

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

GUILHERME ARANTES MENDONÇA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, FERTILIDADE E PROTEÔMICA DE OVOS DE CASCA
VÍTREA DE REPRODUTORAS PESADAS

UBERLÂNDIA

2020

GUILHERME ARANTES MENDONÇA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, FERTILIDADE E PROTEÔMICA DE OVOS DE
CASCA VÍTREA DE REPRODUTORAS PESADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M539 2020	<p>Mendonça, Guilherme Arantes, 1989- Avaliação da qualidade, fertilidade e proteômica de ovos de casca vítrea de reprodutoras pesadas [recurso eletrônico] / Guilherme Arantes Mendonça. - 2020.</p> <p>Orientador: Marcelo Emílio Beletti. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.34 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p>
--------------	--

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
 BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO PPGCVET/Nº 002/2020				
Data:	14 DE FEVEREIRO DE 2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:00
Matrícula do Discente:	11613VET006				
Nome do Discente:	GUILHERME ARANTES MENDONÇA				
Título do Trabalho:	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, FERTILIDADE E PROTEÔMICA DE OVOS DE CASCA VÍTREA DE REPRODUTORAS PESADAS				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA PRODUTIVA E REPRODUTIVA DE ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO				

Reuniu-se no Anfiteatro/Sala 2D54, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Belchiorina Beatriz Fonseca - UFU; Evandro de Abreu Fernandes - UFU; Érica Crosara Ladir de Lucca - IFTM; Ana Carolina Portella Silveira - IFTM; Marcelo Emilio Beletti - UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Marcelo Emilio Beletti, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Portella Silveira**, Usuário Externo, em 14/02/2020, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº](#)



[8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Érica Crosara Ladir de Lucca, Usuário Externo**, em 14/02/2020, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evandro de Abreu Fernandes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Belchiorina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1842228** e o código CRC **C46EB6A0**.

*Aos meus pais Ismael e Marilda, ao meu irmão Régis, à
minha esposa Marina e ao meu querido filho Miguel,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente àquele que guia meus passos, me abençoa, e me deu a graça de viver, Deus.

Agradeço aos meus pais, Ismael e Marilda por todo o apoio, dedicação, amor e carinho nesta longa jornada até aqui.

Agradeço ao meu irmão Régis por todo o carinho e companheirismo.

À minha esposa Marina que me ajudou imensamente nesta jornada de doutorado, e divide comigo todos os momentos tristes e alegres, conquistas e perdas, e que, sobretudo me apoia, me ama e me respeita.

Ao meu filho Miguel por ser minha inspiração, por me dar forças todos os dias, e que a cada olhar e sorriso me torna uma pessoa melhor.

Agradeço ao meu orientador e amigo, Beletti. Sem suas ideias, dedicação, ensinamentos e paciência nada disso seria possível.

Agradeço a todos meus familiares (cunhadas, avós, tios e primos), amigos e colegas de profissão.

Aos colegas do laboratório de Nutrição Animal: Fernanda, Sâmela e Veridiana; e laboratório de Nanobiotecnologia: Paula Santos, Mário e Prof. Luis Ricardo pela ajuda e dedicação.

Aos componentes da banca, Prof^o Evandro, Prof^a Bia, Prof^a Erica Crosara, Prof^a Ana Carolina, e suplentes Prof^a Fernanda e Prof^a Mara, por se disporem de seu tempo e por contribuírem com suas experiências. Prof^a Bia com sua ajuda imprescindível na estatística e proteômica.

Enfim a todos que participaram direta ou indiretamente da minha vida e que contribuíram de algum modo para meu crescimento.

Muito Obrigado!

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.

Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo,

importa o que fazemos de nós!”

Chico Xavier

RESUMO

Objetivou-se avaliar a influência do tipo de casca (normal e vítrea) sobre os parâmetros de fertilidade, qualidade interna e externa de ovos, além da proteômica das estruturas da casca de reprodutoras pesadas. Para avaliação dos parâmetros de qualidade dos ovos, o experimento foi dividido em duas fases. No experimento 1 foram avaliados 240 ovos (120 de casca normal e 120 de casca vítrea), no prazo máximo de 24 horas após a postura, coletados igualmente entre quatro lotes de avós de frangos de corte da linhagem Ross, de duas linhas (macho e fêmea) e duas idades (38 e 46 semanas). No experimento 2 foram utilizadas 5 bandejas de 162 ovos de casca normal e a mesma quantidade para casca vítrea, de um lote de avós da linha macho da genética Cobb, com 40 semanas de idade. Para a análise proteômica foram utilizados ovos de quatro lotes de avós de frangos de corte (mesmos lotes do experimento 1 de qualidade), sendo selecionados 80 ovos, 20 de cada lote (pool de 10 ovos de casca normal e 10 ovos de casca vítrea) pela característica externa da casca. De cada lote foram coletados fragmentos da estrutura da casca (cascas e membranas das cascas), triturados manualmente, homogeneizados e depois selecionado 1 grama de cada pool para formar a análise final. Ovos de casca normal apresentaram maiores médias que ovos de casca vítrea para as variáveis Porcentagem de Albúmen, Índice de Gema, Índice de Albúmen e unidades Haugh, e menor média para Porcentagem de Magnésio na casca. A perda de umidade na incubação foi maior para os ovos de casca vítrea, em comparação com ovos de casca normal. Por proteômica, foram identificadas 309 proteínas (2989 peptídeos) diferentes nas 8 amostras avaliadas das estruturas da casca. Após análise estatística comparando todos os lotes e proteínas, foi identificada diferença somente para duas proteínas (ATPase- A0A1Y4CB63 e OVA fragmentos idêntica à Ovoalbumina- A0A2H4Y8Q2), sendo que as diferenças entre as proporções foram significativamente maiores para casca vítrea. Dentre as proteínas encontradas destacam-se: Ovotransferrina, Ovalbumina, proteína OVA fragmentos, Proteína Y relacionado à Ovoalbumina, Serotransferrina, Ovomucóide, 2-c-methyl glycerol 4-phosphate cytidylyltransferase, SERPIN, Proteína Não Caracterizada (Gene Ovostatina),

Aplha-1-acid glycoprotein, ATPase e Proteína Não Caracterizada (Gene B5G11_16010). Ovos de casca vítrea têm qualidade interna inferior em relação aos de casca normal, além de perderem mais umidade na incubação (provavelmente por alterações na matéria orgânica/proteica na casca). A partir dos achados proteômicos é possível especular alguma alteração de expressão gênica no útero, que pode levar a superexpressões proteicas (por exemplo proteína OVA/ Ovoalbumina), com aumento do conteúdo orgânico da matriz e desarranjos nas camadas biomineralizadas de ovos de casca vítrea. Portanto, sugere-se novas pesquisas de perfil molecular entre as diferentes estruturas dos dois tipos de casca, além de estudos de manejos diferenciados a nível de campo e incubatório para ovos de casca vítrea.

PALAVRAS-CHAVE: *Gallus gallus*; Ovos translúcidos; Proteínas da casca do ovo; Umidade da casca do ovo.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the influence of the eggshell type (normal and vitreous) on the parameters of fertility, internal and external quality of eggs, in addition to the proteomics of eggshell structures of broiler breeders. To evaluate the egg quality parameters, the experiment was divided into two phases. In experiment 1, 240 eggs (120 of normal shell and 120 of vitreous shell) were evaluated, within a maximum of 24 hours after laying, collected equally between four lots of Ross broilers, two lines (male and female) and two ages (38 and 46 weeks). In experiment 2, five trays of 162 eggs with normal eggshell and the same amount for vitreous eggshell were used, from a lot of grandparents of the male line of the Cobb genetics, at 40 weeks of age. For the proteomic analysis, eggs from four lots of broiler grandparents (same lots from experiment 1 of quality) were used, with 80 eggs selected, 20 from each lot (pool of 10 eggs with normal shell and 10 eggs with vitreous shell) by the external characteristic of the shell. Fragments of the shell structure (shells and shells membranes) were collected from each lot, manually crushed, homogenized and then selected 1 g from each pool to form the final analysis. Normal shell eggs showed higher averages than vitreous shell eggs for the variables Albumin Percent, Yolk Index, Albumin Index and Haugh units, and lower average for Magnesium Percent in the shell. The loss of humidity in the incubation was higher for eggs with vitreous shell, compared with eggs with normal shell. By proteomics, 309 different proteins (2989 peptides) were identified in the 8 samples evaluated from the shell structures. After statistical analysis comparing all lots and proteins, a difference was identified only for two proteins (ATPase- A0A1Y4CB63 and OVA fragments identical to Ovalbumin- A0A2H4Y8Q2), and the differences between the proportions were significantly higher for vitreous shell. Among the proteins found, we highlight: Ovotransferrin, Ovalbumin, OVA protein fragments, Protein Y related to Ovalbumin, Serotransferrin, Ovomucoid, 2-c-methyl glycerol 4-phosphate cytidylyltransferase, SERPIN, Uncharacterized Protein (Ovostatin Gene), Alpha-1 -acid

glycoprotein, ATPase and Uncharacterized Protein (Gene B5G11_16010). Vitreous shell eggs have a lower internal quality than normal shell eggs, in addition to losing more humidity during incubation (probably due to changes in the organic / protein matter in the shell). From the proteomic findings it is possible to speculate some alteration of gene expression in the uterus, which can lead to protein overexpression (for example OVA / Ovalbumin protein), with an increase in the organic content of the matrix, and breakdowns in the biomineralized layers of vitreous shell eggs. Therefore, we suggest new researches of molecular profile between the different structures of the two types of shell, in addition to studies of different field and hatchery managements for vitreous shell eggs.

