

Universidade Federal de Minas Gerais

NÍVEIS DE VITAMINA D₃ PARA FRANGOS DE CORTE

Tainá Silva Brandão Lopes

Belo Horizonte
2020

Tainá Silva Brandão Lopes

Níveis de vitamina D₃ para frangos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção de Não-Ruminantes

Prof. Orientador: Dr. Itallo Conrado Sousa de Araújo

Belo Horizonte

2020

L864n **Lopes, Taina Silva Brandão, 1994-**
Níveis de vitamina D3 para frangos de corte/ Taina Silva Brandão Lopes, -2020.

67 f.:il.

Orientador: Ítalo Conrado Sousa de Araújo
Coorientadora: Rogéria Serakides.

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Bibliografias f.: 62 a 67.

1. Frango de corte - Teses - 2. Alimentação e rações - Teses - 3. Suplemento alimentar- Teses - I. Araújo, Ítalo Conrado Sousa de - II. Serakides, Rogéria - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD - 636.085

Bibliotecário responsável Marcio Alves dos Santos - CRB 3589/0
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

NÍVEIS DE VITAMINA D3 PARA FRANGOS DE CORTE

Tainá Silva Brandão Lopes

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 14 de fevereiro de 2020, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Nadja Susana Mogyca Leandro

Universidade Federal de Goiás

Leonardo José Camargos Lara

Universidade Federal de Minas Gerais

Itallo Conrado Sousa de Araújo - Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Angela Maria Quintão Lana**, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 26/08/2021, às 00:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0925342** e o código CRC **B7711E66**.

Uma questão bem elaborada abre a possibilidade para grandes descobertas.

Cleber Galhardi, 2014

Dedico este trabalho à Leonina, Reinaldo e Elga, pelo carinho e apoio nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leonina e Reinaldo, por todo o amor que nos uniu e nos une frente à todas as adversidades enfrentadas, por sempre me incentivarem aos estudos, pelo altruísmo e abdicação em pró da busca pelo meus sonhos e pelos momentos de alegria vividos.

À minha avó Elga, por me amar e apoiar mesmo quando eu não tenho forças para me expressar.

Ao meu irmão Felipe, pelo companheirismo, pela calma e sensatez nos momentos de instabilidade.

À minha família pelo apoio e por acompanharem minha trajetória com tamanha satisfação.

Aos meus orientadores, Professor Itallo Conrado e Leonardo Lara, por todo o conhecimento construído, pela confiança, pelo exemplo de integridade, competência e pela amizade.

À Professora Rogéria Serakides e Professora Natália Ocarino pela orientação e disponibilidade. Ao aluno de pós-doc Bruno Bertassoli e aluna de doutorado Fabiana Rocha pela disponibilidade e imensa ajuda nas análises histopatológicas.

Às técnicas do Laboratório de Histopatologia da EV-UFMG, Leimar, Valéria e Nathália pelo direcionamento e ajuda descomedida na confecção das lâminas histológicas e, acima de tudo, por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

Aos meus colegas do grupo de estudos avícolas, Marcela Triginelli, Hítalo Barbosa, Bruno Antunes, Cláudio Costa, Guilherme Bassi e Bárbara Mol por tornarem a execução deste experimento possível e pelo companheirismo nos momentos de alegria e tensão. E um agradecimento especial para Mariana Vasconcelos, pela parceria e pela atuação na etapa de desempenho, Lorena Salim pela amizade e execução das análises de qualidade óssea e Isadora Araújo pela companhia e ajuda na parte histológica.

Aos funcionários do Laboratório de Metabolismo e Calorimetria Animal (LAMA), Roberto, Lu e Valério pela ajuda, zelo e dedicação ao nosso ambiente de trabalho.

Aos meus queridos amigos, Professor Matheus Anchieta e Professor Lúcio Carlos por sempre acreditarem em mim e por me mostrarem a cultura e a realidade do meio rural, com suas belezas e mazelas, e também, pela ajuda na construção de uma consciência crítica e humanizada da sociedade.

Aos meus amigos Ágatha Bacelar, Henrique Costa, Luana Lopes, Alan Figueiredo, Pamella Grossi e Guilherme Menezes, pelo companheirismo nos projetos de extensão, pela amizade, suporte emocional e pelos momentos que vivenciamos e que foram essenciais para o cotidiano na escola e para a construção do meu ser.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela estrutura e apoio.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Metabolismo da Vitamina D ₃	18
2.2 Funções da Vitamina D ₃	20
2.3 Efeito do desbalanceamento de Vitamina D ₃ nas aves	23
2.4 Níveis de suplementação de Vitamina D ₃ e seus efeitos no desempenho e qualidade óssea de frangos de corte.....	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
DESEMPENHO E SAÚDE ÓSSEA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D ₃	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.....69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Metabolismo da Vitamina D nas aves.....20
- Figura 2 – Efeito linear positivo, até o nível de 26,53% do recomendado, ($Y = 0.4538664 + 0.002612009x$; $X \geq 26,53$; $Y = 0.5231$; $R^2 = 0,65$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o consumo de ração nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 14 dias de idade estabilizou-se em 0,523 kg.....39
- Figura 3. – Efeito linear positivo, até os níveis de 25,51% do recomendado, ($Y = 0,7945041 + 0,0177865x$; $X \geq 25,51$; $Y = 1,248$; $R^2 = 0,95$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o consumo de ração nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade manteve-se uniforme em 1,248 kg.....40
- Figura 4. – Efeito linear positivo, até os níveis de 24,98% ($Y = 1,342833 + 0,092973333x$; $X \geq 24,98$; $Y = 3,668$; $R^2 = 0,98$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o consumo de ração nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 3,668 kg.....40
- Figura 5. – Efeito linear positivo, até a dose de 25,83% do recomendado ($Y = 0,3983157 + 0,003518874x$; $X \geq 25,83$; $Y = 0,489$; $R^2 = 0,74$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso médio corporal em relação aos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 14 dias se estabilizou em 0,489 kg.....41
- Figura 6. – Efeito linear positivo, até os níveis de 25,88% do recomendado ($Y = 0,5818434 + 0,01783293x$; $X \geq 25,88$; $Y = 1,0443$; $R^2 = 0,96$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso médio corporal em relação aos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade se estabilizou em 1,0443 kg.....41
- Figura 7. – Efeito linear positivo até os níveis de 24,90% do recomendado ($Y = 0,7124537 + 0,07366882x$; $X \geq 24,89$; $Y = 2,547$; $R^2 = 0,99$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso médio corporal em relação aos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade se estabilizou em 2,547 kg.....41
- Figura 8. – Efeito linear negativo até os níveis de 43% do recomendado ($Y = 1.1305556 - 0.00253333 - x$; $X \geq 42.64$; $Y = 1.02$; $R^2 = 0,25$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 7 dias de idade se estabilizou em 1,02.....42
- Figura 9. – Efeito linear negativo até os níveis de 23,88% do recomendado ($Y = 1,098333 - 0,003x$; $X \geq 23,88$; $Y = 1,0266$; $R^2 = 0,31$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 14 dias de idade se estabilizou
-

em
1,0266.....42

Figura 10. – Efeito linear negativo até os níveis de 25,32% do recomendado ($Y = 1,325 - 0,00686667x$; $X \geq 25,32$; $Y = 1,151$; $R^2 = 0,77$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade estabilizou-se em 1,151.....43

Figura 11. – Efeito linear negativo até os níveis de 24,76% ($Y = 1,85667 - 0,0189x$; $X \geq 24,76$; $Y = 1,3961$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade se estabilizou em 1,3961.....43

Figura 12. Efeito linear positivo até o nível de 24,08% do recomendado ($Y = 61,42 + 1,4872x$; $X \geq 24,08$; $Y = 97,24$; $R^2 = 0,84$). Em níveis acima deste a viabilidade nos diferentes níveis de inclusão de vitamina D₃ aos 35 dias de idade manteve-se uniforme 97,24%.....43

Figura 13. – Efeito linear positivo até os níveis de 20,02% ($Y = 9,1554 + 0,916928x$; $X \geq 20,02$; $Y = 27,51$; $R^2 = 0,46$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso da tíbia nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade estabilizou-se em 27,51g.....44

Figura 14. - Efeito linear positivo até a dose de 17,77% do recomendado ($Y = 25,7066 + 2,372496x$; $X \geq 17,77$; $Y = 67,88$; $R^2 = 0,40$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso da tíbia nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 67,88g.....44

Figura 15. – Efeito linear positivo até os níveis de 26,08% do recomendado ($Y = 26,296 + 0,59488x$; $X \geq 26,08$; $Y = 41,81$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de matéria mineral nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade estabilizou-se em 41,81%.....45

Figura 16. – Efeito linear positivo até os níveis de 28,85% do recomendado ($Y = 30,316 + 0,26968x$; $X \geq 28,85$; $Y = 38,09$; $R^2 = 0,71$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de matéria mineral nos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 38,09%.....45

Figura 17. - Efeito linear positivo até o nível de 19,26% do recomendado ($Y = 10,7 + 0,47448x$; $X \geq 19,26$; $Y = 19,84$; $R^2 = 0,68$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de cálcio nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade se manteve uniforme em 19,84%.....46

Figura 18. - Efeito linear positivo até o nível de 48,81% do recomendado ($Y = 13,53767 + 0,10988x$; $X \geq 48,81$; $Y = 18,90$; $R^2 = 0,26$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de cálcio nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade se manteve uniforme em 18,09%.....46

Figura 19. – Efeito linear positivo até o nível de 19,12% do recomendado ($Y = 0.904 + 0.17648x$; $X \geq 19.12$; $Y = 4.28$; $R^2 = 0,66$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste percentual de fósforo aos 21 dias estabilizou-se em 4,28 %.....	47
Figura 20. – Efeito linear positivo até o nível de 38,76% do recomendado ($Y = 1.514 + 0.06536x$; $X \geq 38.76$; $Y = 4.04$; $R^2 = 0,46$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de fósforo aos 35 dias manteve-se uniforme em 4,04%.....	47
Figura 21. – Efeito linear positivo, até o nível de 21,31% ($Y = 3.6875 + 0,57x$; $X \geq 21,31$; $Y = 15,83$; $R^2 = 0,87$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a força máxima à quebra nos níveis de inclusão de Vitamina D ₃ aos 21 dias de idade manteve-se uniforme em 15,83.....	48
Figura 22. – Efeito linear positivo até o nível de 27,03% ($Y = 5,946 + 0,9128x$; $X \geq 27,03$; $Y = 30,62$; $R^2 = 0,80$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a força máxima à quebra nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D ₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 30,62%.....	48
Figura 23. – Efeito linear positivo até o nível de 26,46% do recomendado ($Y=100.6692+0.540852x$; $X \geq 26.43$; $Y = 115.76$; $R^2 = 0,61$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o índice de seedor aos 21 dias manteve-se uniforme em 115,76.....	49
Figura 24. - Efeito linear positivo até o nível de 26,34% do recomendado ($Y = 15.024 + 2.21488x$; $X \geq 26.34$; $Y = 209.36$; $R^2 = 0,82$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o índice de seedor aos 35 dias estabilizou-se em 209,36.....	49
Figura 25. - Corte longitudinal da tíbia de frangos de corte com 35 dias de idade, após descalcificação. Grupo A sem suplementação com vitamina D, Grupo B com 500 UI/Kg de ração, Grupo C com 1.000 UI/Kg de ração, Grupo D 1.500 UI/Kg de ração e Grupo E com 2.000 UI/Kg de ração. Segunda e quinta tíbias do Grupo E, de cima para baixo, com ilhas de tecido cartilaginoso (setas).....	50
Figura 26 - Microscopia eletrônica da tíbia de frangos de corte aos 35 dias de idade. De (A) a (E) região da epífise óssea dos tratamentos A, B, C, D e E, respectivamente, em aumento de 12,5x. De (A') a (E') região da diáfise dos tratamentos A, B, C, D, e E, na devida ordem, em aumento de 25x. De (A'') a (E'') região da cortical dos tratamentos A, B, C, D e E, nesta ordem, em aumento de 50x. HE.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

CA	Conversão Alimentar
Ca	Cálcio
CaR.....	Receptores celulares sensíveis ao cálcio
CR.....	Consumo médio de ração
Ca ²⁺	Cálcio ionizado
DBP.....	Proteína de ligação da vitamina D
FRQ.....	Força de resistência à quebra
HE.....	Hematoxilina e eosina
M-CSF.....	Fator estimulante de colônias de macrófagos
NRC.....	National Research Council
P.....	Fósforo
PC.....	Peso Médio corporal
PT.....	Peso da tibia0
PTH.....	Paratormônio
PTHR.....	Receptores de PTH
RANK.....	Receptor ativador do fator nuclear κB
RANKL.....	Proteína ativadora do receptor do fator nuclear ligante κB
RO.....	Resistência óssea
V.....	Viabilidade
VDR.....	Receptores de vitamina D
VDRE.....	Elemento de resposta a vitamina D
VitD ₃	Vitamina D ₃
1,25-(OH)2D ₃	Calcitriol

24,25-(OH) ₂ D ₃	24,25-dihidroxicolecalciferol
25-(OH)D ₃	Calcidiol
25-OH-D ₃ -1 α -OHase.....	25-hidroxitamina D-1 α -hidroxilase
%Ca.....	Percentual de cálcio
%MM.....	Percentual de matéria mineral
%MS.....	Percentual de matéria seca

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com a finalidade de avaliar os efeitos dos níveis reduzidos de vitamina D₃ (colecalfiferol) sobre o desempenho e qualidade óssea de frangos de corte até os 35 de idade. Foram utilizadas, *ad libitum*, dietas para a fase inicial (1 a 14 dias) e crescimento (15 a 35 dias). As dietas eram isonutritivas e o suplemento vitamínico forneceu quantidades adequadas de todas as vitaminas, exceto vitamina D₃. Os níveis de vitamina D₃ utilizados foram: Grupo A, 0 UI/Kg em ambas as fases; Grupo B, 625 UI/Kg na fase inicial e 500 UI/Kg na fase de crescimento representando 25% da inclusão utilizada comercialmente; Grupo C, 1.250 UI/Kg na fase inicial e 1.000 UI/Kg na fase de crescimento representando 50% da inclusão utilizada comercialmente; Grupo D, 1.875 UI/Kg na fase inicial e 1.500 UI/Kg na fase de crescimento 75% da inclusão utilizada comercialmente; Grupo E, 2.500 UI/Kg na fase inicial e 2.000 UI/Kg na fase de crescimento representando 100% da inclusão utilizada comercialmente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 tratamentos de 6 repetições cada. 360 pintos machos Cobb® de um dia foram distribuídos em 30 gaiolas contendo 12 aves cada. Semanalmente as aves foram avaliadas quanto ao consumo de ração (CR), peso corporal (PC), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V). Aos 21 e 35 dias de idade, um frango por repetição foi abatido e as tíbias e fêmures retirados e dissecados. Os ossos foram avaliados quanto à percentual matéria seca, matéria mineral, cálcio, fósforo, força de resistência à quebra e densidade óssea. Aos 35 dias de idade os ossos passaram por avaliação histopatológica para avaliação morfológica macro e microscópica. Ao final do experimento as aves foram avaliadas quanto à deformidades varus e valgus. Para as variáveis de desempenho, percentual de cálcio, fósforo, matéria mineral, densidade e resistência óssea houve efeito linear crescente até os níveis de suplementação de aproximadamente 25% de inclusão. Na avaliação histomorfológica, apenas o grupo que recebeu dieta com 75% da inclusão comercial de vitamina D₃ apresentou tecido ósseo dentro da normalidade, os demais grupos apresentaram alterações compatíveis com quadros de osteopenia e osteopetrose. Os resultados observados demonstraram que para dietas isonutritivas não se torna necessário utilizar os níveis comerciais praticados atualmente, uma vez que a redução em até 75% e 25% garantiram, respectivamente, o desempenho zootécnico e qualidade óssea durante o período avaliado.

Palavras-chave: frango de corte, colecalfiferol, qualidade óssea, discondroplasia tibial

ABSTRACT

This work was conducted with the purpose of evaluating the effects of reduced levels of vitamin D₃ (cholecalciferol) on the performance and bone quality of broilers up to 35 days of age. Diets for the initial phase (1 to 14 days) and growth (15 to 35 days) were used *ad libitum*. The diets were isonutritive and the vitamin supplement provided adequate amounts of all vitamins, except vitamin D₃. The levels of vitamin D₃ used were: A group, 0 IU / Kg in both phases; B group, 625 IU / Kg of in the initial phase and 500 IU / Kg in the growth phase, representing 25% of the inclusion used commercially; C group, 1.250 IU / Kg in the initial phase and 1.000 IU / Kg in the growth phase, representing 50% of the inclusion used commercially; D group, 1.875 IU / Kg in the initial phase and 1.500 IU / Kg in the growth phase representing 75% of the inclusion used commercially; E group, 2.500 IU / Kg in the initial phase and 2.000 IU / Kg in the growth phase, representing 100% of the inclusion used commercially. The experimental design was completely randomized with 5 treatments of 6 repetitions each. 360 one-day-old Cobb® chicks were distributed in 30 cages containing 12 birds each. The birds were weekly evaluated for feed intake (CR), body weight (BW), conversion (WC) and viability (V). At 21 and 35 days of age, a repetitive chicken was euthanized and the tibiae and femurs removed and dissected. The bones were evaluated for the percentage of dry matter, mineral matter, calcium, phosphorus, bone strength and density. At 35 days of age, the bones underwent histopathological evaluation for macro and microscopic morphological evaluation. At the end of the experiment, the birds were evaluated for varus and valgus deformities. For the performance variables, percentage of calcium, phosphorus, mineral matter, dry matter and bone strength, there was a linear effect increasing up to the supplementation levels of approximately 25% of inclusion. In the histopathological evaluation, only the group that received a diet with 75% of the inclusion of vitamin D₃ presented bone tissue within the normal range, the other groups showed alterations compatible with osteopenia and osteopetrosis. The observed results showed that for isonutritive diets it is not necessary to use the commercial levels currently practiced, since the reduction by up to 75% and 25% guaranteed, respectively, the zootechnical performance and bone quality during the evaluated period.

Key-Words: broiler chicken, cholecalciferol, bone quality, tibial dyscondroplasia

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na produção de carne de frango e expressa ao longo dos anos crescimento e importância no setor avícola de corte em escala global. Nos últimos dez anos a cadeia avícola de corte brasileira apresentou aumento produtivo de 20% sendo que, no ano de 2018, o país produziu 12,86 milhões de toneladas e exportou 31,9% do total produzido. Estes resultados proporcionaram a segunda colocação no ranking mundial de produção de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos, e além disso, garantiram a posição de maior exportador mundial do setor. Ainda, o consumo per capita de carne de frango aumentou 28,9% nos últimos 20 anos (ABPA, 2019; ABPA, 2011).

