frangos velhos, entre outros, a conversão de vitamina D<sub>3</sub> em 25-OH vitamina D<sub>3</sub> pode ser prejudicada, o que reduz a quantidade da forma ativa da vitamina no animal. Através da suplementação diretamente de sua forma ativa (disponível comercialmente na forma de HyD) é possível aumentar a concentração de vitamina D nas aves (Saunders-Blades e Korver, 2008). No manejo de frangos de corte, nutrição é o centro da manutenção da saúde do esqueleto (Rath, 2000). Uma suplementação mineral inadequada durante a fase de crescimento terá como consequência o desenvolvimento inapropriado dos ossos (Muniz *et al.*, 2007).

#### **4. Má formação óssea**

De acordo com Rath (2000), uma série de fatores influencia o fortalecimento do esqueleto, como crescimento, idade, sexo, vitaminas, nutrição, genética, hormônios, atividade física e estresse mecânico, toxinas, infecções e imunidade. A nutrição é o ponto central de manutenção de um esqueleto saudável na produção e manejo de frangos de corte.

As mudanças na genética das aves e nas práticas de manejo nas granjas parecem ter repercutido nas características dos ossos, especialmente de frangos em crescimento, aparecendo problemas como necrose da cabeça do fêmur, raquitismo, discondrodisplasia da tíbia e a Síndrome do Osso Negro (Whitehead, 2010).

A redução da locomoção e do bater das asas, cenário da criação intensiva de aves, pode comprometer negativamente o aumento de densidade óssea após quatro semanas de idade (Talaty *et al.*, 2009).

Um experimento feito por Williams *et al.* (2003) demonstrou uma linhagem comercial de frangos de rápida taxa de crescimento apresentando um decréscimo na mineralização de tíbia e aumento de porosidades quando comparada à uma linhagem de crescimento lento. Após submeter os animais à uma dieta de restrição, os autores verificaram melhora tanto na mineralização, quanto na quantidade de porosidades, sugerindo que a taxa de crescimento, em oposição à linhagem, contribuiu para essa mudança.

## 5. Síndrome do Osso Negro (BBS)

O escurecimento da tíbia de frangos de corte atingindo os tecidos musculares adjacentes tem sido frequentemente relatado nos últimos anos. De acordo com Alves *et al.* (2012), a BBS afeta cerca de 30% das coxas e sobrecoxas de frango de corte. Contudo, observações nas linhas de produção e produtos disponíveis no varejo sugerem que o problema é muito mais difundido do que aparenta.

O osso escurecido tem implicações tanto para a qualidade do produto, quanto para o bem-estar animal e é agora descrito pelo nome Síndrome do Osso Negro (Whitehead e Fleming, 2008).

A Síndrome do Osso Negro, também conhecida como *Black Bone Syndrom* (BBS), é um problema identificado recentemente, e uma das hipóteses é ser consequência de um extravasamento de sangue do interior do osso através de porosidades, ocorrendo principalmente na parte proximal da tíbia (Pérez-Vendrell *et al.*, 2011).

A difusão de sangue na tíbia ocorre na extremidade proximal, próximo a placa de crescimento e, a partir desta, o sangue pode propagar-se à porção inferior do osso, por baixo do perióstio (Whitehead, 2009).

De acordo com Whitehead e Fleming (2008), o osso formado nas aves jovens não é sólido e mineralizado, sendo repleto de orifícios, formando uma estrutura porosa. A seleção genética de aves para maior ganho de peso faz com que os finitos osteoblastos produzam osso em elevadas taxas, resultando uma estrutura óssea porosa (Whitehead e Fleming, 2008).

Apesar de a diáfise do osso ainda ser capaz de suportar o peso da ave com essa porosidade, Whitehead e Fleming (2008) encontraram uma situação diferente na epífise, na porção imediatamente adjacente à placa de crescimento proximal – área da qual parece haver o extravasamento de sangue. Nessa região, os autores evidenciaram um osso mais fino, o que foi confirmado por análise histológica, pois verificou-se que a área total mineralizada é fina e repleta de porções de osso pobremente conectadas, sendo em sua maioria compostas por osso esponjoso, formando evidentes rotas de escape do sangue até o perióstio.

De acordo com Vázquez e Soto-Solanova (2009), esse extravasamento de sangue do osso para os tecidos musculares adjacentes, criando escurecimento dessa região, é uma das características que não somente é rejeitada pelos consumidores em alguns países, como também pode ter um impacto negativo na vida de prateleira do produto.

A mioglobina é o principal pigmento encontrado no tecido muscular e pode influenciar a coloração da mesmo. Este pigmento e outras proteínas compostas de ferro podem reduzir a estabilidade oxidativa no tecido do músculo da coxa de frangos através da elevação de agentes pró-oxidativos, podendo aumentar a susceptibilidade a danos oxidativos e conseqüente diminuição a vida de prateleira (*shelf-life*)(Vásquez e Soto-Solanova, 2009).

O grau de escurecimento causado pela síndrome parece aumentar quando a carne com osso é congelada. Presumidamente, o processo de congelamento compele mais o sangue da medula óssea em direção ao osso e à carne adjacente. Efeitos negativos no mercado e na comercialização de produtos podem ser evidentemente percebidos em restaurantes *fast-food*, que estão substituindo porções com coxa de frango congelada por cortes desossados. O processo de cocção também contribui neste processo, além de escurecer o sangue extravasado no tecido muscular (Whitehead, 2010).

Um estudo realizado na Universidade Federal de Grandes Dourados - MS (UFGD) avaliou a frequência da Síndrome do Osso Negro em sobrecoxas refrigeradas e congeladas. Também foi avaliada a aparência do osso e foi feita uma análise sensorial. Verificou-se que de maneira geral, a frequência da síndrome nas sobrecoxas foi de 35% e que houve um aumento de 16% após o processo de congelamento. Macroscopicamente, as sobrecoxas congeladas apresentaram aumento de 18% na frequência de ossos considerados inaceitáveis, comparadas às sobrecoxas refrigeradas. Pela análise sensorial, não foi observada influência do tipo de armazenamento nos atributos sabor, bem como nos atributos odor e maciez. Entretanto, independente do tipo de conservação, observou-se uma diminuição gradativa no escore do atributo aparência geral segundo os graus de BBS apresentados (Alves *et al.*, 2012).

De acordo com o estudo realizado por Pérez-Vendrell *et al.* (2011), a suplementação na dieta de frangos com 25-hydroxyvitamina D pode ser eficaz na formação de uma estrutura óssea sólida, minimizando a fuga de sangue no processo que leva à aparição da BBS, além de melhorar ganho de peso corporal, índice de conversão alimentar e rendimento de peito.