KEYWORDS: *Gallus gallus*; Eggshell humidity; Eggshell proteins; Translucent eggs.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

FIGURA 1 Seção longitudinal para descrever o conteúdo interno de um ovo de galinha (HINCKE et al., 2012).....	20
FIGURA 2 Aparelho reprodutor da galinha. Ilustração: Geordano Dalmédico (MAZZUCO, 2008).....	20
FIGURA 3 Fotomicrografia das camadas da casca do ovo de codorna por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A: Camadas mamilar, paliçada, cutícula e membranas da casca com aumento de 400x (LEMOS, 2015).....	21
FIGURA 4 Ovo de casca vítrea/translúcida (esquerda) e casca normal/opaca (direita), utilizados no experimento de Wang et al. (2016).....	25
FIGURA 5: Processo simplificado do melhoramento genético do frango de corte (MORAES & CAPANEMA, 2012).....	29

CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE E QUALIDADE DE OVOS DE CASCA VÍTREA DE REPRODUTORAS PESADAS

TABELA 1 Qualidade interna de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte.....	45
TABELA 2 Qualidade externa de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte (espessura do polo maior, médio e menor- ESP. PMA, ESP. PMD e ESP. PME; poros do polo maior, médio e menor- POROS PMA, PMD e PME; e Gravidade Específica-GE).....	47
TABELA 3 Porcentagem de casca e de minerais da casca de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte.....	49
TABELA 4 Perfil bromatológico de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte.....	50
TABELA 5 Média de perfuração espermática entre ovos de casca vítrea e casca normal de avós de frangos de corte.....	50
TABELA 6 Comparação entre ovos de casca normal e vítrea sobre os parâmetros de incubatório (experimento 2).....	51

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 A formação e os componentes do ovo.....	18
2.2 Qualidade interna e externa de ovos de galinhas.....	22
2.3 A casca vítrea.....	24
2.4 A qualidade dos ovos e o desenvolvimento embrionário.....	25
2.5 Proteínas das estruturas da casca e fluido uterino.....	26
2.6 Linhas genéticas do frango de corte.....	28
3. OBJETIVOS	29
4. REFERÊNCIAS	30

CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE E QUALIDADE DE OVOS DE CASCA VÍTREA DE REPRODUTORAS PESADAS

RESUMO	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO PROTEÔMICA DAS ESTRUTURAS DA CASCA DE OVOS NORMAIS E VÍTREOS DE REPRODUTORAS PESADAS

RESUMO	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIAS	78

ANEXO I: Quadro com todas as proteínas encontradas, números de acesso, massa molecular (Daltons), e quantidade total de peptídeos por proteína e em cada lote (M-46: linha macho com 46 semanas; M-38: linha macho com 38 semanas; F-46: linha fêmea com 46 semanas; e F-38: linha fêmea com 38 semanas) e tipo de casca (Nomal e Vítreo).....	84
CONSIDERAIS FINAIS	100
ANEXO: NORMAS DAS REVISTAS	101

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

(Redigido de acordo com as normas da Biblioteca - UFU)

1 INTRODUÇÃO

A casca do ovo tem considerável influência sobre o desenvolvimento embrionário, sendo que problemas na qualidade externa dos ovos determinam maior perda de peso dos ovos durante a incubação e aumento da mortalidade embrionária, o que leva, por consequência, a menores índices de eclodibilidade.

Vilela et al. (2016) relataram que ovos com casca vítrea ou translúcida apresentam manchas de colocração cinza clara, com diâmetros variados por toda a superfície da casca do ovo, que podem estar relacionadas com a proporção de água nas cascas e suas membranas, de acordo com WANG et al. (2016).

Segundo Wang et al. (2016), a casca de ovo translúcida é um problema sério de qualidade, formado por uma interação complexa entre umidade, estrutura da casca de ovo e ambiente externo. Esses mesmos autores consideram algumas hipóteses para o aparecimento de ovos de casca vítrea, entre eles: variações da ultraestrutura da camada mamilar da casca do ovo, maior porosidade da casca do ovo, maior proporção de proteína da matriz da casca do ovo, menor expressão do mRNA de proteína ligante de cálcio (CaBP) na glândula da casca de galinhas e variações na camada mamilar da casca de ovo. Essa última foi considerada a principal razão da formação de cascas translúcidas.

Chousalkar et al. (2010) relataram que a translucidez da casca do ovo pode ser devido a alterações na camada mamilar e nos núcleos mamilares, durante as fases iniciais da formação da casca do ovo, e que essas alterações têm o potencial de aumentar a incidência de microfissuras nas cascas, predispondo à penetração de agentes infecciosos, como *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*.

A indústria avícola sofre um crescente desafio por problemas sanitários, em especial pelas bactérias do gênero *Salmonella spp.* Estima-se que até 10% dos ovos comerciais sejam perdidos por danos na sua estrutura externa (KETTA & TUMOVÁ, 2016). Além disso, devido ao mercado competitivo, o segmento de genética busca cada vez mais resultados satisfatórios de produção e eclosão, sendo que a qualidade da casca é essencial para a eficiência desses parâmetros.

Pouco se sabe sobre as causas que levam ao aparecimento de ovos de casca vítrea, ou mesmo as consequências dessa alteração no contexto de qualidade e

incubação de ovos. Objetivou-se avaliar a influência do tipo de casca (casca normal e casca vítrea) sobre os parâmetros de fertilidade, qualidade interna e externa dos ovos e proteômica da casca e membranas da casca de ovos férteis de reprodutoras pesadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A formação e os componentes do ovo

O oviduto das galinhas é formado por cinco segmentos específicos: infundíbulo, magno, ístmo, útero e vagina (Figura 1). No ovário esquerdo, já que o direito não é funcional nas galinhas, estão localizadas as células primordiais que se transformam nos oócitos, após sucessivas divisões celulares, e estes ao receberem os nutrientes necessários tornam-se óvulos, que crescem de acordo com a hierarquia. Na ovulação, os óvulos (oócitos já maduros) são depositados no infundíbulo, recebendo a membrana vitelínica e a chalaza (MAZZUCO, 2008).

O ovo é composto por uma gema central cercado pela albúmen (clara de ovo), as membranas da casca, a casca do ovo calcificada e a cutícula (Figura 2). Os ovos são produzidos individualmente e ovipostos em intervalos de, aproximadamente, 24 horas em galinhas domésticas (HINCKE et al., 2012).

Estruturalmente, o ovo consiste em aproximadamente 63% de albúmen, 27,5% de gema e 9,5% de casca. Os principais componentes são: água, com cerca de três quartos do ovo, seguido de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas. Uma gema desidratada contém aproximadamente 60% de lipídeos (65% em triglicerídeos, 28-31% em fosfolipídeos e 5% de colesterol) (MAZZUCO, 2008).

A casca é um componente complexo do ovo e que regula a troca de gases e água, sendo que suas propriedades são estabelecidas de acordo com o ambiente que as aves vivem. A genética de certa forma controla a permeabilidade da casca, levando em conta algumas características específicas de seus poros, como o número, densidade, padrão de ramificação e calibre. Além disso, a casca fornece proteção contra danos físicos e térmicos, e contaminação microbiológica (HINCKE et al., 2012).

A casca do ovo representa entre 8 e 9% do peso do ovo fresco e contém 90% de minerais na matriz orgânica, sendo que 98% se constitui de cristais de cálcio. Já o

fósforo e magnésio estão em pequenas quantidades, e ainda é possível encontrar traços de sódio, potássio, zinco, manganês, ferro e cobre. A casca é dividida em seis camadas: membrana testácea interna, membrana testácea externa, núcleo mamilar, camada mamilar, camada paliçada ou esponjosa e cutícula (CHERIAN, 1990), como exemplificado na Figura 3.

A película interna, que reveste a casca, formada por glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos, é chamada de fração orgânica. Compostos como CaCO_3 , MgCO_3 e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ compõem a fração inorgânica da casca do ovo (MEDEIROS; ALVES, 2014).

O processo de formação da casca dura proximadamente 17 horas e é dividido em três etapas. A primeira tem cerca de 5 horas de duração e corresponde ao início da mineralização. Os primeiros cristais de calcita são nucleados nos locais dos agregados orgânicos presentes na superfície das membranas externas da casca. Durante o primeiro estágio da mineralização, o crescimento do cristal é calcita radial. Os locais de nucleação tornam-se as origens dos cones mamilares. À medida que crescem para o exterior, eles gradualmente se reúnem para formar as bases da camada paliçada, altura em que o crescimento radial dos cristais é inibida pela exclusão mútua (HINCKE et al., 2012).

O segundo estágio tem duração de cerca de 10 horas e é caracterizado pelo rápido crescimento de calcita policristalina para formar a camada paliçada. A formação das camadas paliçadas ocorre no espaço livre disponível, produzindo cristais perpendiculares à superfície de formação da casca, e há uma deposição linear de cerca de 0,33 g/h de carbonato de cálcio. A última etapa corresponde ao término do calcificação e dura cerca de 1,5 horas. O sequestro da mineralização ocorre em um fluido uterino que permanece supersaturado em íons cálcio e bicarbonato. Os detalhes não são bem compreendidos, mas provavelmente as proteínas participam ativamente desse processo (HINCKE et al., 2012).

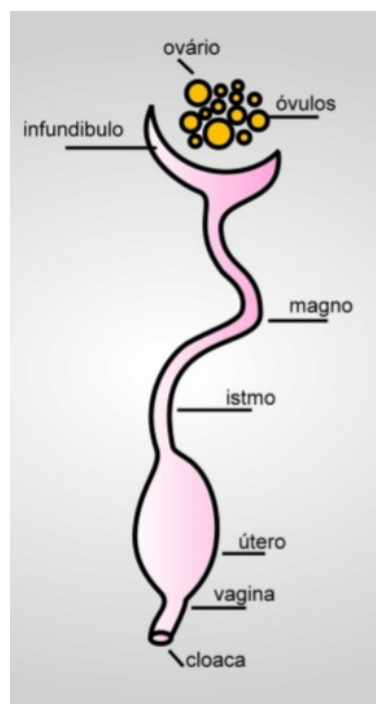


Figura 1. Aparelho reprodutor da galinha.

Ilustração: Geordano Dalmédico (MAZZUCO, 2008).