Diante do aumento da procura por proteína animal de qualidade e fácil acesso, ampla atenção foi dada aos programas de melhoramento genético para a formação de aves com características específicas, capazes de expressar o máximo desempenho zootécnico a fim de obter animais que apresentem rápido crescimento e alto peso de abate, assim como, demais características zootécnicas desejáveis para a cadeia produtiva. Segundo Zuidhof et al. (2014) da década de 1950 até 2005 a taxa de crescimento do frango de corte abatido aos 42 dias de idade aumentou em mais de 400%, favorecendo o desenvolvimento da musculatura corporal, enquanto houve redução paralela em 50% da conversão alimentar, resultados que demonstram melhoria no potencial produtivo em um curto período de tempo.

No entanto, a intensa pressão de seleção para alta taxa de crescimento resultou em efeito negativo sobre características de qualidade óssea e em desequilíbrio esquelético-mecânico, devido à discrepância na relação de crescimento entre o tecido muscular e o ósseo (González-Cerón et al., 2015).

O aparecimento de enfermidades ósseas, como a discondroplasia tibial, refletem-se em decorrência de fatores como a seleção genética para o rápido crescimento. Ou ainda, em casos de sub e super alimentação que podem levar à quadros de osteopenia ou osteopetrose. Patologias do tecido ósseo podem gerar deformidade angular tíbio-tarsal ocasionando desvio na articulação tarso-metatarsica, alteração conhecida como valgus-varus, e que altera significativamente a capacidade de locomoção das aves, especialmente na fase final de criação (Guo et al., 2019).

Estas enfermidades causam diminuição do bem-estar devido ao aumento do percentual de aves com limitações de acesso à água e alimento, elevação da mortalidade e,

consequentemente, prejuízos produtivos. Em decorrência destes problemas resulta-se prejuízo econômico significativo para a cadeia avícola, relacionado ao aumento das perdas nas fases de apanha, transporte e abate consequentes à baixa qualidade óssea.

Para lidar com estes distúrbios, pesquisas foram realizadas para desenvolvimento de estratégias de manejo nutricional e ambiental que promovam a qualidade óssea. No entanto, utilização de dietas hipoenérgicas e hipoprotéicas, com a finalidade de limitar o superconsumo, o aumento na distância entre comedouros e bebedouros ou mudanças na densidade de criação não reduziram a ocorrência de desordens do sistema locomotor das aves (Leterrier e Nys, 1998; Bizeray et al., 2002; Buijs et al., 2012).

Nesse sentido também são desenvolvidos programas nutricionais de alta precisão com foco na melhora da qualidade óssea e que englobam o uso de aditivos, como a suplementação com minerais, fitatos, ácido ascórbico e vitaminas (Orban et al., 1993; Zhang et al., 2003; Kwiecień et al., 2016). Dentre todas as vitaminas, a D possui grande relevância no metabolismo ósseo, pois participa da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo, no trato gastrointestinal estimula a absorção de cálcio pelos enterócitos, nos rins aumenta a reabsorção de cálcio no túbulo renal e mobiliza cálcio ósseo na presença de paratormônio (PTH). Além disso, tem papel importante no crescimento, maturação, mineralização e manutenção do tecido ósseo (Souza e Vieites, 2014).

Devido à importância da vitamina D₃ (VitD₃) no metabolismo animal, a estratégia de suplementação desta nas dietas comerciais de frango de corte tem sido utilizada para prevenção de problemas ósseos. Os níveis de suplementação variam de acordo com a referência literária sendo que, as recomendações do National Research Council (NRC); é de 200 UI de VitD₃/Kg de ração durante todo o período de criação. Já a Tabela brasileira de aves e suínos indica 3.385, 3.054, 2.409, 1.968 e 1.763 UI/kg para as fases pré-inicial (1-7 dias), inicial (8-21 dias), crescimento I (22-33 dias), crescimento II (34-42 dias) e final (43-46 dias), respectivamente. Enquanto o Manual da linhagem Cobb® 500 sugere 5.000 UI/kg, durante todas as fases (NRC, 1994; Rostagno et al., 2017; Cobb, 2018). Contudo, a indústria trabalha com margens de segurança que podem exceder entre 5 a 10 vezes os níveis recomendados pelo NRC, com níveis próximos de 2.500 UI/kg na fase inicial e 2.000 UI/kg na fase de crescimento.

Por outro lado, a suplementação de VitD₃ em níveis excessivos pode resultar em problemas ósseos devido à mineralização de vasos sanguíneos, hipermineralização do tecido ósseo e quadros de hipercalcemia e fosfatemia, além de gerar aumento nos custos produtivos (Peixoto et al., 2012). Desse modo, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de

determinar os níveis que suplementação de VitD₃ que proporcionem equilíbrio entre ótimo desempenho zootécnico e custo de produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo da Vitamina D₃

Vitamina D é um termo genérico que se refere ao grupo de moléculas lipossolúveis, classificadas como secoesteroides, análogas aos esteroides. A classificação em secoesteroides deriva do latim, onde “seco” provém do termo “secare” ou retirar, devido à abertura nos anéis β de carbono que as diferencia das moléculas esteroides (Gatti, 2019). As vitaminas D₂ (ergocalciferol) e D₃ (colecalfiferol) são as formas de vitamina D mais comumente encontradas sendo que a primeira, é produzida por vegetais enquanto o colecalfiferol é a forma sintetizada pelos animais. Dentre as duas moléculas, a VitD₃ é mais bem aproveitada pelas aves, sendo dez vezes mais bioativa em relação à vitamina D₂, e por isto, é a forma mais utilizada nas rações (Dukes et al., 1996).

A vitamina D₃ pode ser sintetizada de forma endógena a partir do precursor 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D) ou pode ser obtida via alimentação. A produção endógena é mediada pela ação da radiação ultravioleta na epiderme, quando as aves são expostas a fotoestímulo solar ou por luz fluorescente em período de até 45 minutos de luz/dia, gerando a molécula de colecalfiferol (Pizauro Jr. et al., 2002).

No entanto na cadeia avícola moderna o acesso à luz é limitado, o que torna a metabolização desta vitamina via fotólise menos efetiva, aumentando os riscos da ocorrência de distúrbios provenientes da falta desta. Por isto, apesar de estudos realizados na década de 1990 apontarem que a tanto a exposição à luz fluorescente quanto a suplementação de vitamina D na dieta são eficazes na prevenção de desordens ósseas e metabólicas decorrentes da hipovitaminose D, a vitamina D dietética se torna uma importante via metabólica para garantia do desempenho e qualidade óssea (Edwards et al., 1992; Leyva-Jimenez et al., 2018).

Uma vez presente no tratogastrointestinal, a VitD₃ é absorvida ainda no intestino delgado. O transporte por meio dos vasos sanguíneos se dá pela ligação à proteína de ligação da vitamina D (DBP ou transcalfiferina) e pelo sistema linfático ocorre por meio da formação de quilomícos, por essas duas formas é transportada ao fígado. Todavia, também pode ser encontrada em outros tecidos que possuam expressão da enzima 25-hidroxivitamina D-1 α -

hidroxilase (25-OH-D₃-1 α -OHase), como o tecido adiposo, muscular, cérebro e ovários (Li et al., 2008).

Para alcançar sua forma metabolicamente ativa, a 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH)₂D₃ ou calcitriol) a VitD₃ necessita passar por duas hidroxilações. A primeira delas ocorre ainda no tecido hepático, sob a ação da enzima Vitamina D₃-25-hidroxilase presente no reticulo endoplasmático dos hepatócitos, que adiciona o grupo hidroxila ao carbono 25, formando 25-hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃) ou calcidiol. Esta forma é a mais abundante na circulação, devido à alta afinidade pela DBP. Esta proteína carreadora participa do processo de regulação da VitD₃, ao diminuir sua capacidade de ligação tecidual, o que aumenta a meia-vida plasmática e previne intoxicação em casos de hipervitaminose D. Além disto, o calcidiol é a forma de armazenamento predominante sendo os principais sítios de reserva o fígado e tecido adiposo (Soares Jr., 1992; Jones et al., 1998; Pfeifer et al., 2002; Kochupillai, 2008;).

A ativação propriamente dita ocorre quando o metabólito 25-(OH)D₃ é transportado para os rins onde, sob a ação da enzima 25-OH-D₃-1 α -OHase, ocorre a segunda hidroxilação gerando a molécula de calcitriol (DeLucca, 1988; Pfeifer et al., 2002; Hollick et al., 2006).

Quando há altos níveis de cálcio ou 1,25-(OH)₂D₃ sérico, ocorre a transformação da 25-(OH)D₃ em 24,25-dihidroxicolecalciferol (24,25-(OH)₂D₃) por intermédio da enzima 25-hidroxivitamina D₃-24-hidroxilase. Este processo é considerado de inativação, pois este metabólito é menos ativo que o calcitriol. O 24,25-(OH)₂D₃ passa ainda por uma última hidroxilação, formando o ácido calcitroico, que será excretado na bile (Soares jr., 1992; Jones et al., 1998). Um resumo didático do metabolismo da Vitamina D em aves está apresentado na Figura 1.

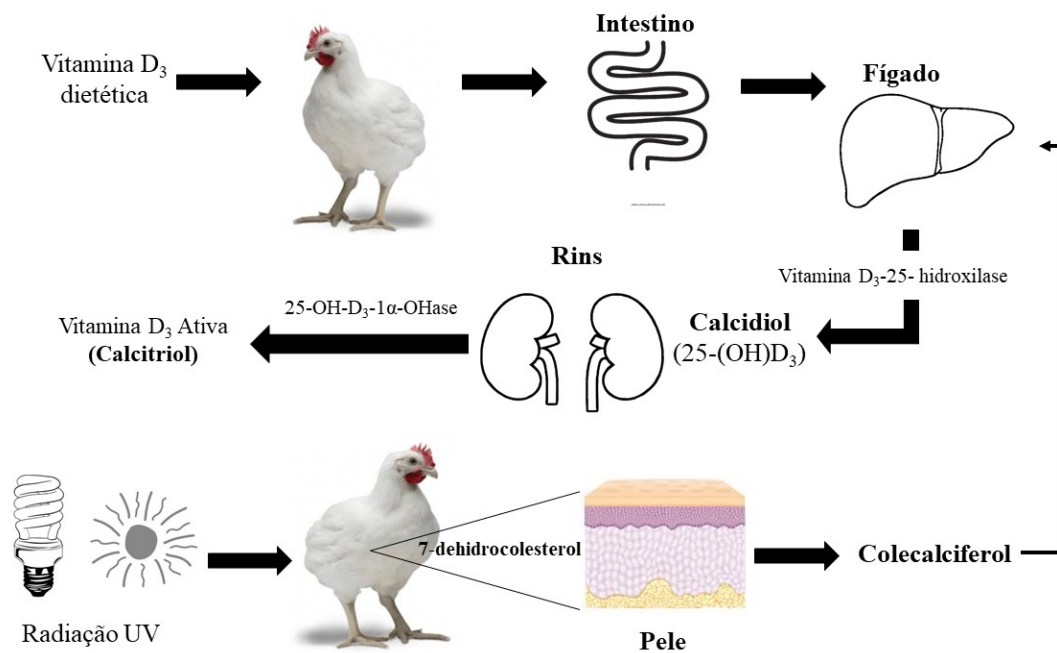


Figura 1. Metabolismo da Vitamina D nas aves.

2.2 Funções da Vitamina D₃

O cálcio (Ca) é o quinto elemento mais abundante na superfície terrestre, onde encontra-se principalmente na forma de carbonato e sulfato. Ele é considerado o mineral mais prevalente nos organismos vivos compondo-os em cerca de 2%, e deste percentual, 98% encontra-se nos ossos na forma de hidroxiapatita. O restante encontra-se no meio intra-celular (1,99%) e extra-celular (0,1%) sendo que, no meio extra-celular pode ser encontrado na forma de cálcio ionizado (Ca^{2+}), complexado à moléculas aniônicas (fosfato, bicarbonato, sulfato, citrato e lactato) ou ligado à proteínas como a albumina (de Matos, 2008; Schenck et al., 2010; Pravina et al., 2013).

A regulação deste cátion bivalente no fluido extra-celular depende de dois sistemas interdependentes. O organismo possui células presentes na glândula paratireoide, que são capazes de detectar e responder às leves mudanças na concentração de Ca sérico e também possui tecidos que efetivamente transportam Ca para do meio intra para o meio extra-celular e vice-versa: intestino, rins e ossos. Esse transporte ocorre mediado por hormônios, mais precisamente o PTH, calcitonina e VitD₃ (Hebert & Brown, 1995). Sob este mecanismo de regulação, o cálcio participa de atividades biológicas importantes como: transmissão neural, contração muscular, secreção exócrina dos hormônios PTH e calcitonina, coagulação sanguínea e a formação de estruturas complexas como o osso (de Matos, 2008).

A produção e ativação da vitamina D depende dos níveis séricos de Ca e fósforo (P) e é regulada por hormônios produzidos pela glândula paratireoide, o PTH e calcitonina. O PTH é um hormônio peptídico produzido pelas células C da paratireoide, sendo responsável por iniciar a cascata metabólica que resulta na mobilização de Ca a fim de restabelecer os níveis séricos constantes deste mineral. Este hormônio possui receptores nos néfrons renais e nos osteoblastos presentes no tecido ósseo, no entanto, não possui receptores no principal sítio de absorção de vitamina D₃, o intestino. Neste sítio, a ação ocorre por intermédio da vitamina D₃ (Jones et al., 1998; Jilka et al., 1999; de Prospero et al., 2009).

Situações de hipocalcemia causam a inativação dos receptores celulares sensíveis ao cálcio (CaR) presente nas células C da paratireoide, levando ao aumento da excreção de PTH. Este por sua vez, se liga aos receptores de PTH (PTHr) presentes nos néfrons, incitando a reabsorção do cálcio que seria excretado via renal, assim como, o aumento da atividade da enzima 25-OH-D₃-1 α -OHase de conversão da VitD₃ em sua forma ativa e a supressão da atividade da enzima 25- hidroxivitamina D₃-24-hidroxilase com consequente supressão da via de eliminação da VitD₃ (Harrington et al., 2007; Peacock, 2010).

Nos quadros de déficit de Ca sérico, o calcitriol produzido atua no intestino delgado se ligando aos receptores de vitamina D (VDR) dos enterócitos, desencadeando ações genômicas e não genômicas. Ao ocorrer a ligação à porção hidrofóbica do VDR, forma-se um complexo transcricional hormônio-receptor. Uma vez formado, este complexo se liga a uma sequência específica do DNA denominada VDRE (Elemento de resposta a vitamina D) estimulando a expressão de proteínas responsáveis pela captação de Ca pelos enterócitos (TRPV 5 e TRPV 6), pelo transporte intracelular de Ca (Calbindina D_{28k}) e ativação dos canais de membrana ATP-dependentes para extrusão do Ca para o fluido extracelular. A ação não genômica é considerada mais rápida e ocorre pela ligação da 1,25-(OH)D₃ à parte do VDR localizada em invaginações da camada bi lipídica da membrana celular induzindo a rápida absorção de cálcio pelo epitélio intestinal por meio de canais voltagem dependente (Ca⁺-Cl⁻) (de Matos, 2008; Castro, 2011).

Nas células ósseas o 1,25-(OH)D₃ atua sobre os osteoblastos, promovendo a osteoclastogênese e a reabsorção óssea por osteoclasia. Sob ação do calcitriol, ocorre a expressão da proteína ativadora do receptor do fator nuclear ligante κ B (RANKL) nos osteoblastos. Esta proteína é responsável por incitar a diferenciação das células hematopoiéticas da linhagem monócito-macrófago em osteoclastos. As células progenitoras dos osteoclastos expressam receptores de superfície para o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) produzida pelos osteoblastos e, quando ocorre a ligação entre M-CSF e seu receptor de

superfície, inicia-se a expressão do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK), receptor de RANKL, aumentando a quantidade de osteoclastos no tecido ósseo e a consequente reabsorção óssea (Suda et al., 2015; Weitzmann et al., 2012; Eiseman e Bouillon, 2014).

No entanto em situações de normocalcemia, a VitD₃ atua evitando a remodelação óssea excessiva. Sob a ação da 1,25-(OH)₂D₃ os osteoblastos produzem osteoprotegerina (OPG), proteína que se liga à RANKL impedindo sua ligação ao RANK. O funcionamento desta via endócrina molecular de regulação da osteoclastogênese pode ser influenciada por outros hormônios, como o PTH (Qin et al., 2004; Suda et al., 2015).

Além disto a VitD₃, pode ligar-se aos receptores VDR das células precursoras dos condrocitos e osteoblastos, iniciando respostas celulares. Ocorre a indução dos osteoblastos para produção de osteocalcina, proteína que age sobre as células da cartilagem óssea, promovendo a diferenciação e maturação celular contribuindo para prevenção de patologias como o raquitismo e discondroplasia tibial, enquanto nos osteoblastos, estimula a sua diferenciação e a síntese e mineralização do osteóide. (Farquharson e Jefferies, 2000; Van de Peppel et al., 2014).

Ou seja, em situações onde os níveis de cálcio sérico e VitD₃ circulante estão dentro da normalidade, a VitD₃ atua no processo fisiológico de deposição e remodelação óssea tanto por atuar diretamente sobre os condroblastos e osteoblastos via receptores VDR, quanto via indireta, por iniciar a cascata de osteoclastogênese via receptores osteoblásticos RANK-RANKL e controlar a diferenciação celular por meio da produção da proteína OPG e outras proteínas pelos osteoblastos.

Ao contrário, em situações de hipercalcemia, ocorre diminuição da síntese de PTH com degradação deste nas células C da paratireoide, concomitantemente ao aumento da secreção de calcitonina. Este último é um hormônio polipeptídico, responsável por inibir a reabsorção óssea por osteoclasia, ao se ligar aos receptores da proteína de ligação acoplada-GTP que inibem a atividade dos osteoclastos por interromper a organização citoesquelética destes. Além disto, a calcitonina induz a excreção de Ca pela via renal, retornando os níveis séricos de Ca à normalidade (Schenk et al., 2006; Naot et al., 2020; Takahashi et al., 2020). Dessa forma, não há aumento da concentração de cálcio e consequente excreção.

A ação da VitD₃ por expressão do VDR ocorre também em células do sistema hemocitopoiético, muscular e nervoso. A presença deste receptor no sistema imune indica que o calcitriol possui funções anti-inflamatórias e de modulação da expressão de citocinas dos linfócitos T. Já no tecido muscular, a ação do VDR leva à expressão de proteínas que modulam a captação de Ca e P, o metabolismo fosfolipídico e a proliferação e diferenciação das células

musculares. No sistema nervoso tem participação nas vias de detoxificação cerebral, inibindo a síntese de óxido nítrico e aumentando os níveis de glutathiona, molécula peptídica com função de proteção das membranas celulares (Garcion et al., 2002; Ceglia et al., 2008; Cantorna et al., 2010).

2.3 Efeito do desbalanceamento de Vitamina D₃ nas aves

A variação na literatura quanto aos níveis de inclusão de VitD₃ na dieta de frangos de corte, assim como a utilização de galpões fechados, e ainda, a baixa uniformidade da mistura dos alimentos durante a fabricação da ração podem causar situações de desbalanceamento no fornecimento deste elemento. Em situações práticas pode ocorrer a suplementação em excesso, com objetivo de prevenir alterações ósseas e garantir o desempenho, quanto a sub dosagem pode afetar o desempenho zootécnico das aves.