Um experimento realizado no Centro de Pesquisa de Frangos de Corte, da Universidade de Alberta, Canadá, avaliou o efeito da fonte de vitamina D<sub>3</sub> no desempenho de frangos de corte, composição de carcaça e aceitação pelo consumidor (Saunders-Blades e Korver, 2008). Os autores demonstraram que os animais suplementados com HyD do dia 0 aos 41 dias de idade apresentaram maior ganho de peso e rendimento de peito em relação aos outros três grupos (grupo sem suplementação; grupo que recebeu suplementação com de HyD somente até 28 dias de vida e grupo que recebeu suplementação com HyD somente nos 13 últimos dias de

vida). Além disso, o mesmo grupo apresentou um aumento na aceitação de coxas de frango pelo consumidor. O grupo suplementado com HyD dos 0 aos 41 dias e o grupo que recebeu HyD somente no início da vida (28 dias) apresentaram maior resistência à quebra óssea, sugerindo que a suplementação de 25-OH vitamina D<sub>3</sub> durante toda a vida do animal potencializa ou acelera a formação óssea.

## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de vitamina D (HyD) sobre a qualidade óssea de frangos de corte e a predisposição destes em apresentar os diferentes graus da Síndrome do Osso Negro.

### **6.2 Objetivos específicos**

Visou determinar se a vitamina D, na forma ativa, favorece significativamente a formação e o desenvolvimento ósseo (através da espessura de osso compacto, peso e comprimento das tíbias), o remodelamento ósseo (através do número de osteoclastos) e se a mesma influencia no extravasamento de sangue da medula óssea para o osso e tecidos musculares adjacentes (através da avaliação de luminosidade, tom de azul, incidência e classificação da Síndrome do Osso Negro). Além disso, objetivou verificar o efeito do processo de cocção sobre os parâmetros avaliados. Além do paralelo entre grupo controle e suplementado, buscou-se diferenças nos parâmetros avaliados comparando-se os graus da Síndrome, a fim de identificar se algum dos fatores é determinante para um grau mais avançado ou mais leve da Síndrome.

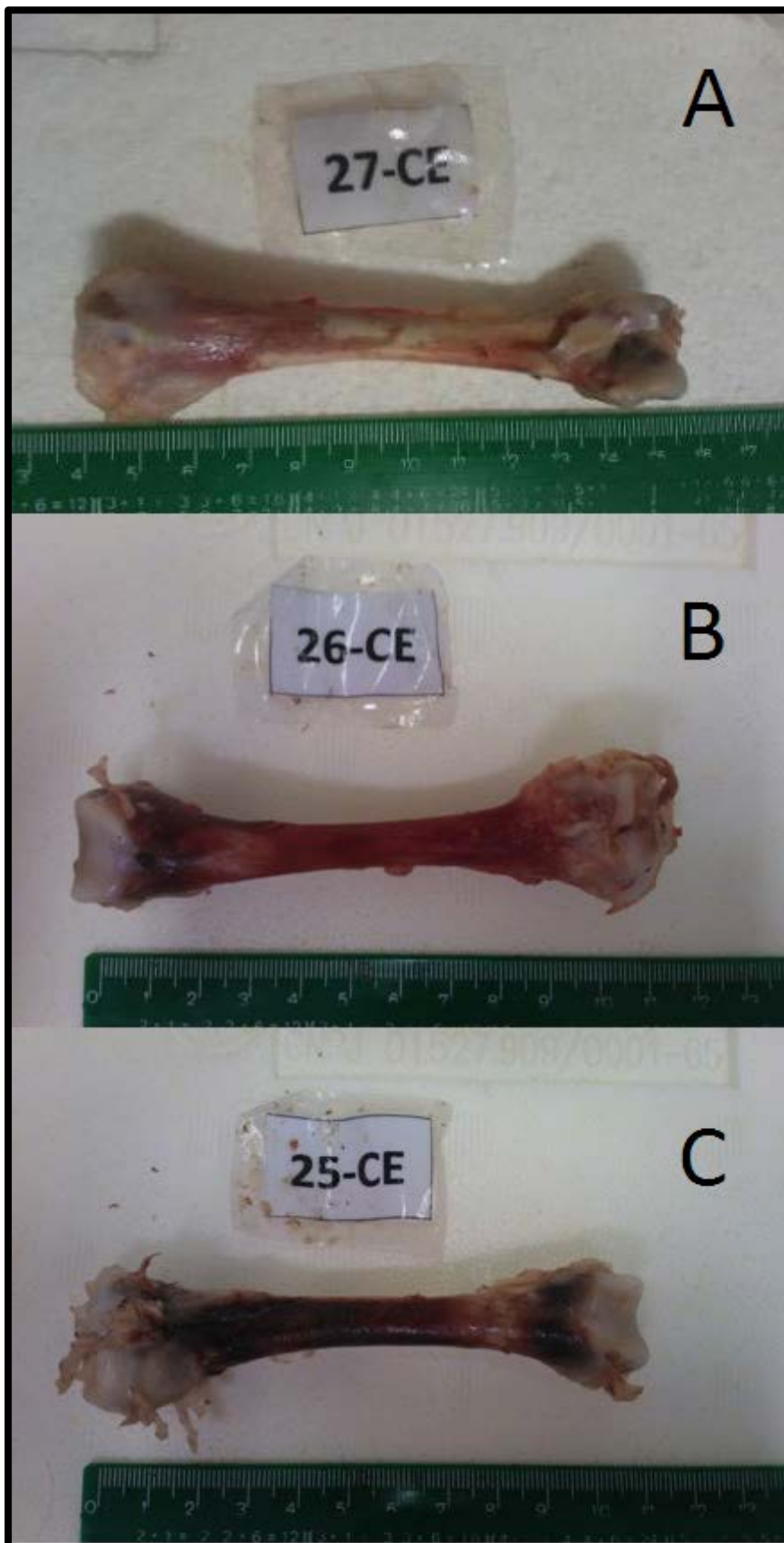


## 7. Metodologia

Foram utilizados 24 frangos de corte Cobb 500, machos, alimentados de acordo com as recomendações das tabelas brasileiras de Aves e Suínos de Rostagno *et al.* (2005), sendo os animais divididos em grupo controle - sem suplementação de vitamina D (CONT) e grupo tratado (TRAT) - com suplementação de vitamina D3 (69 ppb) no período de dezembro de 2012 à janeiro de 2013. Os animais foram abatidos aos 39 dias de vida e, após resfriamento, procedeu-se a coleta das tíbias direita e esquerda de cada animal, e estas foram encaminhadas ao Centro de Ensino, Pesquisa e Tecnologia de Carnes da UFRGS (CEPETEC/UFRGS) para a realização das análises.