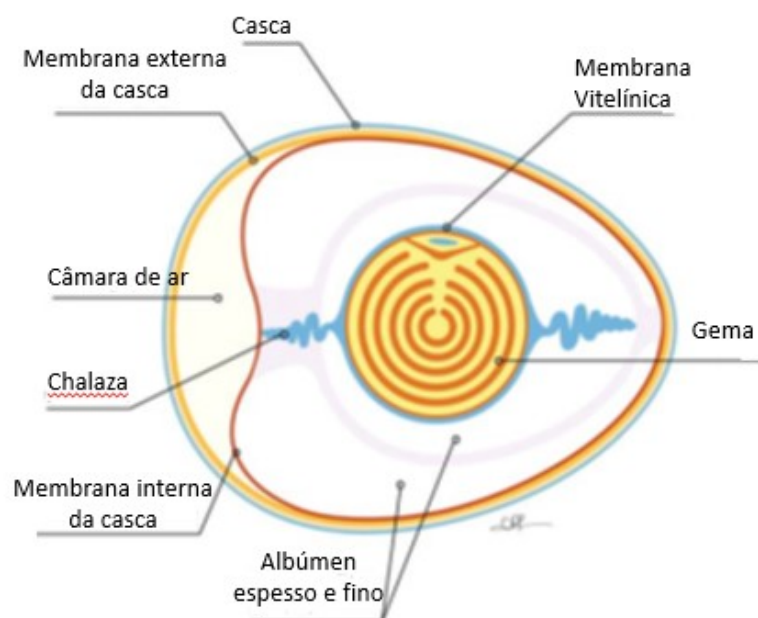


Figura 2. Seção longitudinal para descrever o conteúdo interno de um ovo de galinha (adaptado de HINCKE et al., 2012).

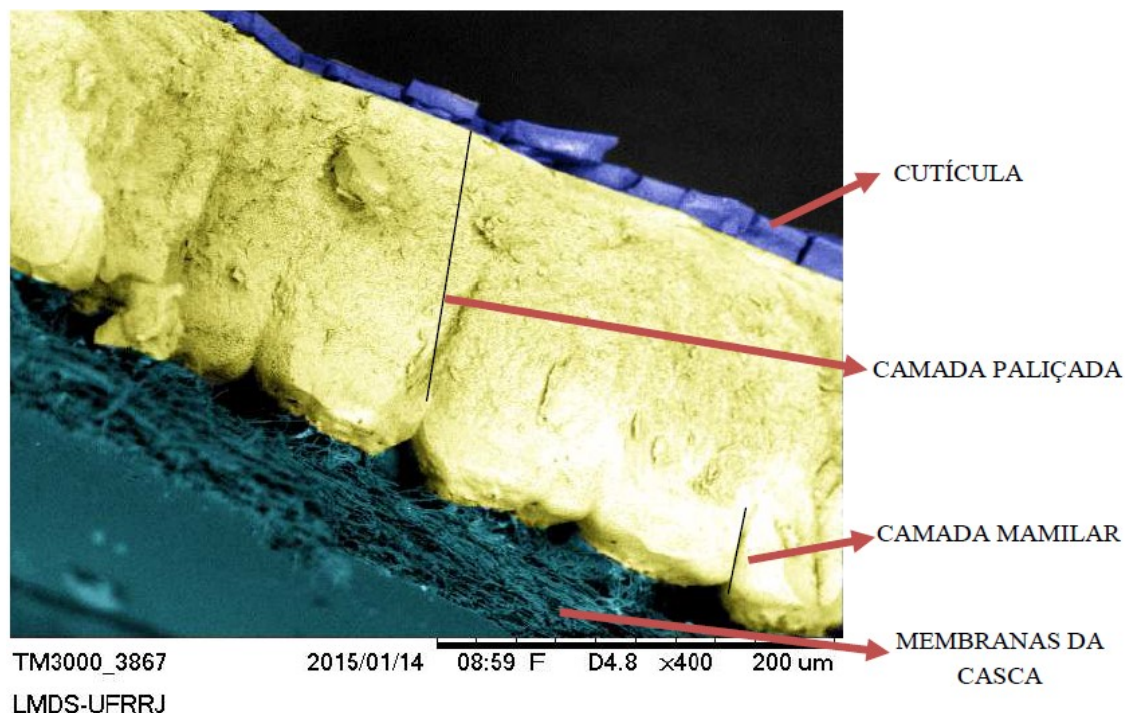


Figura 3: Fotomicrografia das camadas da casca do ovo de codorna por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A: Camadas mamilar, paliçada, cutícula e membranas da casca com aumento de 400x (LEMOS, 2015).

A casca de ovo de aves tem importantes funções, sendo que a proteção contra o impacto mecânico é uma de suas principais atribuições biológicas. A casca é a primeira linha de defesa contra a infecção microbiana, e além dessa função imunológica, ela também regula a troca de água e gás e fornece cálcio para o embrião em desenvolvimento. A matriz orgânica da casca do ovo permeia toda a camada calcificada, sendo constituída de proteínas e proteoglicanos, que fornecem uma arquitetura em rede que orienta o processo de mineralização (MANN & MANN, 2015).

A superfície da casca contém inúmeros poros que possibilitam trocas gasosas com o meio externo, ou seja, o oxigênio entra e sai gás carbônico. Os poros da casca são cobertos por cutícula que protege o ovo da perda de água e dificulta a penetração de microrganismos (BENITES et al., 2005).

2.2 Qualidade interna e externa de ovos de galinhas

O ovo é, sem dúvida, um dos alimentos mais completos para o ser humano, pois é formado por proteínas de excelente valor biológico, reunindo grande parte dos aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos (LEANDRO et al., 2005).

Para avaliar a qualidade da casca, Baião e Cançado (1997) citam alguns métodos comumente utilizados, como a medição da espessura da casca, a porcentagem da casca em relação ao peso do ovo, e o peso da casca por unidade de superfície de área.

A perda de ovos por quebras e trincas está diretamente ligada à qualidade da casca. É essencial a compreensão dos fatores como genética, idade das poedeiras e reprodutoras, nutrição, práticas de manejo e condições ambientais que afetam a formação e a qualidade da casca do ovo (NYS, 2001).

Vários fatores podem afetar a integridade das cascas, como a genética das aves, falhas nutricionais, manejos ineficientes, deficiências sanitárias e ambientais. Problemas de manejos com ovos em ninhos mecânicos ou nas coletas manuais, falhas de transporte e situações de armazenamento inadequadas, podem contribuir expressivamente nas porcentagens de quebras ou trincas da casca do ovo (MAZZUCO, 2013).

A seleção genética, tanto voltada para a produção de ovos quanto de carne, pode afetar outros parâmetros de produção ou qualidade, como a casca do ovo (CARVALHO; FERNANDES, 2013). Os programas de seleção genética devem contemplar monitoramentos em suas diversas fases, a fim de que melhoramentos de determinadas características não tenham tanta influência negativa em outras que também são importantes para a eficiência produtiva, como a qualidade da casca (ROBERTS, 2004).

Para aves mais jovens, a taxa de retenção de cálcio é de, aproximadamente, 60%, enquanto que para aves mais velhas pode ser de apenas 40%, ou seja, possuem menor capacidade de absorção do cálcio de origem alimentar e também da mobilização óssea desse mineral (KESHAVARZ & NAKAJIMA, 1993).

A medida da gravidade específica (GE) do ovo é comumente utilizada para avaliar a qualidade da casca, devido a sua rapidez, praticidade e baixo custo de operação (BARBOSA, 2015). A técnica basicamente consiste na imersão dos ovos em recipientes contendo soluções salinas em ordem crescente de densidade (VOISEY & HUNT, 1974). Os ovos devem ser imersos em recipientes com soluções de densidades 1.050 a 1.100

(intervalos de 0.005), e o resultado é avaliado de forma que quanto mais próximo de 1.100, maior é a espessura da casca (BAIÃO & CANÇADO, 1997).

Sabe-se que poedeiras em início de postura produzem ovos de tamanho reduzido comparado com as outras fases, variando de 35 a 45 gramas (COTTA, 1997). Alguns fatores podem influenciar o peso do ovo nas várias fases (início, pré-pico, pico e fase final), como a genética, idade de atingimento da maturidade sexual, nutrição e ambiência (LARBIER & LECLERCQ, 1992).

Existem cinco métodos para estimar a qualidade de ovos relacionada ao albúmen: altura do albúmen; índice do albúmen; índice da área do albúmen; percentagem do albúmen espesso e fino; e a unidade “Haugh” (ALLEONI & ANTUNES, 2001).

O índice de albúmen é uma relação linear entre altura de albúmen e peso de ovo (KEENER et al., 2000). A medição da altura do albúmen é um parâmetro de qualidade do ovo, pois à medida que ele envelhece a proporção de albumina líquida aumenta, em consequência da diminuição da albumina densa. A perda constante de gás carbônico leva a possíveis alterações de sabor do ovo em decorrência do aumento da alcalinidade, além das inúmeras reações químicas que ocorrem no seu interior (MORENG & AVENS, 1990).

É conhecido que ovos frescos e com qualidade apresentam pH neutro e clara límpida, transparente, consistente, densa e alta, com pequena porção fluida (MURAKAMI et al., 1994).

A unidade Haugh (UH) é um indicativo da qualidade interna do ovo (HAUGH, 1937), sendo que a qualidade varia com o logaritmo do albúmen denso, sendo que quanto maior a UH melhor a qualidade do ovo (RODRIGUES, 1975). O albúmen denso deve apresentar UH maior do que 72, sendo que o de média densidade entre 72 e 60 e o albúmen fluidificado abaixo de 60 (USDA, 2000).

Já o índice gema (IG) é uma medida de qualidade da gema, que equivale a sua altura dividida pelo diâmetro, onde valores ótimos para ovos frescos devem estar entre 0,40 e 0,42 (SOUZA, 1997).

A qualidade interna dos ovos decai gradativamente após a postura, devido à perda de água, com perda de peso e CO₂, liquefação do albúmen, movimentação de líquidos, distensão e flacidez da membrana vitelina da gema, que pode vir a romper (MAGALHÃES, 2007). O aumento do pH do albúmen é uma das primeiras alterações

de qualidade do ovo já no ambiente externo, na qual a faixa de variação em ovos frescos é de 7,6 a 8,5, chegando até 9,7 em ovos armazenados (MINE, 1995).