Com o objetivo de analisar o efeito da superdosagem de VitD₃ sobre a incidência de morte súbita em frangos de corte aos 42 dias de idade, Nain et al. (2007) suplementaram as aves com níveis de 5.000 e 80.000 UI/Kg de ração. Foram avaliados aspectos de sobrecarga do sistema cardiovascular frente ao estímulo de estresse, assim, avaliou-se a quantidade de ocorrência de arritmias ventriculares, tempo de início após o estresse, duração, capacidade de recuperação das aves e mortalidade. Os resultados deste estudo demonstraram que altas doses de VitD₃ podem aumentar o risco de síndrome da morte súbita em aves com pré-disposição ao rápido crescimento, por causar alterações eletrofisiológicas no miocárdio elevando a instabilidade cardíaca.

Kumar et al. (2017) realizam experimento avaliando os efeitos do excesso de vitamina D₃ sobre a saúde de frangos de corte até os 28 dias de idade. Para isso foram utilizados dois grupos, um recebeu apenas a dieta base, isonutritiva, e o outro recebeu dieta base e suplementação de 100.000 UI de VitD₃/Kg de peso vivo. Aos 14 dias de idade as aves do grupo suplementado iniciaram o quadro sintomático, onde foi observada desidratação, emagrecimento progressivo, fezes aquosas, poliúria, polidipsia, rigidez de membros inferiores, dificuldade de movimentação, aves apoiando-se sobre os jarretes. Ao exame histopatológico foi detectada calcificação do parênquima, túbulos renais, ureteres e pré-ventrículo. Os autores sugeriram que o aumento sérico de Ca e P causados pelo excesso de VitD₃ provoca a mineralização dos órgãos, podendo levar à morte por falha cardíaca ou renal. Comparado ao grupo suplementado, o grupo controle apresentou maior ganho de peso, sem alterações ao exame post-mortem e histopatológico.

A subdosagem de VitD₃ é menos recorrente e possui poucos relatos disponíveis na literatura. Estudos realizados na década de 1980 relataram que, diferentemente das aves em condições de hipocalcemia nutricional (que ocorre acompanhada de hiperfosfatemia) as aves com hipovitaminose D adquirem quadro de hipocalcemia e hipofosfatemia (Long et al., 1984).

O reflexo da hipovitaminose D é a hiperplasia da glândula paratireoide, com aumento na secreção de PTH. Em resposta aos altos níveis séricos deste hormônio inicia-se a reabsorção da matriz óssea, na tentativa de estabelecer os níveis séricos de Ca e P. Associado a este quadro, transcorre baixa maturação das células da cartilagem e a não mineralização óssea, caracterizando os quadros de hiperparatireoidismo secundário nutricional, associado a osteopenia onde podem ser observadas alterações relacionadas ao raquitismo, osteodistrofia fibrosa e discondroplasia tibial (Cheville e Horst, 1981; Long et al., 1984).

Aslam et al. (1998) relataram em trabalho avaliando vitamina D₃ sobre a resposta imune de frangos de corte, que a sub dosagem desta vitamina pode diminuir o ganho de peso, matéria mineral dos ossos, assim como, diminuir a capacidade de reação de hipersensibilidade dos basófilos cutâneos e o número de macrófagos circulantes.

2.4 Níveis de suplementação de Vitamina D₃ e seus efeitos no desempenho e qualidade óssea de frangos de corte

Os níveis de recomendação para inclusão de Vitamina D na dieta de frangos de corte variam na literatura e não são completamente estabelecidos. De acordo com o NRC a recomendação é de 200 UI de VitD₃/kg de ração para todas as categorias de aves, durante todo o ciclo produtivo (NRC, 1994). A Tabela brasileira de aves e suínos sugere as recomendações de acordo com a categoria animal, diferenciando frangos de corte, poedeiras e reprodutores, além de fazer a distinção para as diferentes fases de criação. Para frangos de corte as recomendações são de 3.385, 3.054, 2.409, 1.968 e 1.763 UI/kg para as fases pré-inicial (1-7 dias), inicial (8-21 dias), crescimento I (22-33 dias), crescimento II (34-42 dias) e final (43-46 dias), respectivamente (Rostagno et al., 2017). O manual de linhagem Cobb 500[®] recomenda 5.000 UI/Kg durante todo o ciclo produtivo (Cobb, 2015).

Edwards Jr. et al. (1994) realizaram experimento com a finalidade de determinar o requerimento de vitamina D para desempenho produtivo e qualidade óssea de frangos de corte criados com e sem contato com radiação ultravioleta (UV). As aves receberam dieta isonutritiva e foram suplementadas com diferentes níveis de colecalciferol (0; 50; 100; 200; 400; 800; 1.600 UI de /Kg de ração). Os resultados obtidos demonstraram que quando criadas em ambientes

fechados, o requerimento de vitamina D é mais alto. Neste trabalho os melhores resultados para as variáveis de ganho de peso e conversão alimentar foram observados nos grupos que receberam níveis entre 200 e 1.600 UI/kg de ração. No entanto, os menores índices de raquitismo foram observados nos grupos com suplementação de 800 e 1.600 UI/Kg de ração, indicando que os requerimentos para desempenho zootécnico possam ser diferentes dos requerimentos necessários para qualidade óssea.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos níveis de colecalciferol sobre o desempenho e qualidade óssea de frangos de corte, Khan et al. (2010) realizaram experimento suplementando as aves em níveis de 200, 1.500, 2.500 e 3.500 UI de colecalciferol /Kg de ração. Aos 42 dias de idade as aves suplementadas com 3.500 UI/Kg apresentaram maior peso corporal, no entanto, sem diferenças para a variável de conversão alimentar, onde os grupos suplementados com doses acima de 1.500 UI/Kg demonstraram desempenho semelhantes entre si. A incidência de discondroplasia tibial foi inversamente proporcional ao nível de suplementação de vitamina D, com menores índices no grupo suplementado com 3.500 UI/Kg de ração.

Para avaliar os requerimentos de VitD₃ para desempenho e qualidade óssea de frangos de corte aos 21 dias de idade em ambiente sem radiação UV, Leyva-Jimenez et al. (2019) realizaram bioensaio utilizando os seguintes níveis de suplementação: 0; 50; 100; 200; 400; 800; 1.600 e 3.200 de vitamina D₃ UI/Kg de ração por três modelos de regressão (linear simples, linear duplo e quadrático). Não foram observadas diferenças sobre o consumo e peso corporal nesta fase, no entanto para ganho de peso e eficiência alimentar, níveis iguais ou acima de 116 UI de vitamina D₃/Kg (utilizando modelo de regressão linear simples) e 201 UI de vitamina D₃ /kg de ração (utilizando modelo de regressão quadrático) proporcionaram resposta semelhante. Para as variáveis de percentual mineral da tíbia e resistência óssea, a média dos três modelos testados estimaram requerimento mínimo de 285 UI de vitamina D₃/Kg de ração. Indicando a possibilidade de utilização de níveis reduzidos nas linhagens de frango atuais.

Portanto, percebe-se que a avicultura industrial está em constante modernização, sendo cada vez mais comum o uso de ambientes de criação fechados para maior controle sobre as variações ambientais. Mas este sistema de produção pode impactar diretamente sobre a metabolização e os níveis de da VitD₃. Somado a isto, tem-se os programas de melhoramento genético, que exigem cada vez mais da estrutura muscular-esquelética dos frangos de corte.

Nesse sentido, a VitD₃ possui grande importância, uma vez que tem papel fundamental no controle dos níveis de Ca sérico, mediando a captação deste mineral no trato gastrointestinal e também controlando o desenvolvimento e remodelação do tecido ósseo. No entanto, os níveis de inclusão desta vitamina na dieta das aves ainda possuem grande variação na literatura e, a

falta desta vitamina ou seu fornecimento excessivo, podem impactar os índices zootécnicos e causar patologias que, conseqüentemente trarão prejuízos econômicos à cadeia avícola. Por isso, se torna necessário determinar como a inclusão desse aditivo na dieta influencia diretamente o desempenho zootécnico, assim como, a saúde óssea das aves de produção.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASLAM, S. M.; GARLICH, J. D.; QURESHI, M. A. Vitamin D deficiency alters the immune responses of broiler chicks. *Poult. Sci.*, v.77, p.842-849. 1998.

BIZERAY, D.; ESTEVEZ, I.; LETERRIER, C. et al. Influence of increased environmental complexity on leg condition, performance, and level of fearfulness in broilers. *Poult. Sci.*, v.81, p.767-773. 2002.

BUIJS, S.; VAN POUCKE, E.; VAN DONGEN, S. et al. The influence of stocking density on broiler chicken bone quality and fluctuating asymmetry. *Poult. Sci.*, v.91, p.1759-1767. 2012.

CANTORNA, M. T. Session 2: Micronutrients and the immune system Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *Proc. Nut. Soc.* V.69, p.286–289. .2010.

CASTRO, L. C. G. D. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*v.55, p.566-575. 2011.

CEGLIA, L. Vitamin D and skeletal muscle tissue and function. *Molec. Aspec. Med.*, v.29, p.407-414. 2008.

CHEVILLE, N. F.; HORST, R. L. Pathology of experimental vitamin D deficiency in chickens and effects of treatment with vitamin D metabolites. *Vet. Pathol.*, v.18, p.638-651. 1981.

COBB. Suplemento de nutrição e desempenho do frango de corte. 2018. Disponível em: <<https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/99b0cf062c/61bd2490-56d1-11e9-bfbd-7963ec6b06e5.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

COBB. Suplemento de nutrição e desempenho do frango de corte. 2015. Disponível em:<<https://cobbstorage.blob.core.windows.net/guides/f921ef80-5d14-11e8-9602-256ac3ce03b1>>. Acesso em: 19 nov. 2019.

DE MATOS, R. Calcium metabolism in birds. *Vet. Clin. Nor. Amer. Exot. Anim. Pract.* v.11, p.59-82. 2008.

DE PROSPERO, J. D.; BAPTISTA, P. P. R.; AMARY, M. F. C. *et al.* Paratireóides: estrutura, funções e patologia. *Act. Ort. Bras.* v.17, p.53-57. 2009.

DELUCA, H. F. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB Journ.*, v.2, p.224-236. 1988.

DUKES, H. H.; SWENSON, M. J. E REECE, W. O. *Dukes fisiologia dos animais domésticos.* 11^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan. 1996. p.926

EDWARDS JR, H. M.; ELLIOT, M. A.; SOONCHARERNYING, S. Effect of dietary calcium on tibial dyschondroplasia. Interaction with light, cholecalciferol, 1, 25-dihydroxycholecalciferol, protein, and synthetic zeolite. *Poult. Sci.*, v.71, p.2041-2055. 1992.

EDWARDS JR, H. M.; ELLIOT, M. A.; SOONCHARERNYING, S., *et al.* Quantitative requirement for cholecalciferol in the absence of ultraviolet light. *Poult. Sci.*, v.73, p.288-294. 1994.

EISMAN, J. A.; BOUILLON, R. Vitamin D: direct effects of vitamin D metabolites on bone: lessons from genetically modified mice. *BoneKEy rep.*, 3. 2014.

FARQUHARSON, C.; JEFFERIES, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*, v.79, p.994-1004. 2000.

GARCION, E.; WION-BARBOT, N.; MONTERO-MENEI, C. N. *et al.* New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trend. Endoc. Metab.* v.13, p.100-105. 2002.

GATTI, D. cholecalciferol: a perfect synthesis. *vitamin D – UpDates.* v.2 p.84-87. 2019.

GONZÁLEZ-CERÓN, F.; REKAYA, R.; AGGREY, S. E. Genetic analysis of bone quality traits and growth in a random mating broiler population. *Poult. Sci.*, v.94, p.883-889. 2015.

GUO, Y.; TANG H.; WANG X. *et al.* Clinical assessment of growth performance, bone morphometry, bone quality, and serum indicators in broilers affected by valgus-varus deformity. *Poult. Sci.*, v.98, p.443-4440. 2019.

HARRINGTON, E. K.; RODDY, G. W.; WEST, R. *et al.* Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide modulates growth of avian sternal cartilage via chondrocytic proliferation. *Anat. Rec. Adv. Int. Anat. Evol. Biol.* v.290, p.155-167. 2007.

HEBERT, S. C.; BROWN, E. M. The extracellular calcium receptor. *Cur. Opin. Cel. Biol.*, v.7, p.484-492. 1995.

HOLICK, M. F. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* v.92, p.49-59. 2006.

JILKA, R. L.; WEINSTEIN, R. S.; BELLIDO, T.; *et al.* Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *Journ. Clin. Invest.*, v.104, p.439-446. 1999.

JONES, G.; STRUGNELL, S. A.; DELUCA, H. F. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Phys. Rev.* v.78, p.1193-1231. 1998.

KHAN, S. H.; SHAHID, R.; MIAN, A. A. *et al.* Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. *Journ. Ani. Physiol. Anim. Nut.* v.94, p.584-593. 2010.

KOCHUPILLAI, N. The physiology of vitamin D: current concepts. *Ind. Journ. Med. Res.*, 127(3). 2008.

KUMAR, R.; BRAR, R. S.; BANGA, H. S. Hypervitaminosis d3 in broiler chicks: histopathological, immunomodulatory and immunohistochemical approach. *Iran. J. Vet. Res.*, v.18, p.170-176. 2017.

KWIECIEŃ, M.; WINIARSKA-MIECZAN, A.; MILCZAREK, A. *et al.* (2016). Effects of zinc glycine chelate on growth performance, carcass characteristics, bone quality, and mineral content in bone of broiler chicken. *Liv. Sci.*, v.191, p.43-50.

LETERRIER, C.; NYS Y. Clinical and anatomical differences in varus and valgus deformities of chick limbs suggest different aetio-pathogenesis. *Avi. Pathol.*, v.21, p.429-442. 1992.

LEYVA-JIMENEZ, H.; JAMEEL Y.; AL-AJEELI M. N. *et al.* Relative bioavailability determination of highly concentrated cholecalciferol (vitamin D3) sources employing a broiler chick bioassay. *J. Appl. Poult. Res.* v.27, p.363-370. 2018.

LEYVA-JIMENEZ, H.; KHAN, M.; GARDNER, K.; *et al.* Developing a novel oral vitamin D3 intake bioassay to re-evaluate the vitamin D3 requirement for modern broiler chickens. *Poult. Sci.*, v.98, p.3770-3776. 2019.

LI, J.; BYRNE, M. E.; CHANG, E.; *et al.* 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D hydroxylase in adipocytes. *Journ. Ster. Biochem. Mol. Biol.* v.112, p.122-126. 2008.

LONG, P. H.; LEE, S. R.; ROWLAND, G. N. *et al.* Experimental rickets in broilers: gross, microscopic, and radiographic lesions. III. Vitamin D deficiency. *Avi. Dis.*, v. 28, p.933-943. 1984.

MARCUS, R. Fármacos que afetam a calcificação e a renovação do osso: cálcio, fosfato, paratormônio, vitamina D3, calcitonina e outros compostos. *Goodman e Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ª ed. Rio de Janeiro, RJ.: Interamericana Editores. p. 1126-1146, 1996.

NAIN, S.; LAARVELD, B.; WOJNAROWICZ, C. *et al.* Excessive dietary vitamin D supplementation as a risk factor for sudden death syndrome in fast growing commercial broilers. *Compar. Bioch. Physi.*, v.148, p.828-833. 2007.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF POULTRY. 9.ed. Washington, D.C.: National Academy of Sciences, 1994. 155p.

ORBAN, J. I.; ROLAND SR, D. A.; CUMMINS, K. *et al.* Influence of large doses of ascorbic acid on performance, plasma calcium, bone characteristics, and eggshell quality in broilers and Leghorn hens. *Poult. Sci.*, v.72, p.691-700. 1993.

PEACOCK, M. Calcium metabolism in health and disease. *Clin. Journ. Amer. Soc. Nephrol.* v.5. 2010.

PEIXOTO, P. V.; KLEM, M. A.; FRANÇA, T. N. *et al.* Vitamin D poisoning in animals. *Pesq. Vet. Bras.* v.32, p.573-594. 2012.

PFEIFER, M.; BEGEROW, B.; MINNE, H. W. Vitamin D and muscle function. *Osteop. Intern.* v.13, p.187-194. 2002.

PIZAURO JÚNIOR, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Rev. Bras. Ciênc. Avic.*, p.169-186. 2002.

PRAVINA, P.; SAYAJI, D.; AVINASH, M. Calcium and its role in human body. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* v.4, p.659-668. 2013.

QIN, L., L. J. Raggatt; PARTRIDGE N. C. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrin. Met.* v.15, p.60-65. 2004.

RELATÓRIO anual 2011. UBAPEF, 2011. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/abb3e2660dca967053335727b0cf74fd.pdf>> Acessado em: 12 jan. 2020.

RELATÓRIO anual 2019. UBAPEF, 2020. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2019.pdf>> Acessado em: 12 jan. 2020.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO L. F. T.; HANNAS M. I. *et al.* *Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. Viçosa, MG.: Uni. Fed. Viç. 2017. p.488

SCHENCK, P. A.; CHEW, D. J.; NAGODE, L. A. *et al.* Disorders of calcium: hypercalcemia and hypocalcemia. *F. Elect. A. disor. Smal. Anim. Pract.* v.4, p.120-194. 2006.

SOARES JR, J. H.; KERR, J. M.; GRAY, R. W. 25-hydroxycholecalciferol in poultry nutrition. *Poult. Sci.* v.74, p.1919-1934. 1995.

SOUZA, C. S. E VIEITES F. M. Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. *Arc. Zootec.*, v.63, p.11-24. 2014.

SUDA, T.; UENO, Y.; FUJII, K. *et al.* Vitamin D and bone. *Journ. Cel. Bioch.* v.88, p.259-266. 2003.

VAN DE PEPPEL, J.; VAN LEEUWEN, J. P. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front. Physiol.* v.5, p.137. 2014.

YAMAGUCHI, M.; WEITZMANN, M. N. High dose 1, 25 (OH) 2D3 inhibits osteoblast mineralization in vitro. *Internat. Journ. Mol. Med.* v.29, p.934-938. 2012.

ZHANG, C.; LI, D.; WANG, F.; *et al.* Effects of dietary vitamin K levels on bone quality in broilers. *Arc. Ani. Nut.*, v.57, p;197-206. 2003.

ZUIDHOF, M. J.; SCHNEIDER B. L.; CARNEY V. L. *et al.* Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poult. Sci.*, v.93, p.2970-2982, 2014.