As tíbias direitas foram desossadas, identificadas, pesadas e submetidas à avaliação de luminosidade (\*L), tom de vermelho (a\*) realizada no osso cru através da utilização de um colorímetro Minolta® 410R, posicionado na região da epífise proximal da tíbia. Após, as tíbias foram analisadas macroscopicamente para avaliação da ocorrência da Síndrome do Black Bone (Figura 2), e classificadas em grau 0 - aceitável (sem escurecimento), grau 1 - intermediário (leve escurecimento) e grau 2 - inaceitável (escurecimento acentuado), de acordo com a metodologia de Whitehead e Fleming (2008).

Figura 2 – Classificação das Tíbias de acordo com o grau da Síndrome do Osso Negro. A: sem escurecimento aparente; B: escurecimento Moderado; C: escurecimento acentuado



As coxas esquerdas (osso e tecidos adjacentes) foram levadas ao forno elétrico para cozimento até que estas atingissem a temperatura interna de 95°C. Após assadas, as coxas foram desossadas, identificadas, pesadas e analisadas macroscopicamente para avaliação da ocorrência da Síndrome do Osso Negro.

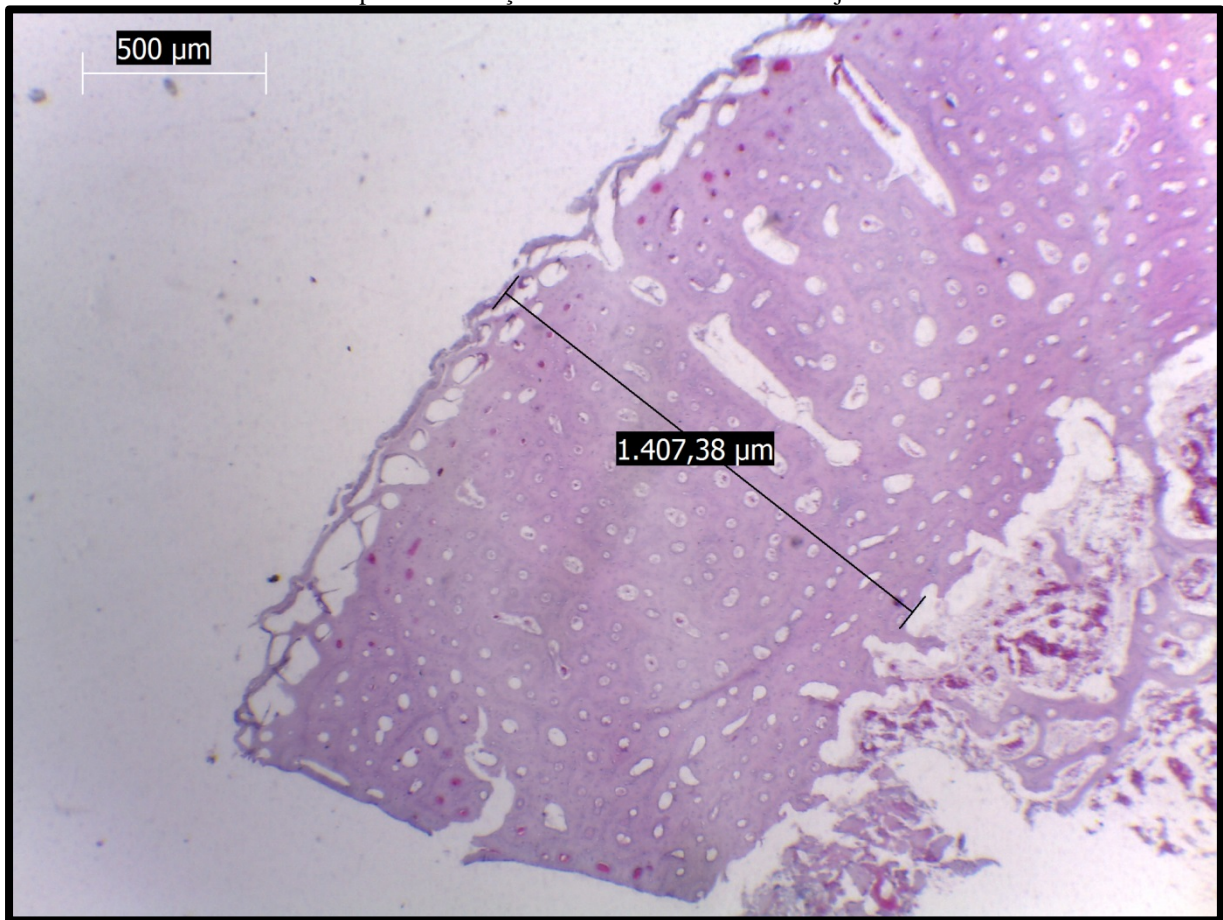
Após avaliação macroscópica de ambas as tíbias (in natura e cozida), estas foram serradas longitudinalmente com utilização de serra de fita. Cada meia tíbia foi armazenada individualmente em tubo tipo Falcon, fixadas em solução de formalina tamponada (pH= 7,2) na concentração de 10% e levados ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde procedeu-se o processamento das amostras.

Os ossos foram seccionados na região da epífise proximal, no sentido longitudinal, e na diáfise, no sentido transversal, de onde foram coletados fragmentos de 1,0 cm de cada osso, os quais foram descalcificados em ácido nítrico a 5% por aproximadamente 24 horas (fragmentos da epífise) e 36 horas (fragmentos da diáfise), à temperatura ambiente. Posteriormente, os fragmentos das tíbias foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (30-100%), sendo então diafanizados em xilol e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina contendo os fragmentos foram cortados com auxílio de micrótomo Leica RM 2125RT em cortes seriados de 3 µm de espessura e aderidos a lâminas de vidro. Os cortes foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) e submetidos à análise histológica. Nas lâminas histológicas, foram mensuradas a espessura de tecido ósseo formado (compacto) e a contagem de osteoclastos.