O pH da gema fresca é de aproximadamente 6,0, porém, com o armazenamento esse pH pode chegar na faixa de 6,9 (ALLEONI & ANTUNES, 2001). Singh & Panda (1990) avaliaram o pH da gema e do albúmen de ovos armazenados a 5 e a 32°C, e relataram que à temperatura de 5°C o pH aumentou lentamente em comparação à temperatura superior.

2.3 A casca vítrea

Ovos com casca vítrea apresentam pequenas manchas de coloração cinza clara, com diâmetros variados por toda a superfície da casca do ovo (VILELA et al., 2016). As manchas cinza, em ovos de casca vítrea, não podem ser detectadas dentro de algumas horas de postura, e que em temperatura ambiente, depois de 2 a 3 dias, pode-se ver claramente a olho nu. É conhecido que os ovos de casca vítrea afetam seriamente a aparência e por consequência o consumo dos ovos de poedeiras (WANG et al., 2016).

Áreas translúcidas da casca (Figura 4) são mais fracas que áreas opacas, e essa diferença é mais acentuada em uma semana, do que em um ovo recém posto. Este ponto é de interesse em relação a danos nos ovos nas gaiolas em poedeiras, e nos ovos de ninho e de cama em aves reprodutoras. Áreas translúcidas são mais fracas do que as áreas opacas da mesma casca e, portanto, ovos com muitos áreas translúcidas podem ter uma chance maior de danos do que ovos com poucas áreas translúcidas, embora as áreas translúcidas sobre um ovo possam ser mais fortes do que as áreas opacas de outro ovo (TYLER; GEAKE, 1964).

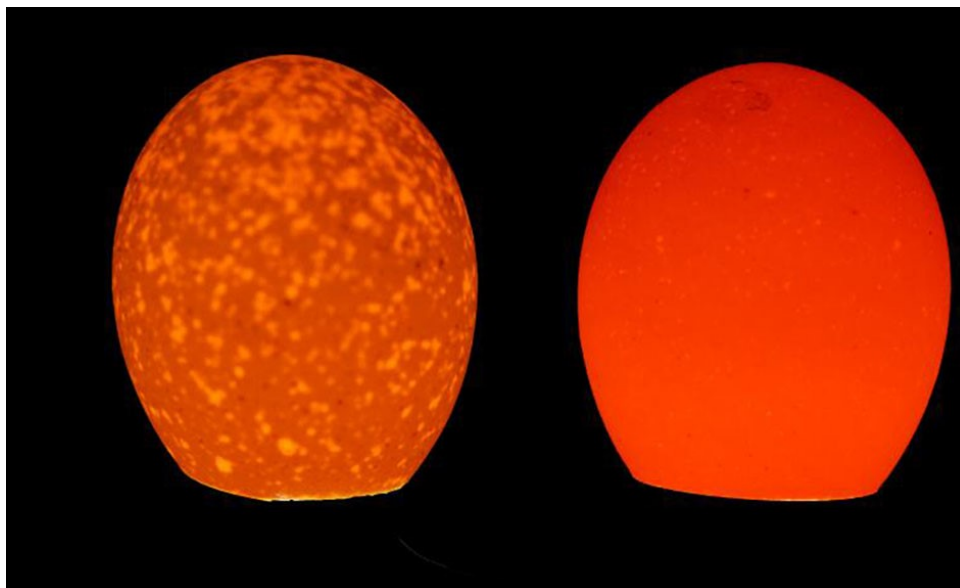


Figura 4: Ovo de casca vítrea/translúcida (esquerda) e casca normal/opaca (direita), utilizados no experimento de Wang et al. (2016).

Chousalkar et al. (2010) relataram que houve uma correlação significativa entre a translucidez da casca do ovo e a penetração das bactérias *Salmonella infantis* e *Escherichia coli*. Esses autores observaram que ambas as cepas de bactérias foram capazes de penetrar nas cascas de ovos translúcidas, mesmo em doses muito baixas. No entanto, também foi relatado que a penetração foi prejudicada em ovos translúcidos e normais a 4°C, em comparação com a temperatura ambiente, destacando a importância do armazenamento de ovos em temperaturas refrigeradas.

Carvalho (2010) descreve que o histórico de pesquisas sobre a casca vítrea mostra resultados contraditórios de qualidade da casca, sendo que alguns autores não reportaram diferenças significativas e outros concluíram pela maior fragilidade da casca em ovos vítreos.

2.4 A qualidade dos ovos e o desenvolvimento embrionário

O ovo exerce papel fundamental no desenvolvimento embrionário das aves, já que tem função de proteção e de nutrição do embrião. A casca do ovo é uma barreira primária às possíveis agressões externas e invasões de microrganismos. Já a gema e o albúmen seriam uma segunda frente de proteção, devido às suas propriedades nutritivas e atividades biológicas regulatórias (MAZZUCO, 2008).

O albúmen exerce algumas funções no desenvolvimento embrionário das aves: auxilia no correto posicionamento da gema e blastoderme; protege mecanicamente a blastoderme no início do desenvolvimento; minimiza problemas advindos de contaminações por microrganismos patogênicos; mantém a hidratação do embrião; auxilia na formação da câmara de ar; além de ser uma fonte de alimento para o embrião (ETCHES, 1998).

O albúmen é formado por algumas proteínas específicas como ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucóide, avidina e lisozima, que podem conferir proteção embrionária contra a ação bacteriana. A viscosidade, que impede a movimentação dos microrganismos para a gema, a ação antagonista da avidina sobre a reprodução bacteriana, e a ação das lisozimas que hidrolisam polissacarídeos da parede das bactérias, são exemplos de mecanismos de defesa extremamente importantes relacionados ao albúmen (WOLANSKI et al., 2007).

Durante a incubação a maior parte da água é perdida por meio da difusão por meio dos poros da casca para o ambiente, mas também a água é retida pelo embrião e pelo saco vitelino e outra porção é mantida nos resíduos do ovo eclodido. Ainda na incubadora o ar exterior vai substituindo a água perdida pelo ovo, o que provoca um aumento progressivo na câmara de ar, importante para a posterior eclosão (RAHN & AR, 1974).

Buhr (1995) em um estudo de incubação de ovos de matrizes leves relatou que os ovos das reprodutoras com 49 semanas perderam mais peso quando comparadas às matrizes de 38 semanas. Tal fato ocorre principalmente pelo aumento da condutância da casca com a progressão da idade das aves (SANTOS et al., 2005).

2.5 Proteínas das estruturas da casca e fluido uterino

A proteômica é um estudo molecular em larga escala das proteínas, com o objetivo de separar e identificar proteínas em amostras biológicas complexas. As proteínas controlam a maioria dos processos celulares, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

Rose-Martel et al. (2012) identificaram 47 proteínas cuticulares (membrana externa) de casca de ovo de galinhas poedeiras. As duas mais abundantes foram:

proteína inibidora da protease do tipo Kunitz e a ovocalixina-32. Foram detectadas várias proteínas conhecidas por terem atividade antimicrobiana no ovo (lisozima C, ovotransferrina, ovocalixina-32, cistatina, ovo-inibidor), bem como possíveis novos candidatos (mieloperoxidase, ovocalixina-36 e membros da família SERPIN).

Marie et al. (2012) identificaram 308 proteínas no fluido uterino de galinhas. A análise quantitativa mostrou abundâncias diferenciais nos três estágios da biomineralização de cascas em 64 dessas proteínas. A análise de cluster revelou um primeiro grupo de proteínas relacionadas à mineralização e presentes no início da calcificação, incluindo ovotransferrina, ovoalbumina e ovocleidina 17 e duas novas proteínas de ligação ao cálcio (EDIL3, MFGE8). A ovocalaxina 21 é presente no início e no término da formação da casca, e está potencialmente envolvida na regulação da atividade das proteínas do fluido uterino. Outro grupo correspondeu a proteínas antibacterianas que poderiam proteger o ovo contra invasão microbiana.

Rath et al (2017) realizaram análise proteômica de membranas da casca do ovo para incubação, e demonstraram a presença de várias proteínas abundantes na clara de ovo, como ovalbumina, ovotransferrina, ovocleidina-116 e lisozima e várias proteínas associadas às funções citoesqueléticas, de sinalização celular, antimicrobiana e catalítica que envolvem carboidratos, ácido nucleico e metabolismo proteico. Foram descritas também proteínas derivadas do sangue provavelmente originárias dos embriões e várias outras proteínas identificadas com diferentes espécies de bactérias.

Arias et al. (1993) relataram que os proteoglicanos queratan e dermatan estão presentes na matriz da casca de ovo, e que essas proteínas glicosadas podem estar envolvidas no controle da estrutura e textura da casca. Restos solúveis de clara podem migrar com o ovo para a glândula da casca, onde eventualmente são incorporados na matriz mineralizante. Não é conhecida qual a porcentagem dessas proteínas de clara encontradas na matriz da casca do ovo pode ter contribuído com estes tecidos. Outras proteínas são produzidas pelas células epiteliais da glândula da casca, mas aparentemente não em outras seções do oviduto (MANN; MANN, 2015).

Outras proteínas com possível distribuição específica em casca de ovo são a ovocalixina-32 (OCX32), um membro da família latexin de inibidores da carboxipeptidase e ovocalixina-36(OCX36), membro da família BPI / LBP / PLUNC de proteínas antimicrobianas (MANN; MANN, 2015).

Outras duas proteínas já encontradas em casca de ovo são as ovocalixinas OCX-25 e OCX-21. As funções dessas proteínas ainda não são conhecidas, mas estudos *in vitro* mostraram que os fluidos uterinos bem como componentes isolados da casca do ovo influenciam a cristalização da calcita *in vitro* e, portanto, também controlam a mineralização da casca de ovo *in vivo* (MANN; MANN, 2015).

Mann & Mann (2013) fizeram análise proteômica da matriz da casca de ovo de perus, e relataram algumas diferenças em comparação com galinhas. Por exemplo, a casca de ovo de peru contém a proteína óssea periostina, a terceira em abundância na análise, sendo que esta não foi identificada em galinhas (MANN et al., 2006).

Mann & Mann (2013) também relataram diferenças entre um grupo de chamadas proteínas específicas da casca de ovo, produzidas pelas células epiteliais da glândula da casca de ovo de galinha e considerado muito importante para produção da casca. As proteínas OC-116 e OCX-36 também estavam entre as principais proteínas da matriz de casca de ovo de peru (MANN & MANN, 2013).