DESEMPENHO E SAÚDE ÓSSEA DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM VITAMINA D₃

Tainá S.B. Lopes*, Mariana D.C. Vasconcelos[†], Lorena S. Sousa*, Isadora M. S. Araujo*, Rogéria Serakides[‡], Leonardo J.C. Lara*, Itallo C.S Araújo*^{·1}

*Federal University of Minas Gerais, Department of Zootechnics, Belo Horizonte, MG, Brazil, [†] Vibra Group, Sete Lagoas, Brazil, [‡] Federal University of Minas Gerais, Department of Veterinary Clinic and Surgery, Belo Horizonte, MG, Brazil

¹ Autor correspondente: italloconradovet@gmail.com

RESUMO

A total of 360 one-day-old male Cobb® chicks were offered 7 dietary treatments on 2 phases with vitamin D₃ content of 0 IU / Kg in both phases; B group, 625 IU / Kg of in the initial phase and 500 IU / Kg in the growth phase, representing 25% of the inclusion used commercially; C group, 1.250 IU / Kg in the initial phase and 1.000 IU / Kg in the growth phase, representing 50% of the inclusion used commercially; D group, 1.875 IU / Kg in the initial phase and 1.500 IU / Kg in the growth phase representing 75% of the inclusion used commercially; E group, 2.500 IU / Kg in the initial phase and 2.000 IU / Kg in the growth phase, representing 100% of the inclusion used commercially. These levels was used with the purpose of evaluating the effects of reduced levels of vitamin D₃ (cholecalciferol) on the performance and bone quality of broilers up to 35 days. The experimental design was completely randomized with 5 treatments of 6 repetitions each. Chicks were distributed in 30 cages containing 12 birds each. The birds were weekly evaluated for feed intake (CR), body weight (BW), feed conversion (WC) and viability (V). At 21 and 35 days of age, a repetitive chicken was euthanized and the tibiae and femurs removed and dissected. The bones were evaluated for the percentage of dry matter (DM), mineral matter (MM), calcium (Ca), phosphorus (P), bone strength (BS) and density (D). At 35 days of age, the bones underwent histopathological evaluation for macro and microscopic morphological evaluation. For the performance variables, percentage of MM, Ca, P, and BS, there was a linear effect increasing up to the supplementation levels of approximately 25% of inclusion. In the histopathological evaluation, only the group that received a diet with 75% of the inclusion of vitamin D₃ presented bone tissue within the normal range, the other groups showed alterations compatible with osteopenia and osteopetrosis. The observed results showed that for

isonutritive diets it is not necessary to use the commercial levels currently practiced, since the reduction by up to 75% and 25% guaranteed, respectively, the zootechnical performance and bone quality during the evaluated period.

Key-Words: broiler chicken, cholecalciferol, bone quality, tibial dyscondroplasia

INTRODUÇÃO

Os intensos programas de seleção genética aplicados à cadeia avícola de corte apuram, desde meados do século XX, características fenotípicas desejáveis e que foram decisivas para o sucesso da avicultura, tais como, o rápido desenvolvimento muscular e alta eficiência alimentar (Zuidhof et al., 2014). No entanto, a pressão de seleção para alta taxa de crescimento resultou em efeito negativo sobre a qualidade óssea e também em desequilíbrio esquelético-mecânico, devido à discrepância na relação de crescimento entre o tecido muscular e o ósseo (González-Cerón et al., 2015). O aparecimento de enfermidades ósseas como a discondroplasia tibial e deformidade valgus-varys é resultado dos intensos programas de seleção genética (Guo et al., 2019). Estas enfermidades geram perdas econômicas significativas para a cadeia avícola, devido ao aumento na mortalidade durante a criação e perdas no abatedouro decorrentes da baixa qualidade óssea.

Para lidar com estes distúrbios, foram desenvolvidos programas nutricionais de alta precisão que englobam o uso de aditivos, entre eles, as vitaminas. Dentre todas as vitaminas, a Vitamina D₃ (VitD₃) possui grande relevância no metabolismo ósseo, regulando os níveis plasmáticos de cálcio (Ca). No trato gastrointestinal esta vitamina estimula a absorção de cálcio pelos enterócitos, nos rins aumenta a reabsorção de Ca no túbulo renal e mobiliza Ca ósseo. Além disso, tem papel importante no crescimento, maturação, mineralização e manutenção do tecido ósseo, prevenindo a ocorrência de desordens como o raquitismo, osteodistrofia fibrosa e discondroplasia tibial (Souza e Vieites, 2014).

A VitD₃ pode ser obtida via alimentação ou metabolizada por reação de fotólise, na qual os raios-ultravioleta induzem a produção a partir do 7-deidrocolesterol também chamado de pró-vitamina D₃ (Soares et al., 1992). Na cadeia avícola moderna é comum a construção de galpões completamente fechados, o que torna a metabolização da VitD₃ por fotólise menos comum, aumentando os riscos dos distúrbios provenientes da falta desta (Leyva-Jimenez et al., 2018). Edwards et al. (1992) realizaram estudo no qual as aves que não receberam suplementação de VitD₃ via dieta e tiveram acesso limitado a radiação ultravioleta (UV) alcançaram desempenho e qualidade óssea semelhantes aos demais tratamentos, independente do nível de suplementação. Mas as aves que não receberam suplementação e não possuíram acesso a radiação UV apresentaram pior desempenho e qualidade óssea, o que demonstra a importância dessa via metabólica para o desempenho e desenvolvimento do tecido ósseo nas aves.

De maneira geral, a VitD₃ passa por duas hidroxilações para alcançar sua forma biologicamente ativa. A primeira ocorre no fígado, onde é formada a 25-hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃ ou calcidiol) e a segunda ocorre nos rins, formando a molécula 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH)₂D₃ ou calcitriol), a forma ativa da vitamina D.

Devido à importância da VitD₃ no metabolismo animal, sua suplementação nas dietas comerciais de frango de corte tem sido utilizada para prevenção de problemas ósseos. Segundo Garcia (2012) a suplementação via alimento pode ocorrer tanto na forma do precursor colecalciferol quanto as formas mais ativas, calcitriol e sua precursora calcidiol. Os níveis de suplementação variam de acordo com a referência literária sendo que, as recomendações do Nutritional Research Council (NRC); Tabela Brasileira de Aves e Suínos e Manual da linhagem Cobb® 500 são de 200, 4.000 e 5.000 UI de VitD₃/kg de ração, respectivamente (NRC, 1994; Rostagno et al., 2017; Cobb, 2018). Contudo, a indústria trabalha com margens de segurança que podem exceder entre 5 a 10

vezes os níveis recomendados pelo NRC, com níveis próximos de 2.500 UI de VitD₃/kg de ração na fase inicial e 2.000 UI de VitD₃/kg de ração na fase de crescimento.

Entretanto, a inclusão nas fábricas de ações com níveis muito acima do recomendado pode trazer prejuízos as aves. Segundo Zanuzzi et al. (2012), a hipervitaminose D pode causar a mineralização de diversos tecidos, anorexia e perda de peso, enquanto a sua falta pode levar a perdas no desempenho e baixa mineralização da matriz óssea, quadro apresentado clinicamente como raquitismo (Cruickshank e Sim, 1987). Além do risco de surgimento de patologias e impacto no desempenho zootécnico, altas inclusões de aditivos na ração repercutem diretamente sobre o custo de produção.

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes níveis de inclusão de VitD₃ na ração de frangos de corte de 1 a 35 dias de idade, criados sob iluminação artificial, sobre o desempenho e qualidade óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram conduzidos sob aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA) sob o número 113/2018 da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aves, galpão e dieta

Foram utilizados 360 pintos de corte da linhagem Cobb®, machos, com um dia de idade. As aves foram alojadas em sala climatizada, sem a presença de janelas, contendo 30 gaiolas galvanizadas com 1m², na densidade inicial foi de 12 aves/m². Foram utilizados comedouros do tipo tubular infantil do primeiro ao sétimo de criação e após essa fase foram utilizados comedouros tipo calha. Bebedouros infantis foram utilizados até o sétimo dia, quando passaram a ser utilizados bebedouros do tipo nipple. As aves tiveram acesso *ad libidum* a água e ração durante todo o período experimental. A temperatura no nível das gaiolas foi monitorada para atender às exigências do manual da linhagem Cobb

(Cobb, 2018), iniciando com 32°C na primeira semana com redução gradual até 24°C aos 28 dias, temperatura que foi mantida até o final do experimento. O programa de iluminação utilizado foi somente a luz artificial, com lâmpadas fluorescentes marca Sylvania modelo T8 comfort, potência 32W e 4000k, em esquema de 16 horas de luz e 8 horas de escuro durante todo o período experimental.

As dietas inicial (1 a 14 dias) e crescimento (15 a 35 dias) foram formuladas de acordo com valores nutricionais dos ingredientes encontrados nas tabelas brasileiras de aves e suínos (Rostagno et al., 2017). Os níveis nutricionais foram estabelecidos de acordo com Castro et al. (2018), exceto o nível de vitamina D, que foi incluído de acordo com o tratamento estudado. A forma física utilizada em ambas as fases foi farelada (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

Ingredientes	Inicial	Crescimento
Milho	60,400	67,833
Farelo de Soja (45% PB)	30,000	23,333
Farinha de carne/ossos (40% PB)	6,360	5,333
Óleo de soja	1,800	2,000
Calcário	0,000	0,093
Sal	0,380	0,400
Suplemento mineral e vitamínico*	0,300	0,400
DL-Metionina (98%)	0,350	0,300
L-Lisina HCL (98%)	0,270	0,250
L-Treonina	0,140	0,056
Total	100	100
Níveis nutricionais		
EM, kcal/kg	3,028	3,122
Proteína Bruta, %	21,96	18,928
Extrato Etéreo, %	5,20	5,450
Cálcio, %	0,94	0,825
P disp, %	0,048	0,410
Sódio, %	0,21	0,212
Lisina dig. aves, %	1,216	1,024
Metionina dig. aves, %	0,636	0,556
Met + Cis dig. aves, %	0,91	0,799
Treonina dig. aves, %	0,827	0,657

Triptofano dig. aves, %	0,213	0,177
-------------------------	-------	-------

* Suplemento Vitamínico Mineral (inicial) contém por kg: Vit. A 9.000 UI, Vit. E 14 mg, Vit. K3 2 mg, Vit. B1 2.5 mg, Vit. B2 6.2 mg, Vit. B6 4 mg, Vit. B12 14 mcg, Niacina 40 mg, Ácido Fólico 1 mg, Ácido Pantotênico 15 mg, Se 0,2 mg, I 1.2 mg, Fe 50 mg, Cu 10 mg, Mn 80, Zn 60 mg, Finase 500 FTU, Halquinol 0,03g, MNGrow 0,5g, BHT 0,1 g. Suplemento Vitamínico Mineral (crescimento) contém por kg: Vit. A 7.000 UI, Vit. E 11 mg, Vit. K3 1.6 mg, Vit. B1 1.6 mg, Vit. B2 4.5 mg, Vit. B6 2.2 mg, Vit. B12 10 mcg, Niacina 32 mg, Ácido Fólico 0.8 mg, Ácido Pantotênico 12 mg, Se 0.2 mg, I 1.2 mg, Fe 50 mg, Cu 10 mg, Mn 80, Zn 60 mg, Finase 500 FTU, Halquinol 0,03g, Salinomicina 0,066g, BHT 0,1 g

Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) no qual as aves foram divididas aleatoriamente em 5 tratamentos, com 6 repetições cada, sendo uma dieta sem inclusão de VitD3 e o restante com inclusão de 25; 50; 75 ou 100% da recomendação de Rostagno et al. (2017): Dieta A – Controle, sem inclusão de VitD3; Dieta B - com 25% da inclusão utilizada comercialmente de VitD3 (625 UI/kg na fase inicial e 500 UI/kg na fase de crescimento); Dieta C - com 50% da inclusão de VitD3 utilizada comercialmente (1.250 UI/kg na fase inicial e 1.000 UI/kg na fase crescimento); Dieta D - com 75% da inclusão de VitD3 utilizada comercialmente (1.875 UI/kg na fase inicial e 1.500 UI/kg na fase de crescimento) e Dieta E – com 100% da inclusão de VidD3 utilizada comercialmente (2.500 UI/kg na fase inicial e 2.000 UI/kg na fase de crescimento).

Desempenho

Foram avaliadas as variáveis: consumo de ração (CR), peso médio corporal (PC), conversão alimentar (CA) e viabilidade (V) nos períodos de 1-7; 1-14; 1-21; e 1-35 dias.

Parâmetros Ósseos

Aos 21 e aos 35 dias de idade, uma ave por repetição, selecionada pelo peso médio \pm 10% de variação deste, foi eutanasiada por deslocamento cervical. O fêmur esquerdo e direito e tibia esquerda e direita foram retirados, dissecados e os tecidos aderentes foram removidos. Em seguida, o peso (g) e o comprimento (cm) da tibia direita foram

mensurados, utilizando-se balança analítica e paquímetro universal de aço de carbono 0.02MM/.001” 150mm/6”. Logo após, a tíbia direita foi alocada em saco plástico e congelada para posterior análise de percentual de matéria seca (%MS), matéria mineral (%MM), cálcio (%Ca) e fósforo (%P) segundo metodologia de AOAC (2012). O fêmur esquerdo foi utilizado para análise de força máxima à quebra, por ensaio biomecânico, utilizando máquina universal modelo EMIC DL 300, em teste de flexão de três pontos, com célula de carga de 2000N. Os valores de força de resistência à quebra determinada pela força máxima foram gravados e armazenados por software Instron Series IX. Também foi avaliado o Índice Sedor, definido pela relação entre o peso e comprimento ósseo para mensuração da densidade óssea de acordo com metodologia proposta por Sedor et al. (1991) e adaptada por Monteagudo et al. (1997).

Avaliação Histopatológica da Tibia

Após dissecação, as tíbias esquerdas retiradas aos 35 dias de idade foram fixadas em formalina a 10% neutra e tamponadas por 48 horas, descalcificadas em ácido fórmico 21% por um período de 30 dias (reposição do ácido será a cada 2 dias). Em seguida as amostras foram processadas conforme técnica rotineira de inclusão em parafina, submetidos à microtomia com cortes de 3 µm, corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). As secções foram avaliadas quanto à histomorfologia por microscopia óptica. Em seguida as secções foram fotografadas com câmera digital Spot Color Insight acoplada a um microscópio Olympus BX-40, utilizando o programa Image Pro Plus® versão 4.6.

Estatística

Para todas as avaliações de desempenho produtivo, a média da gaiola contendo 12 aves foi considerada a unidade experimental em todos os períodos avaliados. Para as variáveis de qualidade óssea a ave foi considerada unidade experimental. Os resultados

obtidos foram submetidos à três modelos de regressão ($P < 0,05$): o modelo quadrático descrito por Robbins et al. (1979), o modelo exponencial descrito por Noll e Waibel (1989) e o modelo de retas segmentadas ou *Linear Response Plateau* (LRP) descrito por Braga (1992), conforme o melhor ajustamento obtido para cada variável estudada. Para a análises foi utilizado o Software R (2016).

RESULTADOS

Desempenho

O desempenho dos pintos de um a sete dias não foi influenciado pelos níveis de VitD₃ ($P > 0,05$). Para o desempenho das outras fases estudadas, houve efeito do nível de inclusão de VitD₃ para todas as variáveis ($P < 0,05$).

O consumo de ração apresentou efeito linear crescente para 14 (Figura 2), 21 (Figura 3) e 35 (Figura 4) dias com efeito de 0,0026 kg; 0,0177 kg e 0,0929 kg até as doses de 26,53% ($R^2 = 0,65$); 25,51% ($R^2 = 0,95$) e 24,98% ($R^2 = 0,98$) do nível recomendado, respectivamente. A partir do nível destes níveis de suplementação o comportamento do consumo de ração manteve-se uniforme em 0,523 kg; 1,248 kg e 3,668 kg para 14, 21 e 35 dias respectivamente.

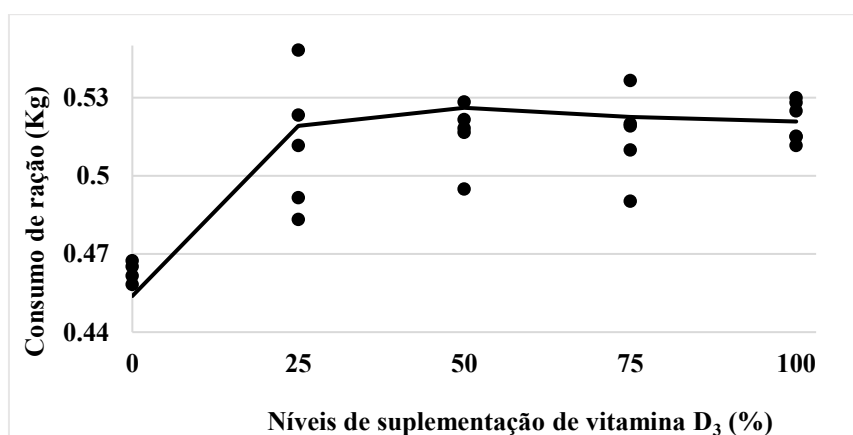


Figura 2. Efeito linear positivo, até o nível de 26,53% do recomendado, ($Y = 0.4538664 + 0.002612009; X \geq 26,53; Y = 0.5231; R^2 = 0,65; P < 0,05$). Em níveis acima deste o consumo de ração nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 14 dias de idade estabilizou-se em 0,523 kg.

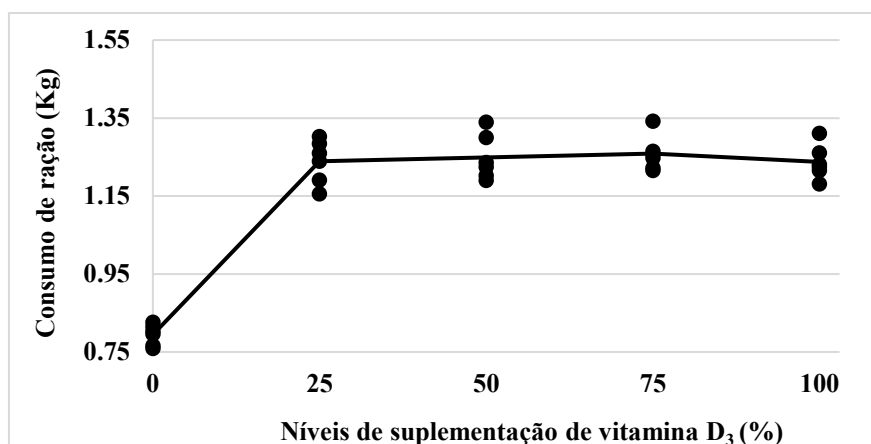


Figura 3. Efeito linear positivo, até os níveis de 25,51% do recomendado, ($Y = 0,7945041 + 0,0177865x$; $X \geq 25,51$; $Y = 1,248$; $R^2 = 0,95$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o consumo de ração nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade manteve-se uniforme em 1,248 kg.