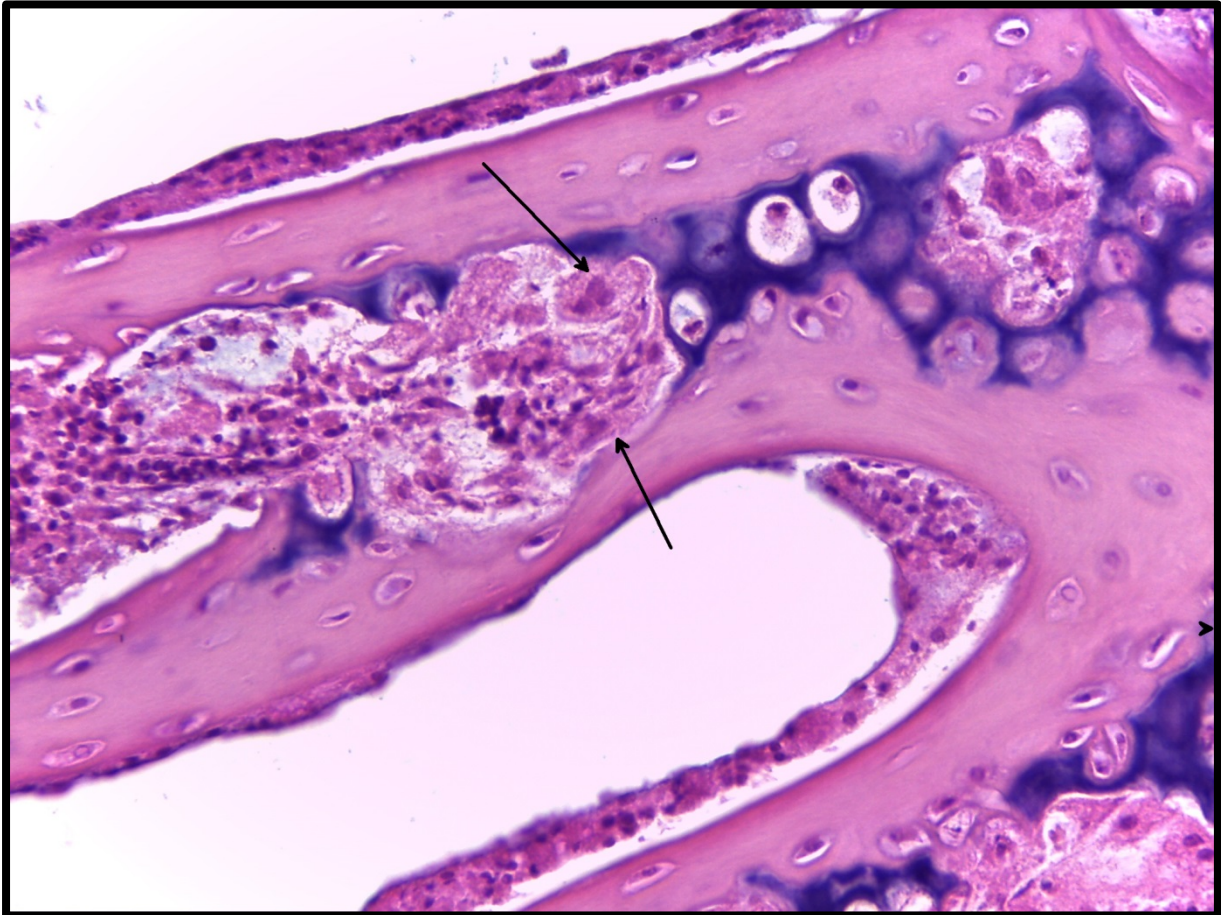
As lâminas da porção diafisária foram analisadas em três campos distintos, previamente delimitados, capturando-se imagens com auxílio de microscópio com aumento de 4X para mensuração da espessura do osso compacto na região da diáfise, acoplado ao sistema analisador de imagens Leica ICC 50HD. Após a captura dos campos, as imagens foram analisadas utilizando-se o Software Image ProPlus versão 6.0 para mensuração da espessura do osso compacto (Figura 3). A espessura de osso compacto da amostra que apresentou grau 0 nas tíbias cozidas (amostra 110) não pode ser mensurada - assim como as amostras 122 (direita) e 64 (esquerda), pois não foi possível fixar as amostras nas lâminas.

Figura 3 – Corte transversal da região da diáfise da tíbia de frango de corte, a linha preta indica a espessura do osso compacto. Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 10X.



As lâminas contendo cortes longitudinais da porção epifisária das tíbias direitas e esquerdas foram analisadas para a contagem de osteoclastos com auxílio de microscópio com aumento de 40X. Células grandes, com citoplasma eosinofílico, contendo três ou mais núcleos e localizadas na superfície óssea foram considerados osteoclastos (Figura 4).

Figura 4 – Corte longitudinal da epífise da tíbia de poedeiras comerciais. Osteoclastos encontram-se indicados pelas setas. Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40X.

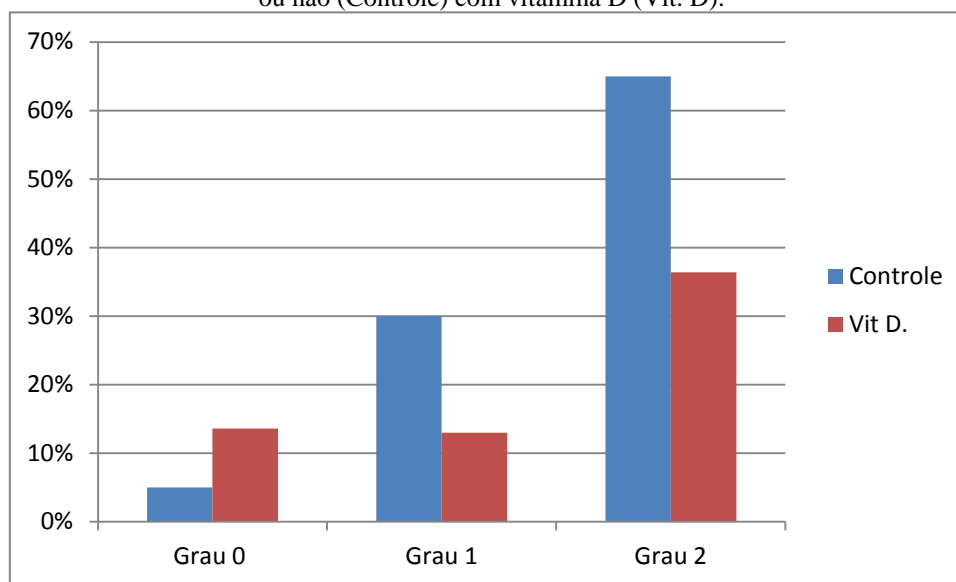


O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, considerando a suplementação ou não com vitamina D<sub>3</sub> (2 tratamentos), 12 repetições e, nas análises histológicas, incluiu-se 3 campos por repetição. Os valores obtidos foram avaliados pela análise de variância de acordo com o pacote computacional SAS (2001) e a comparação entre as médias efetuadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

## 8. Resultados e Discussão

Após classificação das tíbias de acordo com o grau de enegrecimento do osso (escores 0-2), o grupo controle apresentou um animal com escore 0 (5%), seis animais com escore 1 (30%) e treze animais com escore 2 (65%). Já o grupo suplementado apresentou três animais com escore 0 (13,6%), onze animais com escore 1 (50%) e oito animais com escore 2 (36,4%). A Figura 4 apresenta as porcentagens de animais que apresentaram diferentes graus de BBS segundo o tratamento dietético que receberam.