2.6 Linhas genéticas do frango de corte

As casas genéticas desenvolvem as linhagens puras através de etapas de seleção internas, e sua reprodução dá origem às aves bisavós, com as quais se inicia o processo de cruzamento (Figura 5). Normalmente as matrizes começam a produzir ovos em até 24 semanas e têm em média 68 semanas de vida produtiva, produzindo cerca de 150 ovos. Avós e bisavós têm capacidade produtiva dois terços menor, e uma ave de linhagem pura pode resultar em até 4,5 milhões de pintos de um dia. Assim, um frigorífico com capacidade de abate de 120 mil frangos/dia consumiria 280 mil matrizes, que correspondem a 34 mil avós e cinco mil bisavós (MORAES & CAPANEMA, 2012).

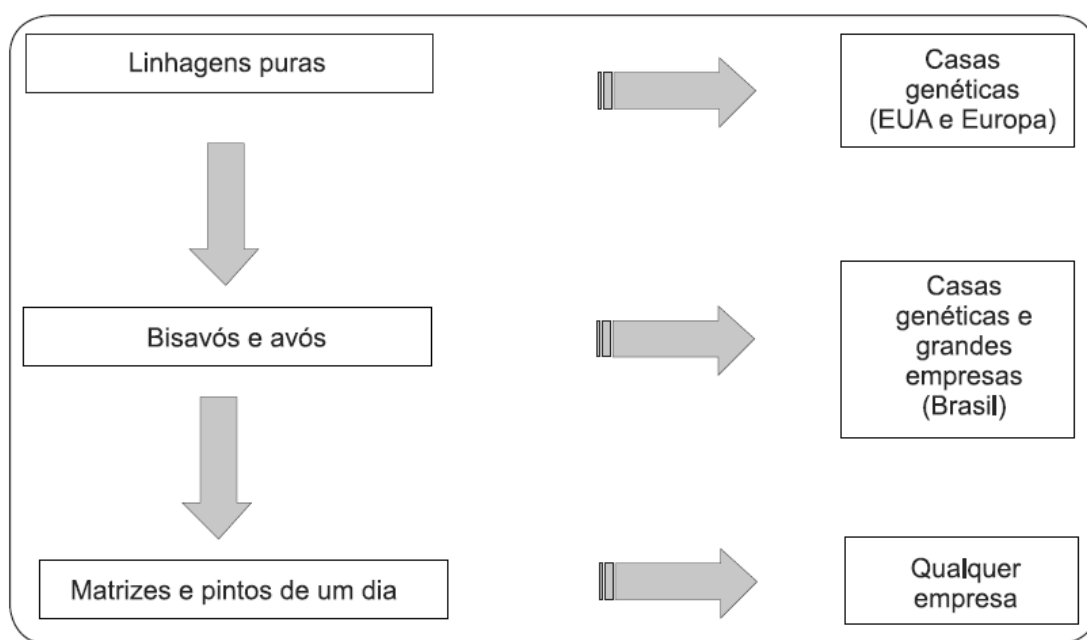


Figura 5: Processo simplificado do melhoramento genético do frango de corte (MORAES & CAPANEMA, 2012).

3 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar a influência da casca vítrea sobre os parâmetros de fertilidade, qualidade interna e externa, e proteômica de casca de ovos de reprodutoras pesadas.

4 REFERÊNCIAS

- ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J. Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 681- 685, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162001000400005>
- ARIAS, J. L.; FINK, D. J.; XIAO, S.; HEUER, A. H.; CAPLAN, A. I. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. **International Review of Cytology**, Knoxville, v. 145, p. 217–250, 1993. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60428-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60428-3)
- BAIÃO, N. C.; CANÇADO, S. V. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, n.21, p.43- 59, 1997.
- BARBOSA, L. A. J. Qualidade de ovos de casca vítrea e casca normal de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e tempos de estocagem. 50 f. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- BENITES, C. I.; FURTADO, P. B. S.; SEIBEL, N. F. Características e aspectos nutricionais do ovo. In: SOUZ-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. (org.). *Aves e ovos*. Pelotas: UFPEL, p. 57-64, 2005.
- BUHR, R. J. Incubation relative humidity effects on allantoic fluid volume and hatchability. **Poultry Science**, Champaign, v. 74, p. 874-884, 1995. <https://doi.org/10.3382/ps.0740874>

CARVALHO, L. S. S.; FERNANDES, E. A. Formação e qualidade da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. **Medicina Veterinaria**, Recife, v. 7, n. 1, p. 35-44, 2013.

CHERIAN, G.; WOLFE, E. H.; SIM, J. S. Research note: effect of storage conditions and hard cooking on peelability and nutrient density of white and brown shelled eggs. **Poultry Science**, Champaign, v. 69, p. 1614-1616, 1990.
<https://doi.org/10.3382/ps.0691614>

CHOUSALKAR, K. K.; FLYNN, P.; SUTHERLAND, M.; ROBERTS, J. R.; CHEETHAM, B. F. Recovery of Salmonella and Escherichia coli from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. **International Journal of Food Microbiology**, Turin, v. 142, n. 1-2, p. 207-213, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.029>

COTTA, T. Reprodução da galinha e produção de ovos. Lavras: **UFLA-FAEPE**, 1997. p. 81-92.

ETCHES, R. J. **Reproduction in poultry**. 1. ed. Wallingford: CAB Internacional, 1998, 318 p.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; PIZA, A. R. T.; RESENDE, L. C.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1-24, 2010.

HAUGH, R.R. The Haugh unit for measuring egg quality. **United States Egg Poultry Magazine**, v. 43, p.552-555, 1937.

HINCKE, M. T.; NYS, Y.; GAUTRON, J.; MANN, K.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A. B.; MCKEE, M. D. The eggshell: structure, composition and mineralization. **Frontiers in Bioscience**, Irvine, v. 17, n. 1, p. 1266, 2012. [DOI: 10.2741/3985](https://doi.org/10.2741/3985)

KEENER, K. M.; LACROSSE, J. D.; CURTIS, P. A.; ANDERSON, K. e FARKAS, B. E. The Influence of Rapid Air Cooling and Carbon Dioxide Cooling and Subsequent Storage in Air and Carbon Dioxide on Shell Eg Quality. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 7, p. 1067–1071, 2000. <https://doi.org/10.1093/ps/79.7.1067>

KESHAVARZ, K.; NAKAJIMA, S. Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements of laying hens for optimum performance and eggshell quality. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, n. 1, p. 144-153, 1993. <https://doi.org/10.3382/ps.0720144>

KETTA, M., TUMOVÁ, E. Eggshell structure, measurements, and quality-affecting factors in laying hens: a review. **Czech Journal of Animal Science**, Praga, v. 61, n. 7. p. 299-309, 2016. <http://doi.org/10.17221/46/2015-CJAS>

LARBIER, M., LECLERCQ, B. **Nutrition and feeding of poultry**: 1 ed. Nottingham: University Press, 1992, 306 p.

LEANDRO, N. S. M.; DEUS, H. A. B.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; ANDRADE, M. A.; CARVALHO, F. B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, n. 2, p. 71–78, 2005.

LEMOS, M. J. Estudo comparativo da inclusão de aditivos zootécnicos na ração de codornas japonesas em produção. 84 p. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Zootecnia- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

MAGALHÃES, A. P. C. Qualidade de ovos comerciais de acordo com a integridade da casca, tipo de embalagem e tempo de armazenamento. 43 f. **Dissertação** (Mestrado) – Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

MANN K.; MACEK B.; OLSEN, J. V. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 13, p. 3801–3810, 2006. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600120>

MANN, K.; MANN, M. Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: A comparison to chicken and turkey eggshell proteomes. **Proteome Science**, Baltimore v. 13, n. 1, p. 1–19, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12953-015-0078-1>

MANN, K.; MANN, M. The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey (*Meleagris gallopavo*) eggshell. **Proteome Science**, Baltimore, v. 11, n.1, p. 11-40, 2013. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-40>

MARIE, P.; LABAS, V.; BRIONNE, A.; HARICHAUX, G.; HENNEQUET-ANTIER, C.; NYS, Y.; GAUTRON, J. Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. **Journal of Proteomics**, Roma v. 113, p. 178–193, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.024>

MAZZUCO, H. Ovo: alimento funcional, perfeito à saúde. **Revista Avicultura Industrial**, Itu, v. 99, n. 1164, p. 12–16, 2008.

MAZZUCO, H. Problemas na qualidade da casca do ovo: identificando as causas e possíveis soluções. **Revista Agricultura Industrial**, Itu, v. 104, n. 6, p. 16-26, 2013.

MEDEIROS, F. M.; ALVES, M. G. M. Qualidade de ovos comerciais. **Revista Eletrônica Nutritime**, Campinas, v. 11, n.4, p. 3515-3524, 2014.

MINE, Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionally. **Trends in Food Science and Technology**, Wageningen, v.6, n.7, p.225-232, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4)

MORAES, V. G.; CAPANEMA, L. A genética de frangos e suínos – a importância estratégica de seu desenvolvimento para o Brasil. **BNDES Setorial- Biblioteca Digital**, Brasília, v. 35, p. 119-154, 2012.

MORENG, R. E.; AVENS, J. S. **Ciência e produção de aves**: 1 ed. São Paulo: Roca, 1990, 380 p.

MURAKAMI, A. E.; BARRIVIERA, V. A.; SCAPINELLO, C; BARBOSA, M. J.; VALÉRIO, S. R. Efeito da temperatura e do período de armazenamento sobre a qualidade interna do ovo de codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) para consumo humano. **Revista Unimar**, Maringá, v.16, n. 1, p. 13-25, 1994.