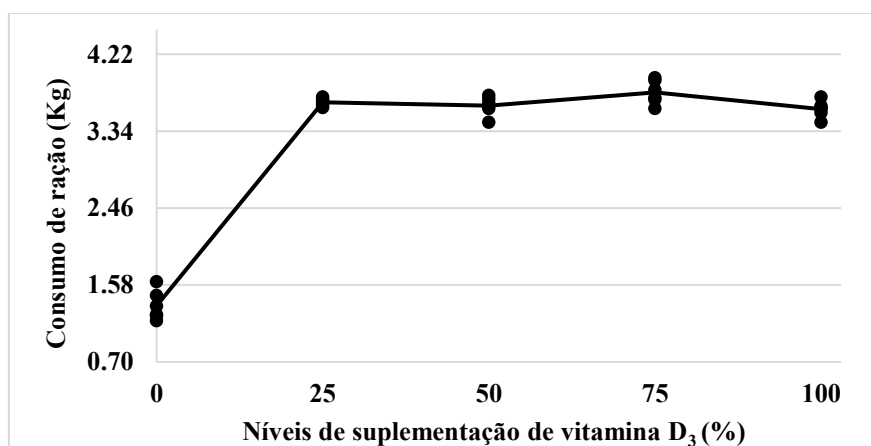


Figura 4. Efeito linear positivo, até os níveis de 24,98% ($Y = 1,342833 + 0,092973333x$; $X \geq 24,98$; $Y = 3,668$; $R^2 = 0,98$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o consumo de ração nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 3,668 kg

Para peso corporal houve efeito linear crescente nas fases de 14 (Figura 5), 21 (Figura 6) e 35 dias (Figura 7), com efeito de 0,0035 kg; 0,0178 kg e 0,0736 kg até as doses de 25,83% ($R^2 = 0,74$); 25,88% ($R^2 = 0,96$) e 24,90% ($R^2 = 0,99$) do recomendado, respectivamente. A partir destes níveis de suplementação o comportamento do peso corporal manteve-se uniforme em 0,4892 kg; 1,0443 kg e 2,5471 kg para 14, 21 e 35 dias, nesta ordem.

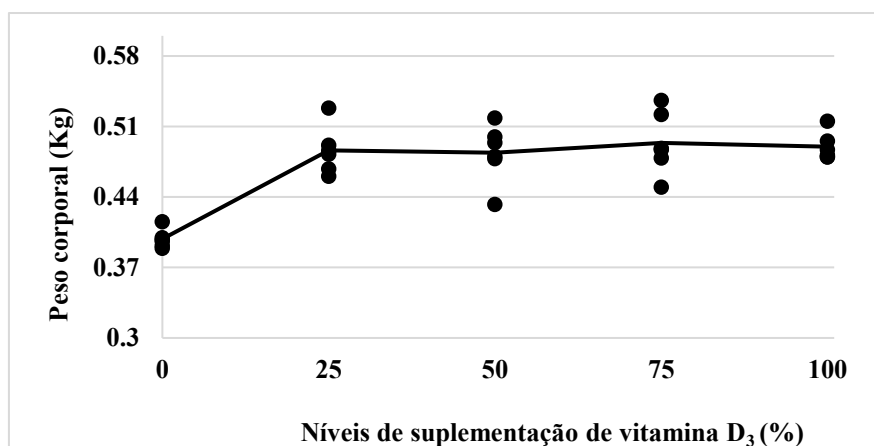


Figura 5. Efeito linear positivo, até a dose de 25,83% do recomendado ($Y = 0,3983157 + 0,003518874x$; $X \geq 25,83$; $Y = 0,489$; $R^2 = 0,74$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso corporal em relação aos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 14 dias se estabilizou em 0,489 kg.

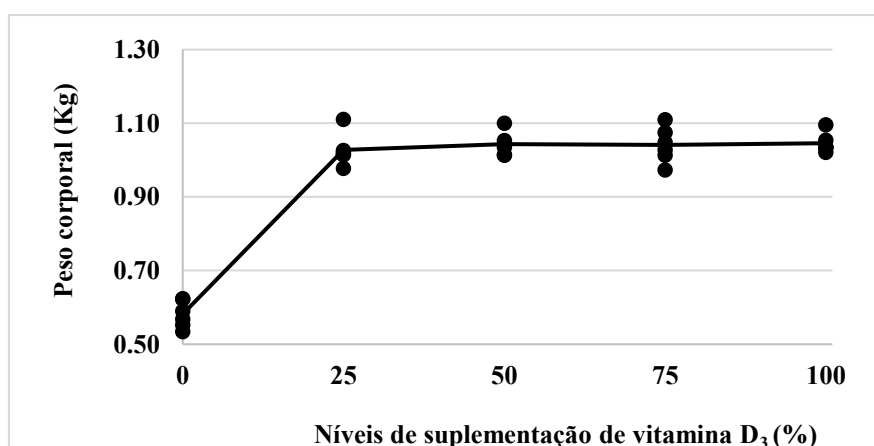


Figura 6. Efeito linear positivo, até os níveis de 25,88% do recomendado ($Y = 0,5818434 + 0,01783293x$; $X \geq 25,88$; $Y = 1,0443$; $R^2 = 0,96$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso corporal em relação aos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade se estabilizou em 1,0443 kg.

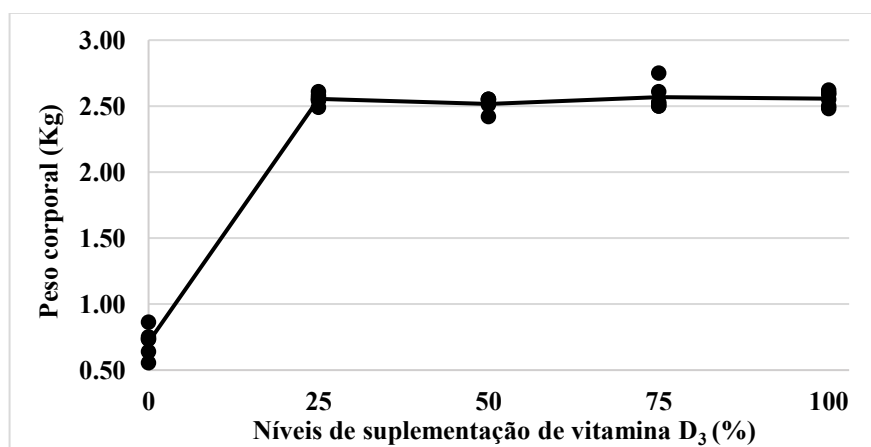


Figura 7. Efeito linear positivo até os níveis de 24,90% do recomendado ($Y = 0,7124537 + 0,07366882x$; $X \geq 24,89$; $Y = 2,547$; $R^2 = 0,99$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso corporal em relação aos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade se estabilizou em 2,547 kg.

Houve efeito linear decrescente para conversão alimentar em todas as fases observadas. Aos 7 (Figura 8), 14 (Figura 9), 21 (Figura 10) e 35 dias (Figura 11) houve efeito linear decrescente de 0,0025; 0,003; 0,0068; 0,0189 até as doses de 42,64% ($R^2 = 0,25$); 23,88% ($R^2 = 0,31$); 25,32% ($R^2 = 0,77$) e 24,76% do recomendado ($R^2 = 0,88$), respectivamente. A partir destes níveis de suplementação o comportamento da conversão alimentar manteve-se em 1,02; 1,0266; 1,1511 e 1,3961 para 7, 14, 21 e 35 dias, nesta ordem.

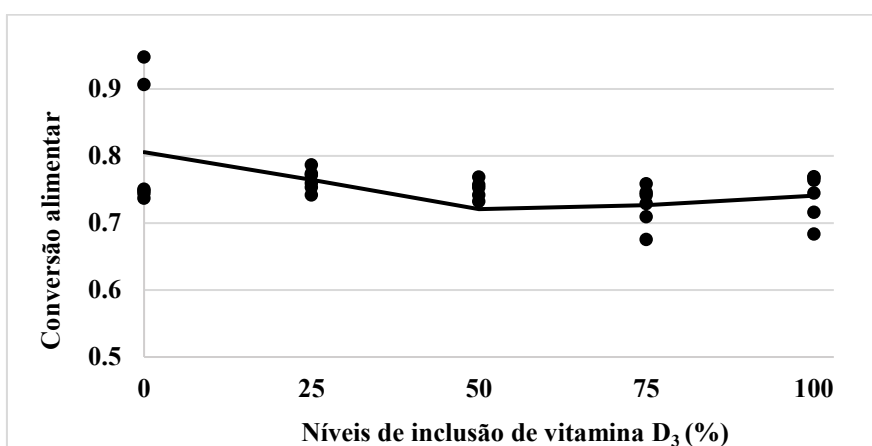


Figura 8. Efeito linear negativo até os níveis de 43% do recomendado ($Y = 1,1305556 - 0,00253333x$; $X \geq 42,64$; $Y = 1,02$; $R^2 = 0,25$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 7 dias de idade se estabilizou em 1,02.

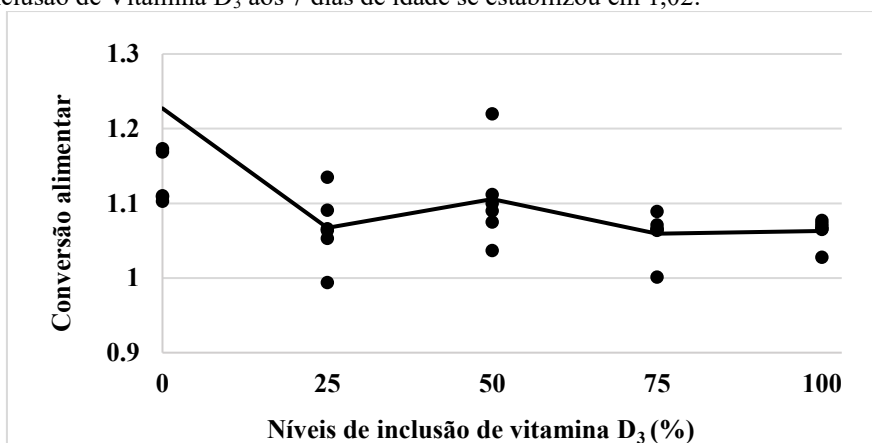


Figura 9. Efeito linear negativo até os níveis de 23,88% do recomendado ($Y = 1,0983333 - 0,003x$; $X \geq 23,88$; $Y = 1,0266$; $R^2 = 0,31$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 14 dias de idade se estabilizou em 1,0266.

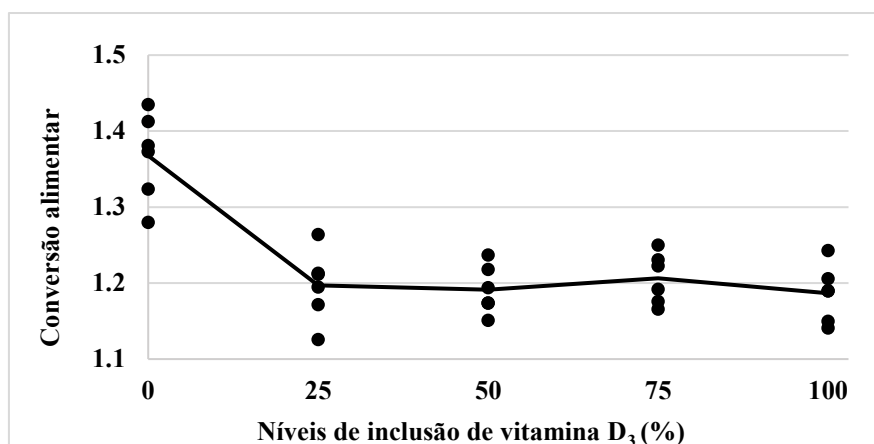


Figura 10. Efeito linear negativo até os níveis de 25,32% do recomendado ($Y = 1,325 - 0,00686667x$; $X \geq 25,32$; $Y = 1,151$; $R^2 = 0,77$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade estabilizou-se em 1,151.

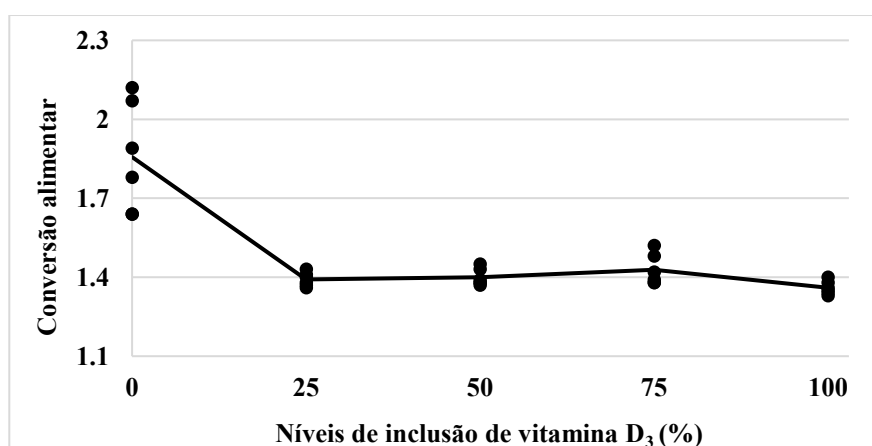


Figura 11. Efeito linear negativo até os níveis de 24,76% ($Y = 1,85667 - 0,0189x$; $X \geq 24,76$; $Y = 1,3961$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a conversão alimentar nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade se estabilizou em 1,3961.

A viabilidade aos 35 dias (Figura 12) foi influenciada pelos níveis de VitD₃ ($P < 0,05$). Houve efeito linear crescente de 1,48% até a dose de 24,08% do recomendado ($R^2 = 0,84$). Em níveis de acima deste, a viabilidade estabilizou-se em 97,24%.

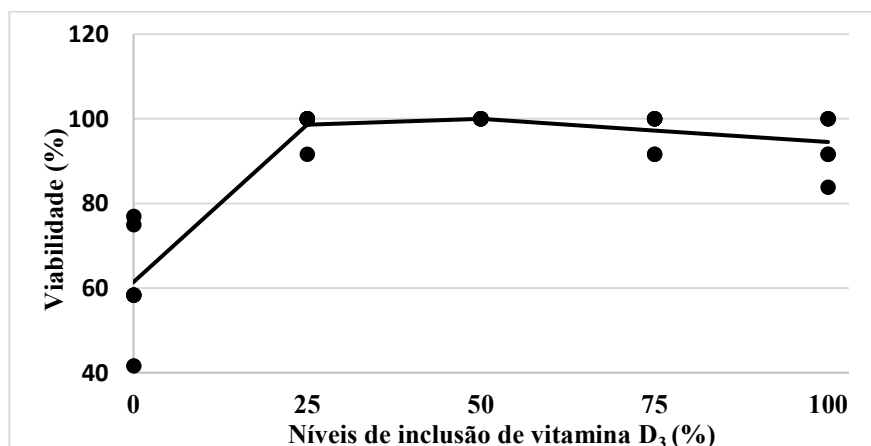


Figura 12. Efeito linear positivo até o nível de 24,08% do recomendado ($Y = 61,42 + 1,4872x$; $X \geq 24,08$; $Y = 97,24$; $R^2 = 0,84$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a viabilidade nos diferentes níveis de inclusão de vitamina D₃ aos 35 dias de idade manteve-se uniforme 97,24%.

Parâmetros Ósseos

O peso da tíbia aos 21 dias (Figura 13) foi influenciado pelos níveis de VitD3 ($P < 0,05$), houve efeito linear crescente de 0,91g; até a dose de 20,02% ($R^2 = 0,46$). Em níveis de suplementação acima deste, o peso da tíbia manteve-se uniforme em 27,51g. Aos 35 dias (Figura 14) houve efeito linear crescente de 2,37g até a dose de 17,77% ($R^2 = 0,40$), em níveis acima deste o comportamento do peso da tíbia manteve-se uniforme em 67,88g.

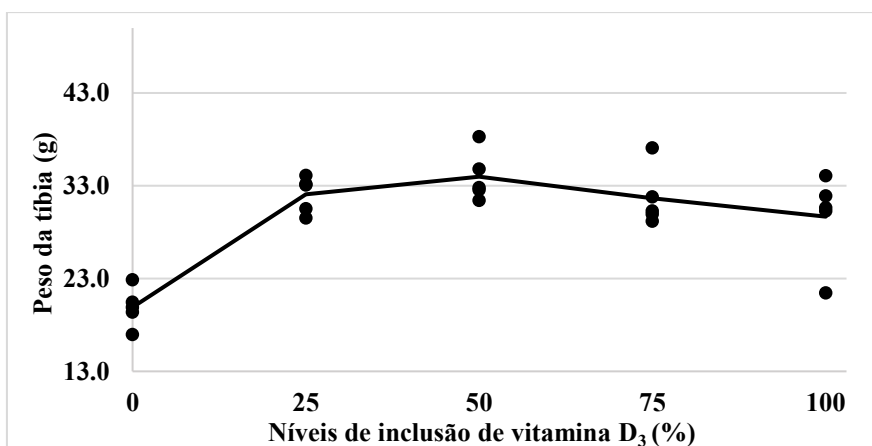


Figura 13. Efeito linear positivo até os níveis de 20,02% ($Y = 9,1554 + 0,916928x$; $X \geq 20,02$; $Y = 27,51$; $R^2 = 0,46$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso da tíbia nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade estabilizou-se em 27,51g.

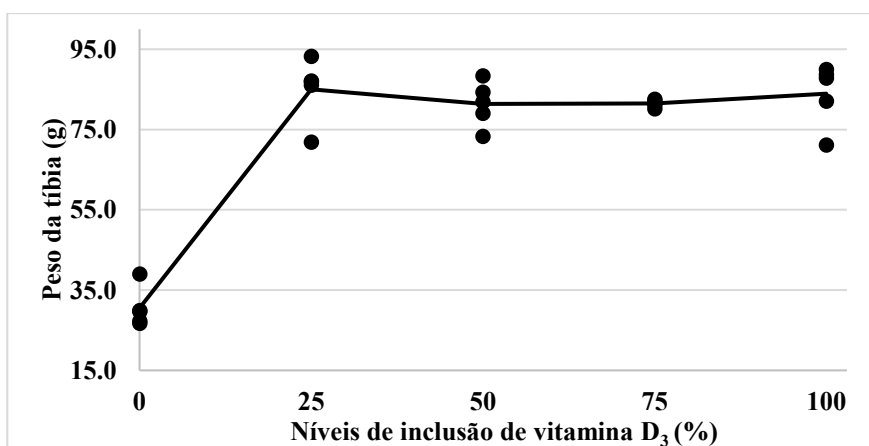


Figura 14. Efeito linear positivo até a dose de 17,77% do recomendado ($Y = 25,7066 + 2,372496x$; $X \geq 17,77$; $Y = 67,88$; $R^2 = 0,40$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o peso da tíbia nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 67,88g.

O percentual de matéria seca aos 21 dias e 35 dias não apresentaram comportamento que se enquadrasse nos modelos de regressão testados.

Aos 21 dias o percentual de matéria mineral apresentou efeito linear crescente ($P < 0,05$), de 0,5948% até a dose de 26,08% do recomendado ($R^2 = 0,88$) (Figura 15). Em níveis acima deste, a resposta manteve-se uniforme em 41,81%. Aos 35 dias o percentual de matéria mineral apresentou efeito linear crescente ($P < 0,05$) de 0,2696% até a dose de 28,85% do recomendado ($R^2 = 0,71$) (Figura 16). Em níveis acima deste, o comportamento da resposta se manteve em 38,09% de Matéria Mineral.