Figura 4 – Percentual de animais acometidos em diferentes graus de Black Bone Síndrome suplementados ou não (Controle) com vitamina D (Vit. D).



Os dados mostram que os animais que foram suplementados com vitamina D (vit. D) apresentaram menor incidência de BBS em grau severo (grau 2) em relação aos animais controle ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a vitamina D possa ter influenciado no metabolismo circulatório da medula e abrandado o extravasamento de sangue proveniente da medula óssea através das porosidades do osso. Um estudo semelhante realizado no IRTA, Espanha, descrito por Whitehead (2010b), demonstrou frangos de diferentes linhagens (Ross e Cobb) suplementados com HyD apresentando diminuição estatisticamente significativa do escurecimento de tíbias congeladas, afirmando que altos níveis de vitamina D podem ajudar a amenizar o problema do osso negro. A formação dos ossos é afetada diretamente pela nutrição que possui papel importante no desenvolvimento do esqueleto (Alves *et al.*, 2012). A vitamina D, apesar de aparentemente ter atenuado a BBS, não foi suficiente para a prevenção ou resolução definitiva da mesma. Uma explicação para isso poderia ser pelo fato de que nas

aves de crescimento rápido, a síntese endógena é deficiente e não consegue manter os níveis ideais de vitamina D (Mesquita, 2012). Essa suposição pode ser suportada pelo fato de que aves que possuem maior predisposição para desenvolver discondroplasia tibial apresentam baixas concentrações plasmáticas de vitamina D, embora as concentrações circulantes de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  em pintos portadores da lesão sejam normais (Zubair e Leeson, 1996). Outra hipótese poderia ser demonstrada pelo estudo conduzido por Baldock *et al.* (2006), que demonstrou um diferente papel da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , no qual sua presença poderia diminuir a osteoclastogênese, em oposição ao seu estímulo, através da ação em osteoblastos maduros que inibiriam a ação dos osteoclastos.

As tabelas 1 e 2 apresentam os dados dos resultados obtidos no presente estudo.

**Tabela 1 – Peso, comprimento, luminosidade, tom de azul, espessura de osso compacto e número de osteoclastos das tíbias cruas e cozidas de frangos de corte do grupo controle (sem suplementação de vitamina D<sub>3</sub>).**

<b>TRATAMENTO CONTROLE</b>								
	<b>Grau de BBS</b>							
	<b>0</b>		<b>1</b>		<b>2</b>		<b>MÉDIA TOTAL</b>	
<b>PROCESSAMENTO</b>	<b>CRU</b>	<b>COZIDO</b>	<b>CRU</b>	<b>COZIDO</b>	<b>CRU</b>	<b>COZIDO</b>	<b>CRU</b>	<b>COZIDO</b>
<b>Peso (g)</b>	30	25	25±3,33	18,33±2,22	26,25±2,81	21,25±2,81	26,25±3,12	21±2,60
<b>Comprimento (cm)</b>	12	12,50	7,93±4,15	10,93±0,38	11,37±0,37	11,19±0,43	10,57±1,47	11,34±0,59
<b>L</b>	49,07±1,90	42,30±4,25	35,79±12,61	31,62±6,54	35,03±14,57	33,30±6,56	35,24±13,86	33±5,36
<b>a*</b>	0,38±1,48	19,44±14,80	13,75±8,88	14,86±8,45	12,22±11,90	10,56±6,62	12,57±10,60	14,40±6,85
<b>Espessura (cm)</b>	1934,10±190,20	-	1560±214,39	1444,59±221,37	1763,86±185,96	1773,35±224,73	1800,02±415,88	1610,15±336,60
<b>N. osteoclastos</b>	1	2	1±1,33	2,66±1,33	2,62±1,12	2,88±1,81	2,08±1,26	2,83±1,66



**Tabela 2 – Peso, comprimento, luminosidade, tom de azul, espessura de osso compacto e número de osteoclastos das tíbias cruas e cozidas de frangos de corte que receberam suplementação de vitamina D (grupo tratado).**

TRATAMENTO								
VIT D								
GRAU DE BLACK BONE								
PROCESSAMENTO	0		1		2		MÉDIA TOTAL	
	CRU	COZIDO	CRU	COZIDO	CRU	COZIDO	CRU	COZIDO
<b>Peso (g)</b>	25	25	27±2,40	20,83±2,78	27,50±3,75	20	26,67±2,50	21±2,50
<b>Comprimento (cm)</b>	11,25±0,25	11,05±0,35	11,45±0,16	11,18±0,62	11,18±0,13	10,90±0,35	11,33±0,21	11,06±0,52
<b>L</b>	42,22±12,97	38,22±7,59	34,80±12,39	29,91±5,17	34,52±11,15	30,02±8,28	35,94±10,16	28,3±6,89
<b>a*</b>	18,31±1,11	12,87±9,92	11,86±10,28	21,49±7,47	12,36±9,50	12,08±8,73	12,03±10,68	17±6,04
<b>Espessura (cm)</b>	1707±115,55	1831,90±401,18	1648,90±208,99	1648,97±219,93	1389,20±311,99	1384,40±105,44	1582,65±306,85	1597,26±284,53
<b>N. osteoclastos</b>	5±2	5	3,16±2,16	3,16±1,89	2,50±1	2,25±1,38	3,25±1,79	3,16±1,86

Não foi verificada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os pesos das tíbias cruas no grupo controle (26,25 g) e no grupo que recebeu vitamina D (26,67 g). Já as tíbias cozidas apresentaram o mesmo peso em ambos os tratamentos (controle  $21\pm 2,60$  g e vit. D  $21\pm 2,5$  g), demonstrando uma perda de peso após o processo de cocção. Não houve diferença significativa no peso das tíbias dos animais quando relacionados ao grau da Síndrome, sugerindo que a presença ou não da Síndrome do Osso Negro não influencia no peso do osso, como seria o esperado. Em contrapartida, Williams *et al* (2000), avaliando a porosidade da tíbia de frangos de corte de crescimento rápido e de crescimento lento, encontraram que os animais de crescimento rápido obtiveram ossos de qualidade inferior em termos de conteúdo mineral, porosidade e força de quebra, sugerindo que a densidade mineral influencia na porosidade do osso. A porosidade anormal poderia estar sendo decorrente da incapacidade da estrutura óssea de acompanhar a elevada taxa de crescimento da massa muscular e/ou da mineralização incompleta.