NYS, Y.; GAUTRON, J.; MCKEE, M. D.; GARCIA-RUIZ, J. M.; HINCKE, M. Biochemical and functional characterization of eggshell matrix proteins. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 57, n. 4, p. 401–403, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1079/WPS20010029>

RAHN, H.; AR, A. The avian egg: Incubation time and water loss. **The Condor**, Nova Iorque, v. 76, n. 2, p. 147-152, 1974. <https://doi.org/10.2307/1366724>

RATH, N. C.; LIYANAGE, R.; MAKKAR, S. K.; LAY JR, J. O. Protein profiles of hatchery egg shell membrane. **Proteome Science**, Baltimore, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0112-6>

ROBERTS, J. R. Factors affecting egg internal quality and eggshell quality in laying hens. **Journal of Poultry Science**, Tokyo, v. 41, n. 3, p. 161-177, 2004. <https://doi.org/10.2141/jpsa.41.161>

RODRIGUES, P. C. Contribuição ao estudo da conversão de ovos de casca branca e vermelha. 57p. **Dissertação** (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1975.

ROSE-MARTEL, M.; DU, J.; HINCKE, M. T. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. **Journal of Proteomics**, Roma, v. 75, p. 2697–2706, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.019>

SANTOS, G. C. F.; CAMPOS, E. J.; SILVA, P. L. Efeito da linhagem e da idade de reprodutoras pesadas e leves sobre a perda de umidade dos ovos durante o período de incubação. In: Conferência Apinco de Ciências e Tecnologias Avícolas: FACTA, Campinas, São Paulo, Brasil, p. 21, 2005.

SINGH, R. P.; PANDA, B. Comparative study on some quality attributes of quail and chicken eggs during storage. **Indian Journal of Animal Sciences**, Nova Delhi, v.60, n.1, p.114-117, 1990.

SOUZA, P. A. Efeito da idade da galinha na qualidade dos ovos mantidos sob condições de ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 49-52, 1997.

TYLER, C.; GEAKE, F. H. The effect of water on egg shell strength including a study of the translucent areas of the shell. **British Poultry Science**, Champaign, v. 5, n. 3, p. 277–284, 1964. <https://doi.org/10.1080/00071666408415541>

USDA. **Egg-Grading Manual**. 75. Ed. Washington, DC: Department of Agriculture, 2000. 56p.

VILELA, D. R.; CARVALHO, L. S. S.; FAGUNDES, N. S.; FERNANDES, E. A. Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com cascas normal e vítrea. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 17, n. 4, p. 509-518, 2016. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i421535>.

VOISEY, P. W.; HUNT, J. R. Comparison of several eggshell characteristics with impact resistance. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.56, n.2, p. 299-304, 1974. <https://doi.org/10.4141/cjas76-035>

WANG, D. H.; LI, Y. J.; LIU, L.; LIU, J. S.; BAO, M.; YANG, N.; ZHUO-CHENG, H. Traits of eggshells and shell membranes of translucent eggs. **Poultry Science**, Champaign, n. 96, v. 2, p. 351-358, 2017. <https://doi.org/10.3382/ps/pew328>

WOLANSKI, N. J.; RENEMA, R. A.; ROBINSON, F. E.; CARNEY, V. L.,;
FANCHER, B. I. Relationships among egg characteristics, chick measurements, and
early growth in ten broiler breeder strains. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p.
1784-1792, 2007. <https://doi.org/10.1093/ps/86.8.1784>

CAPÍTULO 2

(Redigido de acordo com as normas da Revista Brazilian Journal of Poultry Science)

Fertilidade e qualidade de ovos de casca vítrea de reprodutoras pesadas

Guilherme Arantes Mendonça^{1*}, Marina Cruvinel Assunção Silva Mendonça¹, Fernanda Heloísa Litz², Iago Matheus Rosa Leão³, Sâmela Keila Almeida Santos¹, Veridiana Aparecida Limão Barbero⁴, Evandro de Abreu Fernandes⁵, Ednaldo Carvalho Guimarães⁵, Marcelo Emílio Beletti⁵

¹Doutorando em Ciências Veterinárias, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

²Prof^a. Dr^a da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC).

³Médico Veterinário pela Universidade Federal de Uberlândia.

⁴Doutora em Ciências Veterinárias pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Prof^o. Dr^o. pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Resumo: Objetivou-se avaliar a influência do tipo de casca vítrea sobre os parâmetros de fertilidade e qualidade interna e externa de ovos de avós de frangos de corte. No experimento 1 foram avaliados 240 ovos (120 de casca normal e 120 de casca vítrea), no prazo máximo de 24 horas após a postura, coletados igualmente entre quatro lotes de avós de frangos de corte da linhagem Ross, de duas linhas (macho e fêmea) e duas idades (38 e 46 semanas). No experimento 2 foram utilizadas 5 bandejas de 162 ovos de casca normal e a mesma quantidade para casca vítrea, de um lote de avós da linha macho da genética Cobb, com 40 semanas de idade. Ovos de casca normal apresentaram maiores médias que ovos de casca vítrea para as variáveis Porcentagem de Albúmen, Índice de Gema, Índice de Albúmen e unidades Haugh, e menor média para Porcentagem de Magnésio na casca. A perda de umidade na incubação foi maior para os ovos de casca vítrea, em comparação com ovos de casca normal. Ovos de casca vítrea têm qualidade interna inferior em relação aos de casca normal, além de perderem mais umidade na incubação (provavelmente por alterações na matéria orgânica/proteica na casca). Tais resultados são suficientes para se buscar alternativas que diminuam perdas em eficiência, como novas pesquisas de perfil molecular, além de outras que indiquem possíveis soluções a campo e também manejos de incubação específicos para ovos vítreos.

37

PALAVRAS-CHAVE: casca de ovo translúcida; incubação de ovos; ovos vítreos; perda de umidade; unidade Haugh.

40

41

42

43

Introdução

A qualidade da casca é um fator primordial quando se trata de ovos comerciais, pois se estima que cerca de 10 a 15% dos ovos de poedeiras são perdidos por apresentarem má qualidade de casca. Quando se foca em reprodutoras, além de perdas com ovos quebrados e trincados, outro fator de grande importância é a influência sobre o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que problemas na qualidade externa dos ovos determinam maior perda de peso durante a incubação e aumento da mortalidade embrionária, comprometendo os índices de eclodibilidade (Carvalho & Fernandes, 2013).

A casca de boa qualidade protege o embrião contra choques mecânicos, dificulta a contaminação por bactérias e outros patógenos, evita a perda excessiva de água, regula a troca de gases entre o interior dos ovos e o ambiente, e ainda é fonte de nutrientes essenciais como o cálcio (Carvalho & Fernandes, 2013). Sabe-se que uma espessura da casca normalmente apresenta valores entre 0,33 a 0,35mm, sendo que valores inferiores a 0,27mm dificilmente mantém o embrião vivo até o fim do ciclo da incubação (Schmidt *et al.*, 2003).

A casca vítrea, ou também chamada de translúcida, caracteriza-se por pontos cinza claro, com diâmetros variados espalhados por toda a superfície do ovo, sugerindo alguma alteração na casca que vai se tornando mais evidente com o aumento do tempo de armazenamento. Outra característica marcante é o som de vidro quando se bate na casca com uma ponta metálica, denominando-o assim de casca vítrea. Esses tipos de casca afetam negativamente a aparência dos ovos e diminuem seu valor econômico, o que leva a preocupações de agroindústrias e pequenos produtores.

Já foram descritas algumas causas para o aparecimento de cascas vítreas, como a deficiência de manganês (Leach & Gross, 1983), falha na secagem rápida da cutícula e alta umidade ambiental. O fato é que pouco se sabe sobre a influência da casca vítrea sobre a qualidade interna e externa dos ovos e de que forma essa alteração poderia impactar na

69 mineralização da casca (Vilela *et al.*, 2016), e até mesmo na eficiência reprodutiva dos lotes.
70 Apesar de poucos estudos sobre cascas vítreas, alguns autores já avaliaram a qualidade
71 interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com casca normal e vítrea (Barbosa, 2015;
72 Vilela *et al.*, 2016).

73 A porosidade e a espessura da casca são fatores intrínsecos importantes na proteção do
74 ovo, sendo que há evidência que a translucidez da casca é associada à maior penetração
75 microbiana (Chousalkar *et al.*, 2010). Além disso, a indústria avícola vem experimentando um
76 grande desafio que é o aumento da contaminação dos ovos por bactérias do gênero
77 *Salmonella*. Além disso, devido ao mercado competitivo, o segmento de genética busca cada
78 vez mais resultados satisfatórios de produção e eclosão, sendo que a qualidade dos ovos é
79 essencial para a eficiência desses parâmetros. Objetivou-se, portanto, avaliar a influência da
80 casca vítrea sobre os parâmetros de fertilidade e qualidade interna e externa de ovos de avós
81 de frangos de corte.

82

83 **Material e Métodos**

84 Foram utilizados 402 ovos férteis de 5 lotes avós de frangos de corte, provenientes de
85 uma granja localizada no município de Uberaba-MG, no mês de dezembro de 2017. A pesquisa
86 de incubação foi realizada em um incubatório avozeiro no município de São Carlos-SP e as
87 demais análises no Laboratório de Análise de Matéria Prima e Ração da Faculdade de
88 Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LAMRA-UFU). O projeto foi
89 aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de
90 Uberlândia, sob o protocolo A004/17.

91 As aves eram arraçadas uma vez ao dia no período do início da manhã e a água era
92 fornecida à vontade. As rações foram formuladas a base de milho e farelo de soja, seguindo as
93 recomendações de exigências nutricionais dos manuais das linhagens.

94 No experimento 1 foram avaliados 240 ovos (120 de casca normal e 120 de casca
95 vítrea), no prazo máximo de 24 horas após a postura, coletados igualmente entre quatro lotes
96 de avós de frangos de corte da linhagem Ross, de duas linhas (macho e fêmea) e duas idades
97 (38 e 46 semanas). Os ovos foram coletados em ninhos mecânicos, pré-classificados e
98 depositados em bandejas plásticas. Após esse processo as bandejas foram colocadas em
99 caixas plásticas, fumigadas com paraformaldeído e levadas até a sala de ovos, com
100 temperatura controlada (18 a 21° C), no prazo máximo de 2 horas após a postura. Os ovos
101 foram selecionados pela característica externa da casca, com auxílio de ovoscópio, separando
102 os de casca visivelmente normal e os de casca vítrea. Foram excluídos ovos com trincas,
103 deformados, quebrados e visivelmente sujos de fezes. A variação máxima de peso dos ovos
104 selecionados foi de 0,5g, com peso médio de 66g. Os ovos foram processados no laboratório
105 cerca de 24 a 48 horas após a coleta na sala de ovos da granja.