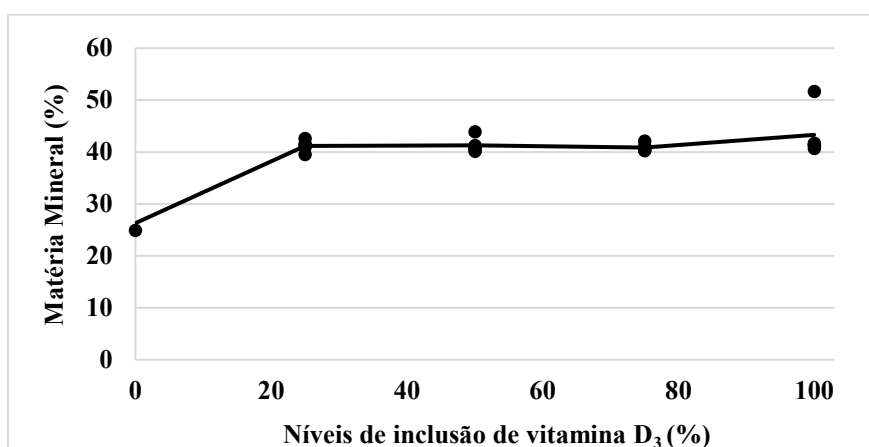


Figura 15. Efeito linear positivo até os níveis de 26,08% do recomendado ($Y = 26,296 + 0,59488x$; $X \geq 26,08$; $Y = 41,81$; $R^2 = 0,88$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de matéria mineral nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade estabilizou-se em 41,81%.

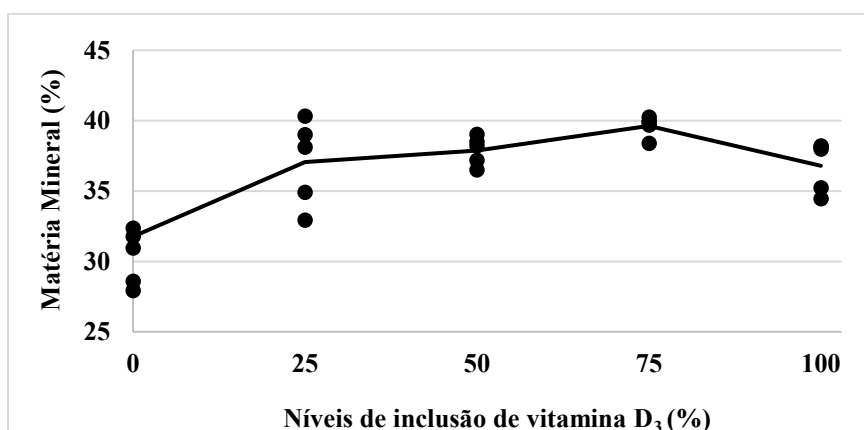


Figura 16. Efeito linear positivo até os níveis de 28,85% do recomendado ($Y = 30,316 + 0,26968x$; $X \geq 28,85$; $Y = 38,09$; $R^2 = 0,71$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de matéria mineral nos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 38,09%.

Quanto ao percentual de cálcio aos 21 dias, houve efeito crescente ($P < 0,05$), de 0,4744% até a dose de 19,26% ($R^2 = 0,68$) do recomendado (Figura 17). Em níveis acima deste, o comportamento da variável manteve-se uniforme em 19,84%. Aos 35 dias houve efeito linear positivo ($P < 0,05$), de 0,1786% até a dose de 48,81% ($R^2 = 0,26$) (Figura 18). Para níveis mais altos, a resposta se estabilizou em 18,09% de Ca.

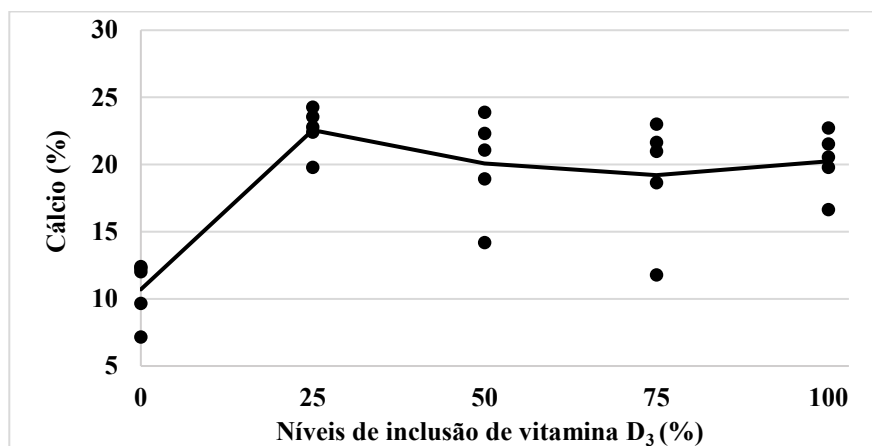


Figura 17. Efeito linear positivo até o nível de 19,26% do recomendado ($Y = 10,7 + 0,47448x$; $X \geq 19,26$; $Y = 19,84$; $R^2 = 0,68$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de cálcio nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade se manteve uniforme em 19,84%.

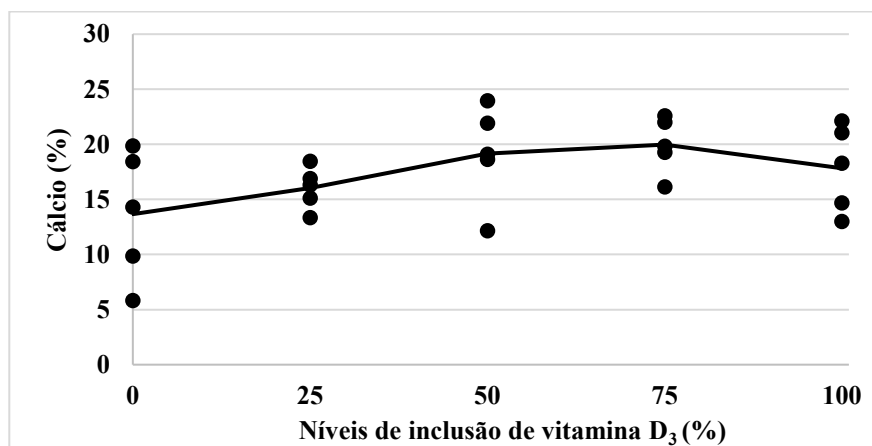


Figura 18. Efeito linear positivo até o nível de 48,81% do recomendado ($Y = 13,53767 + 0,10988x$; $X \geq 48,81$; $Y = 18,90$; $R^2 = 0,26$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de cálcio nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade se manteve uniforme em 18,09%.

A variável percentual de fósforo apresentou efeito linear crescente para 21 (Figura 19) e 35 dias (Figura 20) com efeito de 0,176% e 0,065% até as doses de 19,12% ($R^2 = 0,66$) e 38,76% ($R^2 = 0,46$) do recomendado, respectivamente. A partir destes níveis de

suplementação o comportamento da variável manteve-se uniforme em 4,28% e 4,04% para 21 e 35 dias, na devida ordem.

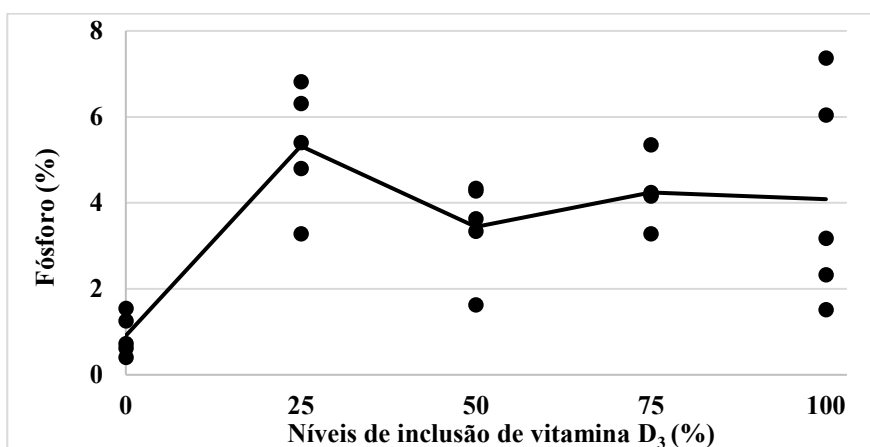


Figura 19. Efeito linear positivo até o nível de 19,12% do recomendado ($Y = 0.904 + 0.17648x$; $X \geq 19.12$; $Y = 4.28$; $R^2 = 0,66$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste percentual de fósforo aos 21 dias estabilizou-se em 4,28 %.

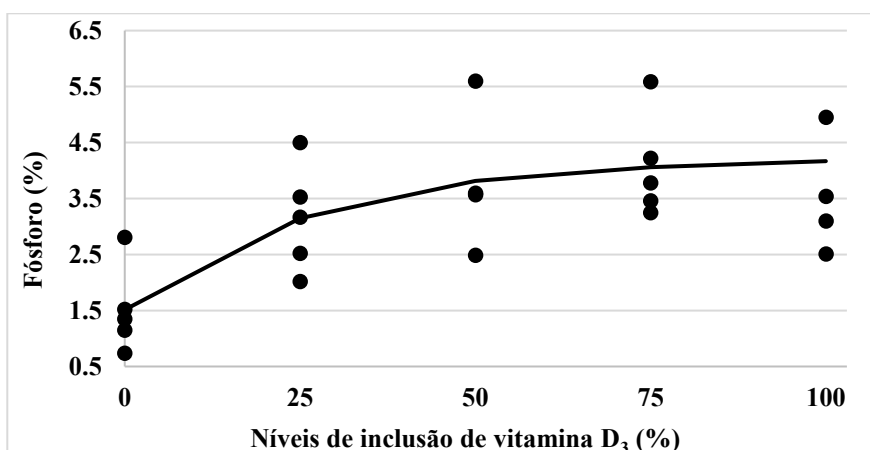


Figura 20. Efeito linear positivo até o nível de 38,76% do recomendado ($Y = 1.514 + 0.06536x$; $X \geq 38.76$; $Y = 4.04$; $R^2 = 0,46$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o percentual de fósforo aos 35 dias manteve-se uniforme em 4,04%.

A força de resistência à quebra aos 21 (Figura 21) e 35 (Figura 22) dias foram influenciadas pelos níveis de VitD₃ ($P < 0,05$). Houve efeito linear crescente de 0,57% e 0,91% até a dose de 21,31% ($R^2 = 0,87$) e 27,03% ($R^2 = 0,80$) do recomendado, na devida ordem. Em níveis de inclusão acima deste, o comportamento manteve-se uniforme em 15,83% e 30,62%.

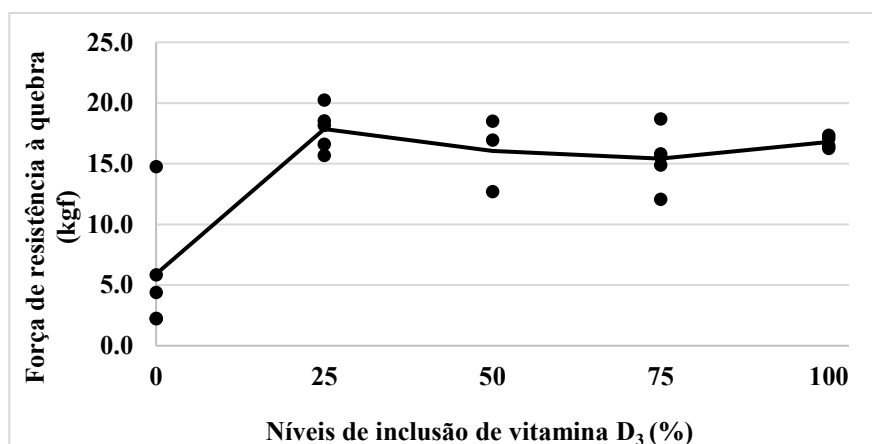


Figura 21. Efeito linear positivo, até o nível de 21,31% ($Y = 3.6875 + 0,57x$; $X \geq 21,31$; $Y = 15,83$; $R^2 = 0,87$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a força de resistência à quebra nos níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 21 dias de idade manteve-se uniforme em 15,83.

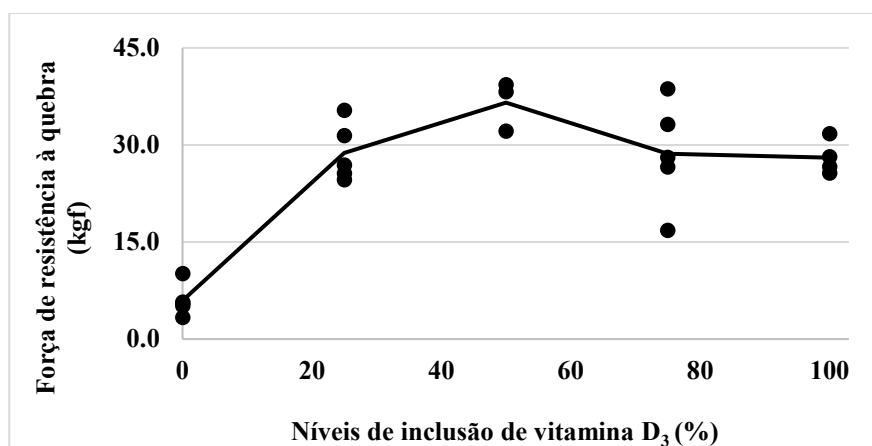


Figura 22. Efeito linear positivo até o nível de 27,03% ($Y = 5,946 + 0,9128x$; $X \geq 27,03$; $Y = 30,62$; $R^2 = 0,80$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste a força de resistência à quebra nos diferentes níveis de inclusão de Vitamina D₃ aos 35 dias de idade estabilizou-se em 30,62%.

O índice de Seedor aos 21 dias (Figura 23) foi influenciado pelos níveis de VitD₃ ($P < 0,05$), houve efeito linear crescente de 0,54 até a dose de 26,46% do recomendado ($R^2 = 0,61$). Em níveis acima deste, o índice de seedor estabilizou-se em 115,76. Na avaliação aos 35 dias (Figura 24) houve efeito linear crescente de 2,21 até a dose de 26,34% do recomendado ($R^2 = 0,82$). Em níveis superiores, índice de seedor manteve-se uniforme em 209,36.

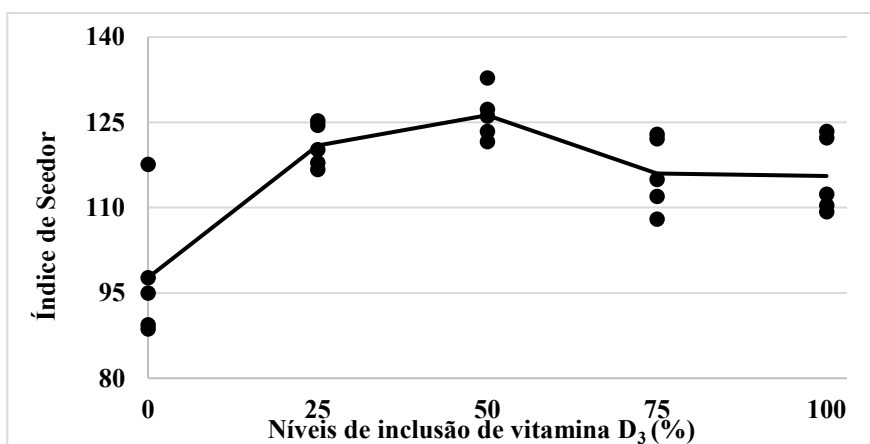


Figura 23. Efeito linear positivo até o nível de 26,46% do recomendado ($Y=100.6692+0.540852x$; $X \geq 26.43$; $Y = 115.76$; $R^2 = 0,61$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o índice de seedor aos 21 dias manteve-se uniforme em 115,76.

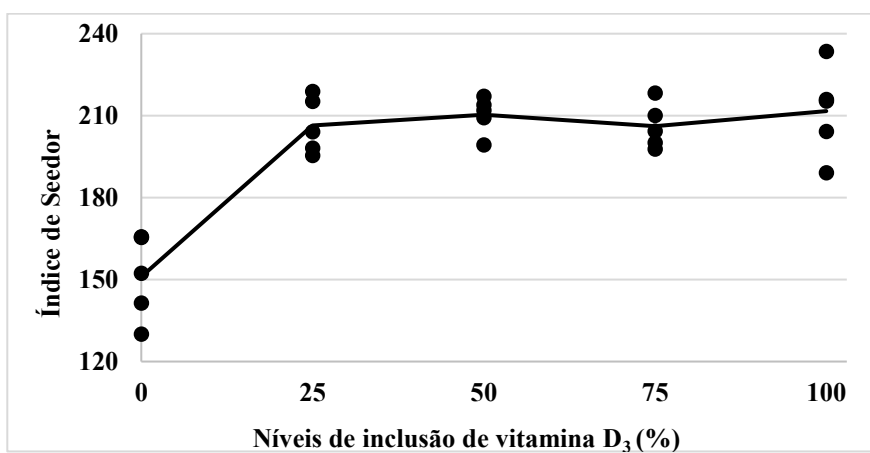


Figura 24. Efeito linear positivo até o nível de 26,34% do recomendado ($Y = 15.024 + 2.21488x$; $X \geq 26.34$; $Y = 209.36$; $R^2 = 0,82$; $P < 0,05$). Em níveis acima deste o índice de seedor aos 35 dias estabilizou-se em 209,36.

Análise Macroscópica das tíbias

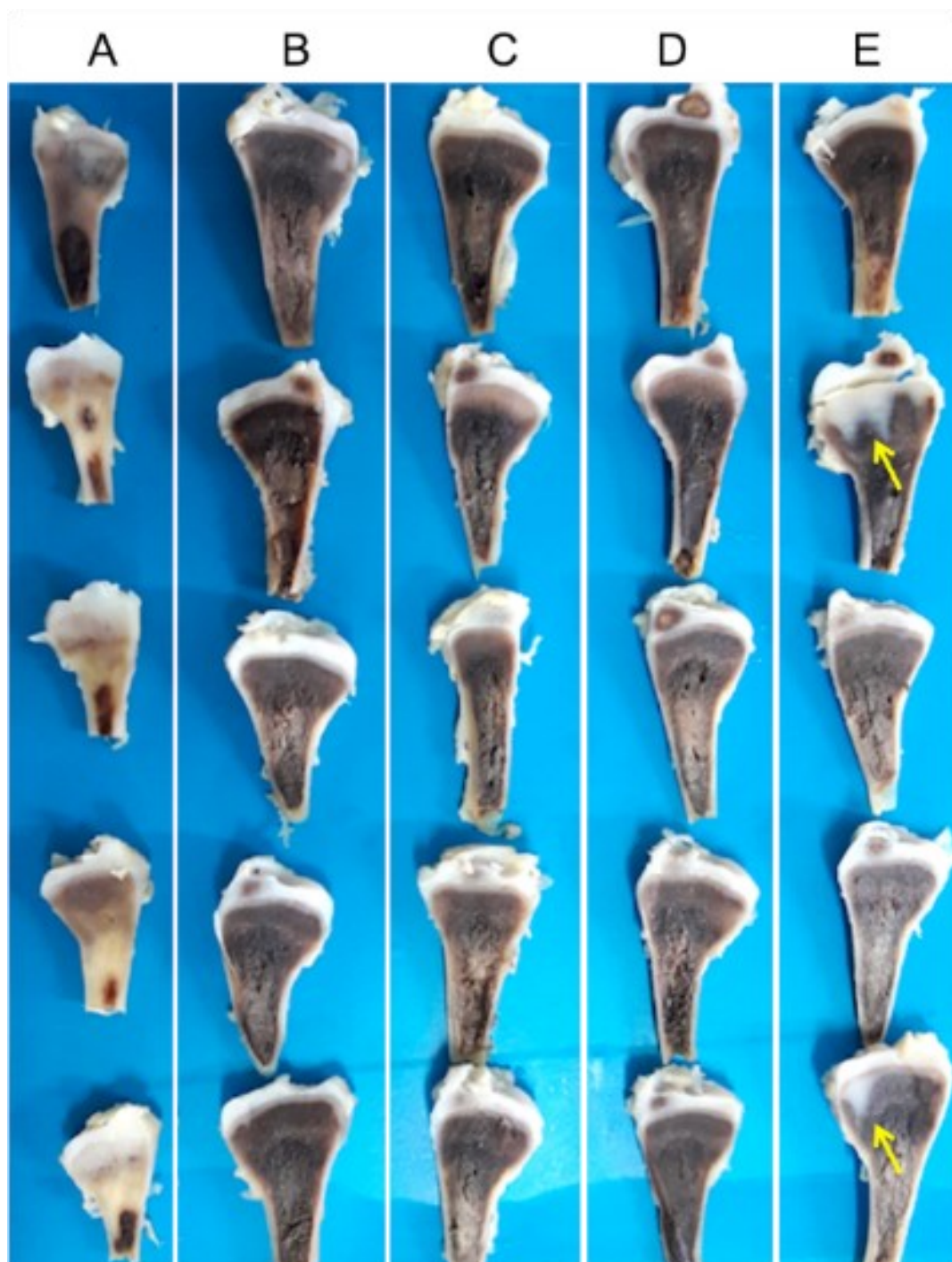


Figura 25. Corte longitudinal da tíbia de frangos de corte com 35 dias de idade, após descalcificação. Grupo A sem suplementação com vitamina D, Grupo B com 500 UI/Kg de ração, Grupo C com 1.000 UI/Kg de ração, Grupo D 1.500 UI/Kg de ração e Grupo E com 2.000 UI/Kg de ração. Segunda e quinta tíbias do Grupo E, de cima para baixo, com ilhas de tecido cartilaginoso (setas).