O comprimento das tíbias cruas do grupo controle (10,57 cm) foi menor que o do grupo suplementado (11,33 cm). Este resultado, associado à uniformidade do peso entre as tíbias de ambos tratamentos (descrito à cima), apresenta ossos de maior e menor comprimento com pesos semelhantes, sugerindo um aumento no grau de porosidade nos ossos mais longos e mais leves. Já nas tíbias cozidas, o comprimento das tíbias foi maior no grupo controle ( $11,34\pm 0,59$  cm) que no grupo suplementado ( $11,06\pm 0,52$  cm), mas esse número não foi estatisticamente significativo ( $p>0,05$ ). Um estudo realizado por Muniz *et al.* (2007) avaliou o efeito de diferentes fontes de cálcio na dieta de frangos de corte sobre o desempenho e o grau de mineralização óssea nos primeiros 28 dias de vida. Os autores concluíram que uma série de fatores influenciam a quantidade de cálcio que é aproveitada pelo animal e que a fonte de cálcio que foi melhor utilizada (disponível) gerou tíbias de comprimentos maiores. Além da suplementação com vitamina D, disponibilidade de ingredientes na ração, nível de energia na dieta, sanidade dos animais e desafio sanitário do ambiente, densidade populacional, temperatura, umidade e ventilação, interações nutricionais e/ou alimentares, manejo e nível de estresse na criação, integridade do intestino, fígado e rins, entre outros, são elementos que influenciam a disponibilidade de cálcio para o metabolismo do animal (McDOWELL, 1992). Desta forma, para entender a real funcionalidade da vitamina D suplementada é necessário aferir o quanto deste fornecimento foi disponível para o metabolismo e conseqüentemente para avaliar sua eficiência frente a SON.

Nas análises de coloração óssea, os índices L\* (luminosidade) e a\* (tom de vermelho) das tíbias (cruas) não apresentaram diferença significativa entre os grupos controle e

suplementado ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, nas tíbias após processo de cocção, o valor de  $L^*$  dos animais do grupo controle foi  $33 \pm 5,36$  versus  $28,3 \pm 6,89$  no grupo que recebeu suplementação, enquanto os valores do índice  $a^*$  foram  $14,40 \pm 8,85$  e  $17 \pm 6,04$ , respectivamente. Avaliando o processo de cocção, as tíbias cruas (pré-cocção) apresentaram maiores valores ( $35,24 \pm 13,86$ ) em relação às cozidas ( $33 \pm 5,36$ ) e tom de vermelho apresentou resultado oposto, foi menor nas tíbias cruas ( $12,57 \pm 10,60$ ) em relação às cozidas ( $14,40 \pm 6,85$ ), resultados que sugerem o escurecimento do osso após o cozimento. A luminosidade foi maior no grau 0 em relação aos graus 1 e 2, os quais obtiveram valores semelhantes entre si. Não verificou-se diferença significativa no tom de vermelho entre os graus da BBS. Segundo o experimento de Lyon e Lyon (2002), tanto a cocção, quanto o resfriamento afetam o escurecimento da carne. A descoloração do tecido cru ou cozido pode ocorrer a partir de rupturas e migração celular de sangue causados por taxas de resfriamento lentas ou variáveis.

Segundo Rath (2000), a perda de osso cortical é um fator de risco para fraturas, afetando então a resistência e qualidade do osso. Para verificar se aves com BBS apresentavam uma menor quantidade de tecido ósseo, realizou-se a mensuração da espessura de osso compacto e os animais não suplementados (grupo controle) apresentaram maior espessura ( $1800,02 \pm 415,88 \mu\text{m}$ ) em relação ao grupo que recebeu vitamina D ( $1582,65 \pm 306,85 \mu\text{m}$ ) nas tíbias cruas. Já nas tíbias cozidas, o grupo suplementado apresentou maior espessura ( $1597,26 \pm 284,53 \mu\text{m}$ ) de osso compacto em relação ao grupo controle ( $1610,15 \pm 336,60 \mu\text{m}$ ), isto pode ser devido a perda de exsudado ou água após o processo de cocção, concordando com os resultados de perda de peso após cocção das tíbias dos animais do grupo controle. Esta perda pode ser de água ou exsudado extra-celular, inclusive de sangue livre no tecido ósseo ou medula. O grau da Síndrome e a espessura de osso compacto verificada na microscopia óptica apresentaram resultados inversamente proporcionais no grupo controle (tanto nas tíbias pré-cocção como pós-cocção) ou seja, quanto maior o grau de BBS, menor a espessura, podendo sugerir menor formação de osso compacto nos animais com maior grau da síndrome. Entretanto, nas aves que receberam suplementação de vitamina D, essa relação não pode ser observada. Nas tíbias cruas dos animais suplementados, apesar de a maior espessura ser encontrada no grau 0 ( $1934,1 \pm 190,20 \mu\text{m}$ ), a menor espessura foi encontrada no grau 1 ( $1560,6 \pm 214,39 \mu\text{m}$ ) e, assim, deixando o grau 2 com a espessura intermediária ( $1763,9 \pm 185,96 \mu\text{m}$ ). A diferença entre a qualidade das lâminas também pode ter prejudicado à mensuração da espessura dos ossos.

Um estudo elaborado por Williams *et al.* (2000) que comparou uma linhagem de frangos de corte de crescimento rápido e uma de crescimento lento observou que a primeira apresentou maior espessura de osso compacto em relação à segunda. Porém, apesar de mais espesso, o osso encontrava-se mais poroso, sem evidência de remodelamento ósseo, sugerindo que a causa seria uma reduzida formação óssea. Esta estaria ocorrendo ou em decorrência de uma demanda mineral inadequada ou de um problema na utilização de minerais na velocidade adequada, devido à alta taxa de crescimento. Fato que pode ter ocorrido nos animais deste trabalho, tendo em vista que o grupo tratado apresentou maior crescimento da epífise, mas mesmo peso do osso. Uma outra hipótese para o aumento da porosidade poderia ser um fenótipo da linhagem. Em um estudo realizado posteriormente (Williams *et al.*, 2003), os autores confirmaram uma relação positiva entre o grau de porosidade e a taxa de crescimento, neste trabalho os autores descartaram a variável “linhagem” como um possível fator. Segundo os mesmos autores, é incerto se o aumento da porosidade do perióstio observado nas atuais linhagens de aves de corte é devido à grande reabsorção ou à reduzida formação óssea.

Para verificar a presença de um possível remodelamento e/ou reabsorção óssea e sua possível relação com a Síndrome do Osso Negro, no presente estudo, foi realizada a contagem dos osteoclastos na epífise proximal das tíbias (Tabela 3).