106 Os ovos selecionados foram encaminhados ao laboratório LAMRA-UFU, unitariamente
107 pesados em balança de precisão marca (0,01g) e avaliados a gravidade específica (GE). Os
108 ovos foram quebrados em uma superfície plana e lisa de vidro. As cascas foram lavadas com
109 água destilada para retirar o excesso de albúmen e secas à temperatura ambiente por cerca de
110 2 horas. Foi calculado o índice de gema (Ind. Gema) (altura da gema/diâmetro da gema) e
111 índice de albúmen (Ind. Albúmen) (altura do albúmen denso/diâmetro do albúmen denso),
112 mensurados a partir de micrômetro digital (Digimes com precisão de 0,01mm). Com um
113 micrômetro digital (Mitutoyo) foi mensurada a espessura da casca em três pontos do ovo (polo
114 maior- ESP. PMA, médio- ESP. PMD e menor- ESP. PME). Após coloração com solução de
115 azul de metileno, delimitou-se uma área de 1cm² e quantificou-se, com o auxílio de uma lupa, o

número médio de poros da casca em três pontos do ovo (polo maior- POROS PMA, médio- POROS PMD e menor- POROS PME). Foram separados e pesados individualmente a gema, albúmen e casca para o cálculo das suas percentagens em relação ao peso do ovo (% Gema, % Albúmen e % Casca); pH da gema e albúmen, e calculada as unidades Haugh (UH) (Haugh, 1937).

Além disso, foram realizadas análises do teor de cálcio, fósforo e magnésio por meio de digestão nitroperclórica da casca, e mensurados em espectrofotômetro UV com comprimento de onda 420 nm, no Laboratório de Tecnologia de Fertilizantes (LAFER) da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram determinados os teores de matéria seca da gema (MS Gema) e do albúmen (MS Albúmen), matéria mineral da gema (MM Gema), do albúmen (MM Albúmen) e da casca (MM Casca), proteína bruta da gema (PB Gema) e do albúmen (PB Albúmen); extrato etéreo da gema (EE Gema), segundo metodologias proposta pelo Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (Sindirações, 2009).

Foram avaliadas as membranas dos discos germinativos para quantificação da perfuração espermática em 10 ovos de casca vítrea e 10 ovos de casca normal. A perfuração espermática teve como objetivo “capturar” a membrana perivitelínica do disco germinativo, depositá-la a mais íntegra possível em uma lâmina, corar (Formalina 37% e Reagente de Schiff), deixar secar por cerca de 30 minutos e contar em microscopia óptica a quantidade de perfurações realizadas por espermatozoides (Santa Rosa *et al.*, 2016).

No experimento 2 foi realizado o teste de incubação. Foram utilizadas cinco bandejas de 162 ovos de casca normal e a mesma quantidade para casca vítrea, com tempo de estocagem de três dias. Para essa análise foi utilizado somente um lote da linha macho da genética Cobb, com 40 semanas de idade, provenientes da mesma granja do experimento 1.

As variáveis analisadas foram: taxa de eclosão; perda de umidade dos ovos; embriodiagnóstico e peso dos pintinhos ao nascer. A eclosão foi medida após o período de incubação (21 dias), sendo avaliada a quantidade de pintinhos nascidos por tipo de casca, e calculada a taxa de eclosão. A avaliação da perda de água do ovo foi feita pela pesagem dos ovos antes da colocação das bandejas nas máquinas incubadoras e antes da transferência para as máquinas nascedouras, para avaliação e quantificação da porcentagem de água perdida durante o processo. No embriodiagnóstico todos os ovos não eclodidos foram quebrados e avaliados para definir a idade aproximada da morte embrionária (0-4 dias, 5-12 dias, 13-18 dias e 19-21 dias), além da presença de ovos bicados, contaminados e trincados. Logo após o nascimento os pintinhos provenientes dos ovos avaliados foram pesados em balança da marca Toledo, com limite máximo de 15 Kg e escala de 100 g, considerando cada bandeja testada.

As variáveis foram submetidas à análise de variância ($p < 0,05$) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância, e para as variáveis de incubatório foi feito o teste t de Student, também a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Foram observadas diferenças entre os tipos de casca para as variáveis % Albúmen, Ind. Gema, Ind. Albúmen e UH (tabela 1), sendo que os ovos de casca normal tiveram médias superiores nessas quatro variáveis, em comparação com os ovos de casca vítrea.

Tabela 1: Qualidade interna de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte.

Variáveis	Tipo de casca	Média	CV	p Valor
% Gema	Normal	32,46	12,12	0,9798
	Vítrea	32,45		
% Albúmen	Normal	53,88 a	11,52	0,0256
	Vítrea	51,71 b		
Ind. Gema	Normal	0,4130 a	9,88	0,0089
	Vítrea	0,3962 b		
Ind. Albúmen	Normal	0,0482 a	29,12	0,0005
	Vítrea	0,0410 b		
UH	Normal	85,21 a	7,60	0,0067
	Vítrea	82,45 b		
pH Gema	Normal	5,96	2,35	0,8929
	Vítrea	5,95		
pH albúmen	Normal	8,62	2,49	0,9592
	Vítrea	8,62		

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância. CV (coeficiente de variação); %Gema e % de Albúmen (porcentagem de gema e albúmen); Ind. Gema e Ind. Albúmen (índice de gema e albúmen), UH (unidade Haugh), pH Gema e pH Albúmen (pH da gema e do albúmen).

O albúmen fornece proteínas, água e eletrólitos para o embrião e a gema fornece energia para as demandas fisiológicas de manutenção, e certa quantidade de água após oxidação lipídica. A energia originada da gema também é utilizada para sintetizar os tecidos e permitir o crescimento embrionário (Rufino *et al.*, 2018).

Segundo Rufino *et al.* (2018) entre o 10° e 12° dia de incubação há um consumo da mistura de albúmen e fluido amniótico, que é absorvida pelo sistema gastrointestinal dos pintos. Ovoalbumina, ovotransferrina e ovomucóide são proteínas de destaque evidenciadas no sangue e continuam a ser detectáveis após a eclosão. A ovomucóide é uma das glicoproteínas do albúmen associada a grande quantidade de carboidratos, sendo que o embrião os utiliza com o objetivo de preservar os aminoácidos para a síntese proteica. Consequentemente a glicose no sangue aumenta de forma progressiva para dar suporte ao fígado e à deposição de glicogênio muscular. Portanto, um albúmen em quantidade e qualidade é essencial para que o embrião possa ter a disposição os nutrientes essenciais para seu completo desenvolvimento.

No momento da postura existe um gradiente de pressão osmótica entre albúmen e a gema, que se acentua depois de forma progressiva, à medida que a água passa do albúmen para a gema (Sauveur, 1993). Se existe alguma anormalidade que interfira na pressão interna a água pode passar mais rapidamente do albúmen para a gema, diminuindo assim o índice de gema. Isso é um fator importante já que o índice de gema é uma variável de qualidade relacionada à estrutura da gema, e que pode influenciar nos índices zootécnicos.

Os ovos de casca vítrea dessa pesquisa apresentaram aumento no diâmetro de albúmen, diminuição na sua altura o que acarretou menor índice de albúmen. Já é conhecido que o ovo fresco tem maior índice de albúmen que o ovo mais velho. Os métodos e condições de armazenamento podem ser importantes para a manutenção da qualidade do ovo (Magalhães, 2007). Após a postura ocorre uma transformação gradativa da ovoalbumina em S-ovoalbumina e a dissociação do complexo ovomucinalisozima, destruindo o albúmen espesso e, conseqüentemente, diminuindo o índice de albúmen (Linden & Lorient, 1996). É necessário um melhor entendimento se os ovos de casca vítrea podem ser mais sensíveis às exposições inevitáveis de estocagens e mudanças de temperatura durante os períodos de armazenamento.

Os ovos de casca vítrea apresentaram médias inferiores aos de casca normal para a variável UH. A utilização da UH, que é a altura do albúmen corrigida para o peso do ovo, como avaliação da qualidade interna, é universal devido à sua fácil aplicação e à alta correlação com a aparência do ovo ao ser quebrado (Lana *et al.*, 2017), sendo um importante parâmetro de qualidade do albúmen, e conseqüentemente do ovo (Rodrigues, 1975). Com o aumento do tempo de estocagem os valores de UH tendem a cair (Silverside *et al.*, 1993), podendo agravar ainda mais a condição dos ovos de casca vítrea, já que na avicultura industrial o armazenamento até a incubação pode chegar a 7 dias.

Diferentemente de um estudo que não relatou diferenças na qualidade interna entre ovos de casca normal e vítrea, em poedeiras comerciais (Vilela *et al.*, 2016), essa pesquisa apresentou maior %Albúmen, Ind. Gema, Ind. Albúmen e UH no tipo de casca normal em relação à casca vítrea. Portanto, sugere-se melhor qualidade interna para os ovos de casca normal de avós de frangos de corte, demonstrando que o tipo de casca tem influência direta na qualidade interna.

Com relação à qualidade externa dos ovos de casca normal e vítrea, não foi encontrada diferença em nenhuma variável estudada (tabela 2).

Tabela 2: Qualidade externa de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte (espessura do polo maior, médio e menor- ESP. PMA, ESP. PMD e ESP. PME; poros do polo maior, médio e menor- POROS PMA, PMD e PME; e Gravidade Específica- GE).

Variáveis	Tipo de casca	Média	CV	p Valor
ESP. PMA	Normal	0,3047	10,55	0.1832
	Vítrea	0,3116		
ESP. PMD	Normal	0,3103	8,47	0.1572
	Vítrea	0,3163		
ESP. PME	Normal	0,3057	9,76	0.0915
	Vítrea	0,3138		
POROS PMA	Normal	124,60	72,93	0.4162
	Vítrea	113,41		
POROS PMD	Normal	111,66	23,50	0.3769
	Vítrea	115,40		
POROS PME	Normal	107,81	24,46	0.8950
	Vítrea	107,26		
GE	Normal	1073,75	0,40	0.7099
	Vítrea	1074,00		

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância. CV (coeficiente de variação); ESP PMA, ESP PMD e ESP PME (espessura polo maior, menor e médio do ovo); POROS PMA, POROS PMD e POROS PME (poros polo maior, menor e médio do ovo); GE (gravidade específica).