Ao exame macroscópico após descalcificação, observa-se o Grupo A com tíbias menores em relação aos demais grupos, sem centros de ossificação secundários e com

grande parte da tíbia constituída por tecido esbranquiçado, possivelmente tecido cartilaginoso. Grupos B, C e D com tíbias aparentemente semelhantes e grupo E com exceção à segunda e quinta tíbias, de cima para baixo, com ilhas de tecido cartilaginoso adentrando a metáfise, característica de discondroplasia tibial.

Análise Histopatológica das tíbias

As tíbias dos frangos do grupo A, sem suplementação com Vitamina D₃, apresentavam alterações histológicas compatíveis com raquitismo, osteodistrofia fibrosa generalizada e osteocondrose (discondroplasia tibial). A epífise das tíbias era totalmente cartilaginosa e sem a formação dos centros de ossificação secundários. A placa epifisária apresentava-se espessa, irregular, com poucos e estreitos canais vasculares, com condrócitos pouco diferenciados e sem distinção entre as zonas. A zona hipertrófica apresentava-se estreita ou até mesmo inexistente na maior parte da placa epifisária, como sinal de falha da maturação celular. Em vários pontos da placa epifisária, estava presente uma placa óssea terminal distal, como sinal de interrupção do crescimento endocondral. Em alguns locais, a cartilagem adentrava a metáfise e apresentava condrócitos com núcleos picnóticos e lacunas vazias de condrócitos, como característica de degeneração e necrose individual das células, respectivamente (Figura 26A).

Nas metáfises e diáfises, as trabéculas ósseas, presentes em número reduzido, apresentavam-se delgadas, fragmentadas, pouco mineralizadas e desalinhadas. Havia ainda acúmulo de osteóide nas margens de várias trabéculas e também por entre elas. As trabéculas apresentavam osteócitos com núcleos volumosos e alojados em lacunas alargadas, como característica de intensa osteólise osteocítica. Havia também grande quantidade de osteoclastos, vários deles alojados na margem trabecular, dentro de lacunas de Howship, como característica de intensa osteoclasia. As trabéculas ósseas eram revestidas, na sua maioria, por mais de uma camada de osteoblastos que apresentavam

núcleo volumoso. Havia ainda vários focos de hiperplasia osteoblástica de permeio a fibroblastos. A presença de tecido cartilaginoso no centro das trabéculas (coração condróide), comum em animais na fase de crescimento, era praticamente inexistente nestes ossos (Figura 26A’).

A cortical apresentava-se adelgada, imatura, pouco mineralizada e predominantemente formada por tecido trabecular, com raros ósteons primários. Havia locais de descontinuidade da cortical e com proliferação de tecido conjuntivo fibroso a partir do perióstio (Figura 26A’’).

As tíbias dos animais do grupo B, com suplementação de 500 UI de Vitamina D₃/Kg de ração, apresentavam alterações histológicas compatíveis com osteodistrofia fibrosa generalizada.

Ao contrário do grupo A, o centro de ossificação secundário estava presente, embora, grande parte da epífise ainda fosse cartilaginosa. A placa epifisária apresentava condrócitos pouco diferenciados e sem distinção entre as zonas. A zona hipertrófica apresentava-se estreita ou até mesmo inexistente na maior parte da placa epifisária, como sinal de falha da maturação celular (Figura 26B).

Nas metáfises e diáfises, as trabéculas ósseas, presentes em número reduzido, apresentavam-se delgadas, fragmentadas, desalinhas, porém mais mineralizadas em comparação ao grupo A.

As trabéculas apresentavam osteócitos com núcleos volumosos e alojados em lacunas alargadas, como característica de intensa osteólise osteocítica. Havia menos osteoclastos dentro de lacunas de Howship, em comparação ao grupo A. As trabéculas ósseas eram revestidas, na sua maioria, por mais de uma camada de osteoblastos que apresentavam núcleo volumoso e algumas delas apresentavam no centro, resquícios de cartilagem (coração condróide). Havia ainda vários focos de hiperplasia osteoblástica (Figura 26B’).

A cortical apresentava-se adelgada, imatura e predominantemente formada por tecido trabecular, sem a presença de ósteons. Havia locais de descontinuidade da cortical com proliferação de tecido conjuntivo fibroso a partir do periósteo (Figura 26B”).

As tíbias dos animais do grupo C, com suplementação de 1.000 UI de Vitamina D₃/Kg de ração, apresentavam alterações histológicas compatíveis com osteodistrofia fibrosa generalizada e osteocondrose (discondroplasia tibial). Ao contrário do grupo A, neste grupo, o centro de ossificação secundário estava presente e grande parte da epífise já era substituída por tecido ósseo. No entanto, a placa epifisária embora com melhor diferenciação em comparação aos grupos A e B, ainda apresentava zona hipertrófica estreita. Em alguns locais, a cartilagem adentrava a metáfise e apresentava condrócitos com núcleos picnóticos, como característica de degeneração celular (Figura 26C”).

À semelhança do grupo B, a cortical apresentava-se adelgada, imatura e predominantemente formada por tecido trabecular, sem a presença de ósteons. Havia locais de descontinuidade da cortical, com proliferação de tecido conjuntivo fibroso a partir do periósteo (Figura 26C”).

As tíbias dos animais do grupo D, com suplementação de 1.500 UI de Vitamina D₃/Kg de ração, não apresentavam alterações. A epífise apresentava centro de ossificação secundário e grande parte dela já era substituída por tecido ósseo com trabéculas coalescentes e de espessura normal. A placa epifisária apresentava-se uniforme, bem diferenciada, com grande quantidade de canais vasculares e zona hipertrófica espessa (Figura 21D). Abaixo da placa epifisária, na área correspondente à esponjosa primária, e em toda a metáfise e diáfise, as trabéculas ósseas apresentavam-se coalescentes, alinhadas e mineralizadas. No centro das trabéculas, os osteócitos apresentavam núcleos volumosos e estavam alojados em lacunas alargadas. Na periferia da trabécula, os osteócitos eram pequenos com lacunas estreitas, como sinal de osteólise osteocítica dentro da normalidade. As trabéculas estavam, na sua maioria, revestidas por uma camada de

osteoblastos, ora com núcleo grande ovalado, ora com núcleo fusiforme. Raros osteoclastos foram observados (Figura 26D'). Ao contrário dos grupos anteriores, a cortical era espessa, contínua e com grande quantidade de ósteons (Figura 26D'').

As tíbias dos animais do grupo E, com suplementação de 2.000 UI de Vitamina D₃/Kg de ração, ou seja, com 100% da dose comercial de vitamina D₃, apresentavam alterações histológicas compatíveis com osteopetrose e osteocondrose (discondroplasia tibial).

A epífise apresentava centro de ossificação secundário e grande parte dela já era substituída por tecido ósseo com trabéculas coalescentes e de espessura normal. A placa epifisária apresentava-se irregular, diferenciada em alguns pontos, com invasão vascular regular e indiferenciada em outros locais. Nestes pontos de indiferenciação, a cartilagem da placa epifisária adentrava a metáfise e apresentava condrócitos com núcleos picnóticos e lacunas vazias de condrócitos, como característica de degeneração e necrose individual das células, respectivamente (Figura 26E).

Abaixo da placa epifisária, na área correspondente à esponjosa primária e na metáfise, as trabéculas ósseas apresentavam-se espessas, coalescentes, alinhadas e mineralizadas. Mas em alguns locais de tecido ósseo trabecular, havia aumento da quantidade de osso, com formação de estruturas semelhantes a ósteons, como característica de osteopetrose. Na diáfise, havia tecido osteônico dentro do canal medular (enostose). Os osteócitos eram, na sua maioria, pequenos e alojados em lacunas estreitas, como característica de inibição da osteólise osteocítica. Havia também focos de osteócitos com núcleo picnótico, como característica de degeneração celular. As trabéculas estavam, na sua maioria, revestidas por uma ou mais camadas de osteoblastos, ora com núcleo grande ovalado, ora com núcleo fusiforme. No centro de algumas trabéculas, havia aumento do número e do tamanho dos corações condróides, como característica de inibição da condrólise osteocítica (Figura 26E').

À semelhança do grupo D, a cortical era espessa, contínua e com grande quantidade de ósteons. Mas diferente do grupo D, havia tecido osteônico dentro do canal medular ligado à cortical como característica de osteopetrose (Figura 26E”).

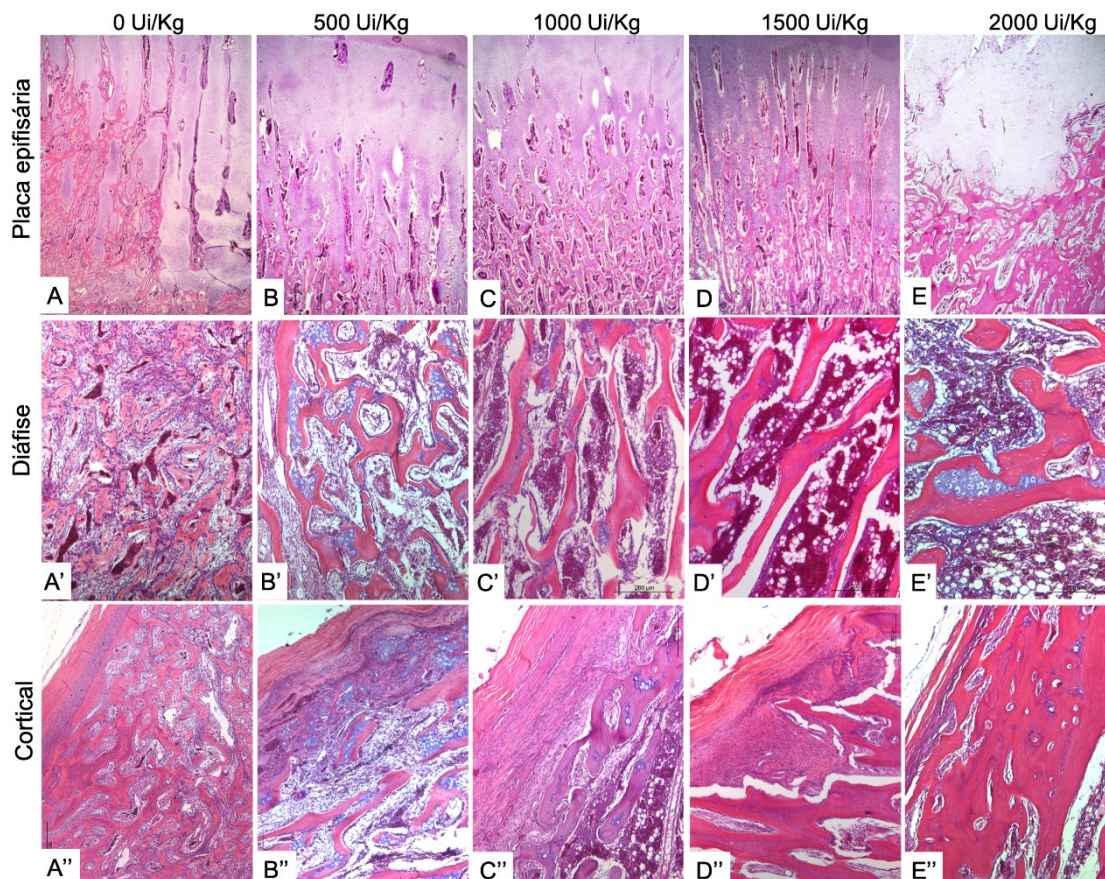


Figura 26. Microscopia eletrônica da tíbia de frangos de corte aos 35 dias de idade. De (A) a (E) região da epífise óssea dos tratamentos A, B, C, D e E, respectivamente, em aumento de 12,5x. De (A') a (E') região da diáfise dos tratamentos A, B, C, D, e E, na devida ordem, em aumento de 25x. De (A'') a (E'') região da cortical dos tratamentos A, B, C, D e E, nesta ordem, em aumento de 50x. HE.

DISCUSSÃO

As respostas encontradas para desempenho na primeira semana divergem de estudo realizado anteriormente por Baker et al. (1998), que reportaram aumento linear do ganho de peso e consumo na primeira semana em relação à inclusão de VitD3 em dietas deficientes em Fósforo (P). Os resultados de desempenho encontrados nesta fase podem ter ocorrido devido à capacidade de transferência de VitD3 das matrizes para a progênie, como reportado por Atencio et al. (2005). Os mesmos verificaram que, os níveis de

suplementação de VitD₃ na dieta das matrizes influenciaram o desempenho da progênie até a segunda semana de idade. Somado a isto, têm-se as dietas isonutritivas fornecida aos animais, que garantiram os níveis de Cálcio (Ca) e P.

De forma geral, as aves do grupo sem suplementação de VitD₃ ainda que tenham recebido dieta que atendesse as exigências, exceto para VitD₃, apresentaram pior desempenho de 8 a 35 dias, em relação aos demais grupos (Figuras 2 a 11). Esse achado concorda com trabalho realizado por Han et al. (2017) em que o grupo controle, sem adição de VitD₃ apresentou pior desempenho. Além disto, este grupo apresentou sintomas como letargia, depressão, inapetência, penas arrepiadas e maior mortalidade.

De acordo com Leyva-Jimenez et al. (2018) quando as aves estão aptas a sintetizar a VitD₃ a partir da luz solar, não é comum ocorrer quadros de hipovitaminose D. Visto que no presente estudo as aves não tiveram acesso à luz natural sendo, portanto, a via de metabolização de VitD₃ na pele menos ativa. Os resultados demonstram que, mesmo em situações de acesso ao alimento balanceado, as aves que têm restrição de radiação UV necessitam de suplementação de VitD₃ em doses de até 625 UI/kg de ração.

Os resultados obtidos para o desempenho do 8^o ao 35^o dia também demonstraram que, a partir da dosagem de 25% da dosagem utilizada comercialmente ou seja, 625 UI/kg de ração, não são observadas diferenças significativas para estas respostas, isto é, níveis mais altos de suplementação de VitD₃ não melhoram o desempenho dos frangos de corte. Estes resultados corroboram com estudo realizado por Leyva-Jimenez et al. (2019) que ao realizarem bioensaio utilizando níveis de suplementação de 0; 50; 100; 200; 400; 800; 1.600 e 3.200 UI de VitD₃ /Kg e observaram que, apesar do nível de exigência variar de acordo com a resposta testada e também do modelo de regressão utilizado para análise, níveis acima de 201 UI de VitD₃/Kg de ração e 285 UI de VitD₃/Kg de ração não

proporcionaram melhores resultados para desempenho e qualidade óssea respectivamente.

No entanto, alguns trabalhos apontam resultados contrários ao observado (Khan et al., 2010; Brito et al., 2010; Gómez-Verduzco et al., 2013). Brito et al. (2010) ao estudarem o efeito dos níveis de colecalciferol e 25-hidroxicolecalciferol em dietas deficientes em Ca e P para frangos de corte de 1 a 45 dias, encontraram efeito linear positivo para variáveis de desempenho na fase de 1 a 21 dias, independente da fonte. Porém, este efeito não se estendeu ao longo do período de criação. Com base nos resultados apresentados neste trabalho contrastado aos dados da literatura, pode-se afirmar que para desempenho zootécnico, quando os níveis de Ca e P da dieta atingem a exigência dos animais, não se torna necessário utilizar os níveis de VitD₃ praticados comercialmente.

Han et al. (2017) ao avaliarem a qualidade óssea em frangos que receberam dietas com níveis fixados para Ca e P com duas fontes de VitD₃ (Calcifediol e 1 α -hydroxycalciferol) em níveis (), encontraram maiores respostas de PT, %Ca, %P e %MM nos grupos que receberam maiores níveis de suplementação de VitD₃, independente da fonte. Resultados semelhantes não foram observados no presente estudo, uma vez que as respostas de PT (Fig. 13 e 14), %MM (Fig. 15 e 16), %Ca (Fig. 17 e 18), %P (Fig. 19 e 20) e responderam positivamente até níveis de inclusão de próximos de 25% do utilizado comercialmente (625 UI de VitD₃/Kg) e níveis acima deste não afetaram as respostas, ou seja, a adição de VitD₃ não proporcionou melhoras na qualidade óssea, exceto em relação aos grupos sem inclusão de VitD₃.

Os achados histopatológicos observados neste trabalho evidenciam a importância da VitD₃ para diferenciação e maturação celular, e conseqüentemente, na prevenção de patologias ósseas. O raquitismo, discondroplasia tibial e osteodistrofia fibrosa, alterações

caracterizadas pela osteopenia, foram visualizadas nos animais dos grupos com níveis de inclusão abaixo de 75% em relação aos níveis utilizados comercialmente, enquanto alterações caracterizadas pela osteopetrose foram visualizadas no grupo que recebeu 100% de inclusão de VitD₃ ut

O raquitismo é uma patologia caracterizada pela expansão da zona de proliferação da placa epifisária e falha na mineralização óssea que pode ser causada pela falta de Ca ou vitamina D. A principal consequência é a maturação irregular da placa epifisária, causando deformidades ósseas (Serakides et al., 2011).