**Tabela 3 – Número de osteoclastos na epífise de tíbias de frangos de corte suplementadas ou não (Controle) com Vit D (Vit D).**

AMOSTRA	TRATAMENTO	GRAU BBS	TÍBIAS CRUAS		TÍBIAS COZIDAS	
			OSTEOCLASTOS	MÉDIA POR GRAU	OSTEOCLASTOS	MÉDIA POR GRAU
87	vit. D	0	7		5	
121	vit. D	0	3	5	5	5
51	vit. D	1	1		8	
62	vit. D	1	2		2	
94	vit. D	1	5		2	
111	vit. D	1	4		3	
122	vit. D	1	7		4	
137	vit. D	1	0	3,17	0	3,17
25	vit. D	2	3		1	
34	vit. D	2	2		5	
96	vit. D	2	4		1	
133	vit. D	2	1	2,5	2	2,2
110	controle	0	1	1	2	2
64	controle	1	0		4	
75	controle	1	0		2	
104	controle	1	3	1	0	2,67
60	controle	2	1		3	
65	controle	2	2		4	
76	controle	2	2		6	
79	controle	2	3		3	
86	controle	2	3		7	
89	controle	2	5		0	
98	controle	2	4		2	
91	controle	2	1	2,62	1	3,12
<b>TOTAL</b>			59		77	
<b>MÉDIA CONTROLE</b>			2,08		2,83	
<b>DESVIO PADRÃO</b>			1,26		1,67	
<b>MÉDIA VIT D.</b>			3,25		3,17	
<b>DESVIO PADRÃO</b>			1,79		1,86	

Como esperado, visto que as tíbias esquerda e direita pertencem as mesmo animal, não houve diferença significativa no número de osteoclastos entre ambas. No grupo que recebeu suplementação de vitamina D, observou-se 77 osteoclastos (média de 3,25 nas tíbias cruas e 3,17 nas cozidas) e 59 osteoclastos no grupo controle (média de 2,08 nas tíbias cruas e 2,83 nas cozidas). Esse número sugere que um maior remodelamento ósseo esteja

ocorrendo nos animais que recebem a vitamina além da quantidade recomendada. No grupo controle, a quantidade de osteoclastos não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) nas tíbias classificadas com os diferentes graus de BBS. Já no grupo suplementado, essa relação foi inversa, quanto maior o grau de escurecimento, menor o número de osteoclastos encontrado ( $p<0,05$ ). Esse resultado suporta a afirmação de Willians (2003), que demonstra ossos mais porosos com menor atividade osteoclástica, visto que o remodelamento parece estar melhorando o grau de escurecimento do osso, possivelmente diminuindo sua porosidade. O número de osteoclastos encontrado não foi expressivamente diferente do que estudos anteriores (Crocì *et al.*, 2003; Garcia Faitarone *et al.*, 2012,) indicando que não há um aumento ou diminuição expressivos do remodelamento nos ossos afetados pela BBS.

## **8.1 Considerações Finais**

A solução para o problema requer uma seleção genética de reprodutores com melhor estrutura óssea. A curto prazo, o problema pode ser amenizado através de medidas nutricionais visando maximizar a qualidade do osso. O cálcio, o fósforo e a vitamina D são os nutrientes primordiais a se considerar (Whitehead, 2009). Além disso, a deposição de músculo sobre o osso deveria torná-lo mais denso e forte, então, buscando-se uma seleção voltada ao músculo da coxa, em oposição à seleção voltada ao rendimento de peito, poder-se-ia levar a um aumento da densidade mineral óssea da tíbia e do fêmur, tornado-os mais fortes e menos suscetíveis a quebras (Talaty *et al.*, 2009).

## 9. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que a suplementação de vitamina D<sub>3</sub> em sua forma ativa (HyD) na dieta de frangos de corte não influenciou a espessura do osso compacto (tíbia), mas pode influenciar positivamente o crescimento em comprimento dos ossos. A administração da vitamina D pode diminuir o extravasamento de sangue proveniente da medula óssea, pois minimizou o escurecimento do osso e da carne circundante (BBS), mas, nos níveis e no estágio etário das aves fornecidos (39 dias) não foi capaz de prevenir a completamente o surgimento da síndrome. Após o processo de cocção, o escurecimento do osso acometido com a BBS foi agravado.



## REFERÊNCIAS

---

ALVES, M. C. F.; PAZ, I. C. L. A.; BALDO, G. A. A.; GARCIA, R. G.; NÄÄS, I. A.; CALDARA, F. R.; GAVILAN, C. W. S. Pesquisa realizada na UFGD avaliou a frequência de Síndrome do Osso Negro em sobrecoxas de frangos de corte. Revista do avicultor Campinas, São Paulo. ed. 67. Disponível em <<http://www.avisite.com.br/revista/>>. Acesso em 20 de setembro de 2013.

AVEIRO, M. C. Influência de um programa de atividade física sobre o torque muscular, o equilíbrio, a velocidade da marcha e a qualidade de vida de mulheres portadoras de osteoporose. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos, Centro de ciências biológicas e da saúde, São Paulo, 2005.

BALDOCK, P. A.; GETHIN, P. T.; HODGE, J. M.; BAKER, S. U.; DRESSEL, U.; O'LOUGHLIN, P. D.; NICHOLSON, G. C.; BRIFFA, K. H.; EISMAN, J. A.; GARDINER, E. M. Vitamin D Action and Regulation of Bone Remodeling: Suppression of Osteoclastogenesis by the Mature Osteoblast. **Journal of bone and mineral research**. Austrália. v. 21, n. 10, p. 1618-162, 2006.

COWIN, S. C.; MOSS, L. S.; MOSS, M. L. Candidates for the mechanosensory system in bone. **Journal of Biomechanical Engineer**. Estados Unidos, v. 113, p. 191-197, 1991.

CROCI, A. T., CAMARGO, O. P.; BITAR, G.; PEREIRA, S. L. B.; MOREIRA, M.; FREITAS JR, S. Efeito do Concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea. Estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**. São Paulo, Brasil, v.11, n.4, p. 230-239, 2003.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CIAS - Central de Inteligência de Aves e suínos. A avicultura no Brasil, 2010. Disponível em <[http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13&Itemid=15](http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=15)>. Acesso em 22 de setembro de 2013.

FRASER, F.R. Bone minerals and fat-soluble vitamins. Em K. Blaxter & I. Macdonald (Eds.) *Comparative Nutrition*. John Libbey & Company Ltd. Londres, p. 105-112, 1988.