As alterações visualizadas nos animais do grupo A podem ser explicadas pelo estudo realizado por Hasky-negev et al. (2008). Ao utilizar marcadores celulares para evidenciar a expressão de proteínas de superfície nos condrócitos de aves com 0 UI de VitD₃/Kg de ração estes autores determinaram que a hipovitaminose D impede a expressão de proteínas de superfície indutoras da diferenciação dos condrócitos e que permitem a penetração de vasos sanguíneos na epífise impedindo, portanto, a diferenciação dos condrócitos e a mineralização da placa epifisária. No entanto, ocorre a expressão de proteínas de superfície proliferativas, como o colágeno tipo II, causando o aumento da zona proliferativa e redução da zona hipertrófica, achados presentes neste grupo (Figura 26), portanto, mesmo em condições ideais de fornecimento de Ca e P as aves que não recebem o aporte de vitamina D desenvolvem problemas ósseos, principalmente após a primeira semana de vida.

No entanto, com exceção do Grupo B que apresentou apenas osteodistrofia fibrosa, a associação de múltiplas patologias provenientes da deficiência nutricional de VitD₃ foram observadas nos grupos A, C e E. A osteodistrofia fibrosa é uma doença metabólica caracterizada por quadros de osteopenia, e pode ocorrer em conjunto ao raquitismo e discondroplasia tibial, como visualizado nos grupos A e C. Histologicamente

esta alteração é identificada pela ocorrência de hiperplasia osteoclástica com comprometimento da formação das trabéculas ósseas, que ficam adelgadas, descontínuas e desalinhadas. Além disto, visualiza-se grande quantidade de células com características fibroblásticas na diáfise óssea (Uhl., 2018).

Baixos níveis séricos de VitD₃, impactam sobre uma das principais vias de absorção de Ca dietético. Esta vitamina possui a capacidade de se ligar aos receptores de vitamina D (VDR) presentes nos enterócitos, onde estimula a expressão de proteínas responsáveis pela captação do cálcio presente no trato gastrointestinal. A baixa captação de Ca leva à quadros de hipocalcemia (Castro, 2011). Situação essa que, por sua vez, ativa receptores das células C da paratireóide, causando aumento da excreção de Paratormônio (PTH). Quando os níveis de Ca sérico não são normalizados ocorre a manifestação do hiperparatireoidismo secundário nutricional (HPS).

Durante quadros de HPS, o PTH atua sobre o tecido ósseo, onde é capaz mediar a osteoclastogênese de forma indireta. Este hormônio estimula e inibe a expressão de dois sinalizadores moleculares produzidos pelos osteoblastos. O primeiro deles, a proteína ativadora do receptor do fator nuclear ligante κ B (RANKL), que sob seu estímulo, se liga ao seu receptor (RANK) presente nas células hematopoiéticas progenitoras de osteoclastos, resposta bioquímica para diferenciação celular. Por outro lado, o PTH inibe a produção de osteoprotegerina (OPG), proteína responsável por se ligar à RANKL impedindo a junção desta ao RANK, e conseqüentemente, prevenindo a hiperplasia osteoclástica (Qin et al., 2004). Portanto, possivelmente por esta via, ocorreu a hiperplasia osteoclástica vista nos animais dos grupos A, B e C.

Outro ponto importante é que, nas aves, a vitamina D atua diretamente sobre as células mesenquimais, se ligando aos receptores VDR e incentivando a diferenciação destas em osteoblastos. A expressão destes receptores nas células mesenquimais e

osteoblastos, é regulada pela presença da própria VitD₃ em sua forma ativa, e outros fatores como os hormônios glicocorticoides e o fator de crescimento transformador- β (Van de Peppel, 2014). Portanto, a baixa disponibilidade da VitD₃ que ocorreu nos animais dos grupos A, B e C, levaram à baixa expressão do receptor VDR e explica a presença de células indiferenciadas, com características fibroblásticas nas aves dos grupos A, B e C, como caracteristicamente visualizado nas aves com ostedistrofia fibrosa.

Estudos sobre o metabolismo do Ca realizados anteriormente (Long et al., 1984), demonstraram a concomitância do raquitismo e osteodistrofia fibrosa em quadros de hiperparatireoidismo em frangos de corte. No entanto, são escassos os relatos de estudos envolvendo a fisiopatologia do HPS em aves de produção e, durante a realização deste estudo, não foram encontrados estudos envolvendo diferentes níveis de suplementação de VitD₃ causando alterações tanto de baixa formação e mineralização óssea quanto excesso de mineralização óssea como os visualizados neste trabalho. Desta forma, o presente estudo traz novas informações acerca dessas patologias ósseas nas aves de produção.

Além das já citadas, outra alteração visualizada em todos os grupos, exceto nas aves do tratamento B e D, é a discondroplasia tibial. Esta doença caracteriza-se por baixa vascularização e falha na diferenciação das células da cartilagem de crescimento, e pode ser causada por diversos fatores, como alterações nos níveis de Ca, VitD₃ dietéticos e o rápido crescimento (Thorp e Loveridg, 1993).

A VitD₃ por intermédio do receptor VDR presente nos condrócitos, regula o metabolismo celular, mais precisamente a diferenciação e arranjo dos condrócitos durante a ossificação endocondral (Wang et al., 2014). Somado a isto, como já mencionado, a baixa nos níveis plasmáticos de Ca estimulam a secreção do PTH pelas glândulas paratireoides. Durante longos períodos de elevação sérica deste hormônio, há ação nos condrócitos presentes na epífise óssea com inibição da diferenciação celular sendo

portanto, um fator de determinante para a ocorrência da discondroplasia tibial (Zuschik et al., 2002; Liu et al., 2012). Assim, de modo direto e indireto, a VitD₃ atua no mecanismo de ocorrência da discondroplasia tibial.

No entanto este quadro pode estar relacionado tanto a sub quanto a superalimentação, ocorrendo em animais que recebem dietas com níveis elevados de Ca, P, VitD₃, entre outros. As consequências da superalimentação são a discondroplasia tibial e a diminuição da reabsorção óssea levando à osteopetrose por maior deposição mineral no tecido ósseo (Serakides, 2011), sendo esta última patologia observada no grupo E.

Diferente do presente estudo, Khan et al. (2010) em pesquisa realizada para avaliar os efeitos da suplementação de 200, 1.500, 2.500 e 3.500 UI de colecalciferol/Kg de ração, observaram menor percentual de incidência de discondroplasia tibial no grupo que recebeu dieta com níveis de 3.500 UI de Vitamina D₃/Kg de ração. Por outro lado, trabalhos utilizando a técnica *in vitro* com adição de vitamina D sobre cultura de células mesenquimais identificaram que, doses elevadas de vitamina D podem causar inibição da diferenciação celular, comprometendo a qualidade óssea (Chen et al., 2012; Yamaguchi e Weitzeman, 2012).

O resultado de PT pode ser associado à avaliação macroscópica das tíbias aos 35 dias. Nota-se que apenas o grupo A que teve acesso a dieta sem inclusão de vitamina D₃ apresentou ossos menores em relação aos demais grupos, o que corresponde aos resultados obtidos para PT onde, doses de VitD₃ até 17,7% nesta fase, proporcionaram respostas positivas sobre PT.

Os resultados observados para índice de Seedor neste trabalho indicam que a suplementação com VitD₃ acima 26% do recomendado, não altera a massa e volume ósseo. No entanto, quanto ao conteúdo mineral ósseo, aos 35 dias de idade, o requerimento é mais alto como demonstrado pelos resultados de %Ca e %P nesta fase.

O comportamento desta variável advém provavelmente, do pouco conteúdo mineral resultante das alterações metabólicas que levaram tanto a maior reabsorção da matriz óssea, quanto a menor deposição e mineralização desta, que podem ser visualizadas ao exame histopatológico dos grupos sem inclusão de VitD₃ e dos grupos com inclusão de 25% e 50% do recomendado. Nesta avaliação, percebe-se o aumento da mineralização do osteóide, que ocorreu de forma progressiva até a inclusão de 75% dos níveis utilizados comercialmente pois, os animais do Grupo D foram os únicos com ossos característicos de animais saudáveis, e por este ponto de vista, com a melhor saúde óssea.

Estudos indicam que a força de resistência à quebra (FRQ) do fêmur dos frangos de corte melhora quando níveis mais altos de suplementação de VitD₃ são utilizados (Rao et al., 2008; Khan et al., 2010). Contudo, os resultados de FRQ aos 35 dias de idade encontrados neste trabalho demonstram que, a suplementação de vitamina D₃ tem efeito positivo sobre esta resposta até níveis próximos de 27% do recomendado, sem efeitos positivos em níveis acima deste, em conformidade com os resultados de estudos que avaliaram a resistência óssea de frangos de corte com níveis reduzidos de VitD₃ (Castro et al., 2018; Leyva-Jimenez et al., 2019).

Além disto, o resultado de FRQ corrobora parcialmente com os achados histopatológicos que, apesar de verificar o aumento gradual da mineralização, o desenvolvimento das trabéculas formando labirintos e o espessamento da camada cortical, características de ossos com maior resistência, demonstraram que o grupo que recebeu os maiores níveis de suplementação apresentou alterações histopatológicas presentes também no grupo que recebeu 0 UI de Vitamina D₃/Kg de ração indicando que, em dietas com níveis adequados de Ca e P, o nível de suplementação de 100% do recomendado pode causar efeitos adversos sobre a qualidade óssea, sem proporcionar efeitos significativos sobre a força de resistência à quebra.

Nota-se que os níveis de exigência quanto à vitamina D₃ na dieta dos frangos de corte variam de acordo com o aspecto considerado. Baseado nos fatores de desempenho zootécnico e qualidade óssea, reduções de até 75% em relação aos níveis comerciais são capazes de proporcionar máximo desempenho e qualidade óssea em frangos criados em ambiente fechado. No entanto, do ponto de vista histopatológico, reduções acima de 25% dos níveis corriqueiramente utilizados podem ocasionar o aparecimento de patologias ósseas. Apesar disto, os resultados aqui demonstrados evidenciam que para dietas isonutritivas não se torna necessário utilizar os níveis comerciais atualmente praticados, pois a redução em até 75% e 25% garantiram, respectivamente, o desempenho zootécnico e saúde óssea durante o período avaliado.

REFERÊNCIAS

- Atencio, A., H. M. Edwards Jr, and G. Pesti. 2005. Effects of vitamin D₃ dietary supplementation of broiler breeder hens on the performance and bone abnormalities of the progeny. *Poult. Sci.*, v.84: 1058-1068.
- Baker, D. H., R. R. Biehl, and J. L Emmert. 1998. Vitamin D₃ requirement of young chicks receiving diets varying in calcium and available phosphorus. *Br. Poult. Sci.*, 39: 413-417.
- Braga, J. M. (1992). Avaliação da fertilidade do solo: ensaios de campo. UFV.
- Brito, J. Á. G., A. G. Bertechini, É. J. Fassani, P. B. Rodrigues, E. M. C. Lima, and C. Meneghetti. 2010. Efeito da vitamina D₃ e 25-hidroxi-colecalciferol sobre o desempenho, o rendimento de carcaça e a morfologia intestinal de frangos de corte. *R. Bras. Zootec.*, 39:2656-2663.

Castro, F. L. D. S., N. C. Baião, R. Ecco, M. J. Q. Louzada, É. D. F. Melo, M. M. Saldanha, and L. J. C. Lara. 2018. Effects of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and reduced vitamin D3 level on broiler performance and bone quality. *R. Bras. Zootec.*, 47.

Castro, L. C. G. D. 2011. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*v.55: 566-575.

Chen, Y. C., T. Ninomiya, A. Hosoya, T. Hiraga, H. Miyazawa, and H. Nakamura. 2012. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits osteoblastic differentiation of mouse periodontal fibroblasts. *Arch oral biol*, 57: 453-459.

Cobb. (2018). Suplemento de nutrição e desempenho do frango de corte. Disponível em: <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/99b0cf062c/61bd2490-56d1-11e9-bfbd-7963ec6b06e5.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2019.

Cruickshank, J. J. and J. S. Sim. 1987. Effects of excess vitamin D3 and cage density on the incidence of leg abnormalities in broiler chickens. *Avian dis.*, 332-338.

Edwards Jr., H. M., M. A. Elliot, and S. Sooncharernying. 1992. Effect of dietary calcium on tibial dyschondroplasia. Interaction with light, cholecalciferol, 1, 25-dihydroxycholecalciferol, protein, and synthetic zeolite. *Poult. Sci.*, 71: 2041-2055.

Garcia, A.F.Q.M. 2012. Utilização de Vitamina D e seus metabólitos na alimentação de frangos de corte. Dissertação de Mestrado. Univ. Estad. Mar., Paraná.

Gómez-Verduzco, G., R. Morales-López, and E. Avila-Gozález. 2013. Use of 25-hydroxycholecalciferol in diets of broiler chickens: effects on growth performance, immunity and bone calcification. *J. Poult. Sci.*, 50: 60-64.

González-Cerón, F., R. Rekaya, and S. E. Aggrey. 2015. Genetic analysis of bone quality traits and growth in a random mating broiler population. *Poult. Sci.*, 94: 883-889.

- Guo, Y., H. Tang, X. Wang, W. Li, Y. Wang, F. Yan, and R. Han. 2019. Clinical assessment of growth performance, bone morphometry, bone quality, and serum indicators in broilers affected by valgus-varus deformity. *Poult. Sci.*, 98:443-4440
- Han, J. C., G. H. Chen, J. L. Zhang, J. G. Wang, H. X. Qu, Y. F. Yan, and Y. H. Cheng. 2017. Relative biological value of 1α -hydroxycholecalciferol to 25-hydroxycholecalciferol in broiler chicken diets. *Poult. Sci.*, 96: 2330-2335.
- Hasky-Negev, M., S. Simsa, A. Tong, O. Genina, and E. Monsonego Ornan, 2008. Expression of matrix metalloproteinases during vascularization and ossification of normal and impaired avian growth plate. *J. anim. Sci.*, 86: 1306-1315.
- Khan, S. H., R. Shahid, A. A. Mian, R. Sardar, and M. A. Anjum. 2010. Effect of the level of cholecalciferol supplementation of broiler diets on the performance and tibial dyschondroplasia. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94: 584-593.
- Latimer, G. E., and W. Horwitz. 2012. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, (19 th ed.) Canada: *AOAC*.
- Leterrier, C., and Y. Nys. 1992. Clinical and anatomical differences in varus and valgus deformities of chick limbs suggest different aetio-pathogenesis. *Avian Pathol.*, 21: 429-442.
- Leyva-Jimenez, H., Y. Jameel, M. N. Al-Ajeeli, A. M. Alsadwi, R. A. Abdaljaleel, and C. A. Bailey. 2018. Relative bioavailability determination of highly concentrated cholecalciferol (vitamin D₃) sources employing a broiler chick bioassay. *Journal of App. Poult. Res.*, 27: 363-370.
- Leyva-Jimenez, H., M. Khan, K. Gardner, R. A. Abdaljaleel, Y. AL-Jumaa, A. M. Alsadwi, and Bailey, C. A. 2019. Developing a novel oral vitamin D₃ intake bioassay to

re-evaluate the vitamin D3 requirement for modern broiler chickens. *Poult. sci.*, 98: 3770-3776.

Noll, S. L., and P.E. Waibel. 1989. Lysine Requirements of Growing Turkeys in Various Temperature Environments. *Poult. Sci.*, 68: 781–794.

NRC - National Research Council. 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Qin, L., L. J. Raggatt, and N. C. Partridge. 2004. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrin. Met.* v.15: 60-65.

R DEVELOPMENT core team: a language and environment for statistical computing. Version 3.4.4. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

Rao, S. V. R., Raju, M. V. L. N., Panda, A. K., Saharai, P. N., Reddy, M. R., Sunder, G. S., & Sharma, R. P. 2008. Effect of surfeit concentrations of vitamin D3 on performance, bone mineralization and mineral retention in commercial broiler chicks. *J Poult Sci*,45: 25-30.

Robbins, K. R., H. W. Norton, and D. H. Baker. 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. nut.*, 109:1710-1714.

Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, M. I. Hannas, J. L. Donzele, N. K. Sakomura, F. G. Perazzo, and C. O. Brito. 2017. Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. P. 1-488. Dept. Zootec. Univ. Fed. Viç. Viçosa, MG.

Sakkas, P., S. Smith, T. R. Hill, and I. Kyriazakis. 2018. A reassessment of the vitamin D requirements of modern broiler genotypes. *Poult. Sci.*, 98: 330-340.

- Serakides, R. 2011. Ossos e articulações. Pages 647-696 in *Patologia veterinária*. A. C. Alessi and R. L. Aantos, ed. Roca, São Paulo, Brasil.
- Soares Jr, J. H., J. M. Kerr, and R. W. Gray. 1995. 25-hydroxycholecalciferol in poultry nutrition. *Poult. Sci.*, 74: 1919-1934.
- Souza, C. S., and F. M. Vieites. 2014. Vitamina D3 e seus metabólitos para frangos de corte. *Arc. Zootec.*, 63: 11-24.
- Thorp, B. H., C. Farquharson, A. P. L. Kwan, and N. Loveridge. 1993. Osteochondrosis/dyschondroplasia: a failure of chondrocyte differentiation. *Equine Vet. J.* v.25(S16): 13-18.
- Toyoda, T., K. Ochiai, M. Komatsu, T. Kimura, and T. Umemura. 2004. Nutritional secondary hyperparathyroidism and osteodystrophia fibrosa in a Hodgson's hawk-eagle (*Spizaetus nipalensis*). *Avian pathol.* v.33: 9-12.
- Uhl, E. W. 2018. The pathology of vitamin D deficiency in domesticated animals: an evolutionary and comparative overview. *Intern. J. Paleopat.*, v.23: 100-109.
- Van de Peppel, J., and J. P. Van Leeuwen. 2014. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front. Physiol.*, v.5: 137.
- Vieites, F. M., R. P. Nalon, A. L. Santos, P. A. C. Branco, C. S. Souza, R. V. Nunes, and N. V. M. De Arruda. 2014. Performance, carcass and noble cuts yield of broilers fed diets supplemented with *Solanum glaucophyllum*. *Semina: Ciênc. Agr.*, 35: 1617-1626.
- Wang, Y., J. Zhu, and H. F. DeLuca. 2014. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone. *J Bone Miner Res*, 29: 685-692.

Yamaguchi, M., and, M. N. Weitzmann. 2012. High dose 1, 25 (OH) 2D3 inhibits osteoblast mineralization in vitro. *Int. j. mol. Med.*, v.29: 934-938.

Zanuzzi, C. N., F. Nishida, E. L. Portiansky, P. A. Fontana, E. J. Gimeno, and C. G. Barbeito. 2012. Effects of *Solanum glaucophyllum* toxicity on cell proliferation and apoptosis in the small and large intestine of rabbits. *Res. Vet. Sci.*, 93: 336-342.

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

Zuscik, M. J., R. J. O'Keefe, T. E. Gunter, J. Edward Puzas, E. M. Schwarz, and R. N. Rosier. 2002. Parathyroid hormone-related peptide regulation of chick tibial growth plate chondrocyte maturation requires protein kinase A. *J. Orthop. Res.* v.20: 1079-1090.