GARCIA FAITARONE, A. B.; GARCIA, E. A.; ARTONI, S. M. B.; GAVIOLI, S.; SILVA, M. D. S. GONÇALVES, H. C.; PELÍCIA, K. Qualidade óssea de poedeiras comerciais leves alimentadas com rações suplementadas com diferentes óleos vegetais. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.19, n.3, p. 356-365, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2012. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária. Disponível em <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201201\\_publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201201_publicacao_completa.pdf)>. Acesso em 28 de Agosto de 2013.

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Capítulo – Tecido Ósseo.

JUNQUEIRA DE MATTOS, M. E. B. Efeitos da imobilização e remobilização em algumas propriedades mecânicas do osso. 2002. 56 f. Dissertação (Mestrado, em bioengenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Paulo, Universidade Federal de São Carlos, Ribeirão Preto. 2004.

LIU, D. The effects of dietary lipids on bone chemical, mechanical, and histological properties in japanese quail (*Coturnix C. Japonica*). 2000. 148 f. Tese (Doutorado em ciência animal e de frangos de corte) - Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, Estados Unidos. 2000.

LYON, B. G.; LYON, C.E. Color of Uncooked and Cooked Broiler Leg Quarters Associated with Chilling Temperature and Holding Time. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 81, p. 1916–1920, 2002.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, L. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal, São Paulo, FUNEP/UNESP, 375p., 2002.

McDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. New York: Academic Press, 1992. 523p.  
MESQUITA, F. R. Níveis e formas de vitamina D em rações para frangos de corte. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2012.

MOREKI, J. C. The influence of calcium intake by broilers breeders on bone development and egg characteristics. 2005. 217 f. Tese (Doutorado em ciências naturais e agricultura) - Departamento de Ciência animal, vida selvagem e pradarias. University of the Free State. Bloemfontein , República da África do Sul. 2005.

MUNIZ, E. B.; VARELA DE ARRUDA, A. M.; FASSANI, E. J.; TEIXEIRA, A. S.; SALES, E. P. Avaliação de fontes de cálcio para frangos de corte. **Revista Caatinga**, Mossoró, Brasil, v.20, n.1, p. 05-14, 2007.

PÉREZ-VENDRELL, A. M.; SOTO-SALANOVA, M. F.; MARTIN-POMÉS, E.; FOLEGATTI, E.; LLAURADÓ, L. Efecto del 25-hidroxicolecalciferol sobre los resultados productivos y la calidad del hueso y la carne de pollos broiler en condiciones normales o de estrés. In XLVIII Simposio Cientifico de Avicultura, Santiago de Compostela, 5 a 7 de outubro de 2011. 4 p.

PIZAURO JÚNIOR, J. M. Estrutura e função do tecido ósseo. In MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frango de Corte**. Capítulo 19,p. 247-262 e Capítulo 20 – Hormônios e regulação do metabolismo do tecido ósseo p. 267-278 Jaboticabal, SP. 2002.

RATH, N. C.; BALOG, J. M.; HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; KULKARNI, G. B.; TIERCE, J. F. Comparative differences in the composition and biochemical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens. **Poultry Science**, Estados Unidos, v.78, p. 1232-1239, 1999.

RATH, N. C.; HUFF, G. R.; HUFF, W. E.; BALOG, J.M. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 79, p. 1024-1032, 2000.

ROSE, S.P. **Principles of Poultry Science**. ed. CAB International, Wallingford, Reino Unido. 1997. p. 33-35.

ROSTAGNO, H. S., ALBINO, L. F. T., DONZELE, J. L., GOMES, C. P., RITA FLÁVIA DE OLIVEIRA, LOPES, D. C., FERREIRA, A. S., SERGIO LUIZ DE TOLEDO BARRETO, EUCLIDES, R. F. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais Universidade Federal de Viçosa – 2ª edição Departamento de Zootecnia 2005. 186 p.

SAUNDERS-BLADES, J. KORVER, D. Poultry Research Centre The Effects of HyD on Chick Quality and Broiler Performance. University of Alberta, Canada. Disponível em <<http://www.docstoc.com/docs/158860394/The-Effects-of-HyD-on-Chick-Quality-and-Broiler-Performance>>. Acesso em 12 de outubro de 2013.

TALATY, P. N.; KATANBAF, M. N.; HESTER, P. Y. Life cycle changes in bone mineralization and bone size traits of commercial broilers. **Poultry Science**, Estados Unidos, v. 88, n. 5 p.1070-1077, 2009.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. 2012. Informe UBABEF: Dados do setor. Disponível em: <[http://www.abef.com.br/Imagens/informe\\_UBABEF\\_9.jpg](http://www.abef.com.br/Imagens/informe_UBABEF_9.jpg)>. Acesso em 25 de Agosto de 2013.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura, 2013. Blog da UBABEF: O cenário de 2012 e as perspectivas de 2013. Disponível em < <http://blogs.ruralbr.com.br/franciscoturra/2013/02/07/o-cenario-de-2012-e-as-perspectivas-de-2013/>>. Acesso em 13 de setembro de 2013.

VAZQUEZ, M.A.; SOTO-SALANOVA, M. F. Quality Feeding of vitamins is the key to success. The black-bone-syndrome and its impact on the quality of meat. **Fleischwirtschaft**, Alemanha, v. 89, p. 21, 2009.

WHITEHEAD, C.; FLEMING, B. The black bone syndrome in broilers – a challenge for breeders? **International Hatchery Practice**, Escócia, v. 23, n. 8, p. 7-8, 2008.

WHITEHEAD, C. Factores nutricionales que influyen en los problemas óseos actuales de los broilers. In XLVI Simpósio Científico de avicultura, Zaragoza, Espanha, 29 de setembro a 2 de outubro de 2009. P. 69-80.

WHITEHEAD, C. Update on current European broiler bone problems. In Proceedings 21st Annual Australian Poultry Science Symposium; Sydney, Australia, p. 22-25. 2010a.

WHITEHEAD, C Nutritional factors in broiler bone problems. FeedMix v. 18, n. 1, 2010b. Disponível em <<http://www.allaboutfeed.net/>> . Acesso em 22 de janeiro de 2014.

WILLIAMS, B.; SOLOMON, S.; WADDINGTON, D.; THORP, B.; FARQUHARSON, C. Skeletal development in the meat-type chicken. **British Poultry Science**, Escócia, v. 41, p. 141-149, 2000.

WILLIAMS, B.; WADDINGTON, D.; MURRAY, H.; FARQUHARSON, C. Bone strength during growth: Influence of growth rate on cortical porosity and mineralization. **Calcified Tissue International**, Estados Unidos, v. 74, p. 236–245, 2003.