Assim como no presente estudo, Vilela et al. (2016) não verificaram diferenças para poros e espessura de casca de ovos normais e vítreos de poedeiras comerciais com 30, 50 e 70 semanas.

A GE, importante parâmetro de qualidade externa, não apresentou diferença entre os tipos de casca nessa pesquisa. A gravidade específica abaixo de 1.080 está negativamente correlacionada com a eclodibilidade, embora não se tenha ainda uma correlação que leve a crer que valores de gravidade específica acima de 1.080 são importantes no aspecto citado (Leeson & Summer, 2009). Fato é que as médias de GE dos dois tipos de casca do presente estudo foram inferiores a 1.080, o que pode ser explicado pela genética, já que quanto mais pura menor é a capacidade reprodutiva das aves (Pereiro, 2008).

Foi avaliada a porcentagem de casca e de minerais da casca (tabela 3), comparando-se os tipos de casca vítrea e normal de avós pesadas, e somente a variável % Mg apresentou diferença, com maior média para o tipo de casca vítrea. Vilela et al. (2016) em estudo com poedeiras relataram que ovos de casca normal apresentaram percentual de cálcio superior em comparação aos ovos de casca vítrea, o que difere do presente estudo que não identificou tal diferença entre os tipos de casca. Os mesmos autores, ao comparar diferentes idades, concluíram que o percentual de cálcio foi menor em ovos de aves jovens (30 semanas) em relação às demais idades.

Costa et al. (2011) descreveram que o magnésio, da mesma forma que o fósforo, tem grande importância na formação da casca do ovo, sendo que a conversão de 25-OHD3 em 1,25(OH)2D3 é dependente desses minerais em níveis adequados e biodisponíveis. Kim et al. (2012) relatou que a suplementação de dietas de poedeiras (72 semanas de idade) com óxido de magnésio, durante cinco semanas, acarretou melhor qualidade da casca (maior espessura e resistência de quebra), o que implicou em menor incidência de ovos quebrados ou sem casca.

Tabela 3: Porcentagem de casca e de minerais da casca de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte.

Variáveis	Tipo de casca	Média	CV	p Valor
% Casca	Normal	10,50	7,72	0.0646
	Vítrea	10,74		
% Ca	Normal	39,18	4,16	0.5986
	Vítrea	39,46		
% P	Normal	0,4498	39,82	0.3223
	Vítrea	0,4992		
% Mg	Normal	0,0306 b	2,18	0.0072
	Vítrea	0,0312 a		

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância. CV (coeficiente de variação); % Casca (porcentagem de casca); % Ca, %P e %Mg (porcentagem de cálcio, fósforo e magnésio).

Barbosa (2015) em um estudo com poedeiras comerciais concluiu que os ovos armazenados durante 21 dias, independente da temperatura de conservação, e tipo de casca (normal ou vítrea), não apresentaram diferença significativa em relação à porcentagem de casca.

Foi verificado o perfil bromatológico de ovos de casca normal e vítrea de avós pesadas (tabela 4), sendo possível verificar que nenhuma variável apresentou diferença entre os tipos de casca.

Vilela et al. (2016) e Carvalho (2018) em estudo com poedeiras relataram que não houve diferença no percentual de matéria mineral nas diferentes idades das poedeiras, assim como entre os tipos de casca normal e vítrea.

As médias de perfuração espermática não apresentaram diferença entre o tipo de casca vítrea e normal (tabela 5). Ou seja, não parece existir uma alguma predisposição à diminuição de fertilidade quando se compara ovos com diferentes tipos de casca.

Tabela 4: Perfil bromatológico de ovos de casca normal e vítrea de avós de frangos de corte.

Variáveis	Tipo de casca	Média	CV	p Valor
MM Gema	Normal	2,14	19,06	0.2236
	Vítrea	1,98		
MS Gema	Normal	53,77	9,61	0.1452
	Vítrea	51,39		
MM Alb.	Normal	0,9310	11,82	0.2095
	Vítrea	0,9765		
MS Alb.	Normal	12,67	9,48	0.8726
	Vítrea	12,73		
PB Gema	Normal	17,14	12,19	0.6414
	Vítrea	16,83		
PB Alb.	Normal	11,75	10,48	0.6415
	Vítrea	11,57		
MM Casca	Normal	96,59	0,35	0.0724
	Vítrea	96,78		
MS Casca	Normal	99,29	0,13	0.5358
	Vítrea	99,26		
EE Gema	Normal	34,48	10,07	0.0804
	Vítrea	32,56		

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância. CV (coeficiente de variação); MM Gema, MM Alb. e MM Casca (matéria mineral da gema, albúmen e casca); MS Gema, MS Alb e MS Casca (matéria seca da gema, albúmen e casca); PB Gema e PB Alb. (proteína bruta da gema e albúmen); EE Gema (extrato etéreo da gema).

Tabela 5: Média de perfuração espermática entre ovos de casca vítrea e casca normal de avós de frangos de corte.

Perfuração Espermática			
Tipo de casca	Média	Desvio Padrão	p Valor
Vítrea	165,923	162,6988	0,928
Normal	162,667	153,0666	

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste Tukey a 0,05 de significância.

As variáveis estudadas após incubação (tabela 6) revelaram haver diferença significativa somente para a perda de umidade, sendo que ovos de casca vítrea apresentaram maior perda na incubação, comparado aos ovos de casca normal. Tal situação pode levar a desidratação do embrião (French, 2010) e também acelerar as trocas gasosas e de calor, fazendo com que os pintos nasçam cronologicamente adiantados, mas fisiologicamente ainda não

desenvolvidos. Isso pode acarretar órgãos menos maduros, e em consequência imunossupressões, dificuldades em digerir e metabolizar os alimentos e, consequentemente, menores índices zootécnicos.

Tabela 6: Comparação entre ovos de casca normal e vítrea sobre os parâmetros de incubatório (experimento 2).

Variáveis	Tipo de casca	Mediana	Desvio Padrão	p Valor
Nascidos totais	Normal	123,60	8,6197	0,1236
	Vítrea	130,40	1,9494	
Eliminados	Normal	2,00	1,5811	0,3880
	Vítrea	3,00	1,8708	
Não eclodidos	Normal	38,40	8,6197	0,1333
	Vítrea	31,80	1,9235	
Inférteis	Normal	10,60	2,7928	0,6043
	Vítrea	9,80	1,7889	
Mortalidade 0-4 dias	Normal	17,60	2,7019	0,0553
	Vítrea	14,20	2,0494	
Mortalidade 5-12 dias	Normal	1,00	0,0000	-
	Vítrea	1,00	0,0000	
Mortalidade 13-18 dias	Normal	1,00	0,70711	1,0000
	Vítrea	1,00	0,0000	
Mortalidade 19-21 dias	Normal	5,60	3,5071	0,4495
	Vítrea	4,20	1,7889	
Bicados	Normal	1,40	1,6733	0,2398
	Vítrea	0,40	0,5477	
Contaminados	Normal	0,40	0,5477	0,5796
	Vítrea	0,60	0,5477	
Trincados	Normal	0,80	0,8367	0,7245
	Vítrea	0,60	0,8944	
Perda de Umidade	Normal	11,18 b	0,5249	0,0441*
	Vítrea	12,08 a	0,6670	
Peso médio do ovo	Normal	60,94	0,5109	0,0919
	Vítrea	60,38	0,4084	
Peso médio dos pintinhos	Normal	42,96	0,8085	0,8863
	Vítrea	42,88	0,8622	
Pintinhos X Ovo	Normal	70,49	1,11375	0,4648
	Vítrea	71,01	0,99229	

Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste t de Student a 0,05 de significância.

É conhecido que os ovos precisam perder em média de 11 a 12% do peso inicial durante a incubação. Se a perda for superior a 12% a umidade da incubadora deve ser aumentada, e se a perda for menor que 11% a umidade da máquina precisa ser diminuída (French, 2010), para que se obtenham melhores resultados de eclodibilidade. Isso é devido à perda de umidade do ovo ser inversamente proporcional à umidade da incubadora (Santos *et al.*, 2005).

A maior parte da perda de umidade nos ovos é pela difusão por meio dos poros da casca para o ambiente (Rahn & Ar, 1974). Alguns estudos demonstraram que cascas de ovos vítreos têm membranas significativamente mais finas do que aqueles de ovos normais (Nie, 2013; Wang *et al.*, 2016). Tal fator pode influenciar diretamente na troca gasosa e perda de água (Tullet, 1990), não pela diferença na quantidade e estrutura dos poros das cascas, mas sim pela resistência da membrana interna da casca do ovo.

É fato que uma casca de boa qualidade (incluindo todas as suas estruturas) é de extrema importância para o desenvolvimento adequado do embrião, o protegendo contra choques mecânicos, dificultando a contaminação por microorganismos, evitando a perda excessiva de água, regulando a troca de gases, e ainda é fonte principalmente de cálcio para o desenvolvimento do embrião (Carvalho & Fernandes, 2013).

Essa avaliação leva a crer que ovos de casca vítrea necessitam de manejos diferenciados de incubação, como por exemplo, serem selecionados e incubados separadamente, utilizar programações específicas nas máquinas incubadoras, a fim de que melhores resultados possam ser alcançados, seja de eclosão ou até mesmo de qualidade final do pintinho.

Leach & Gross (1983) observaram que poedeiras alimentadas com dietas deficientes em manganês produziram ovos com cascas mais finas, com áreas translúcidas e anormalidades na ultraestrutura da casca, particularmente na camada mamilar. Outro estudo relatou uma melhora positiva na resistência à ruptura e tenacidade à fratura nos grupos mais velhos de

aves que receberam dietas suplementadas com Mn, Cu e Zn (Mabe *et al.*, 2003), sendo que pode ser uma alternativa na tentativa de diminuir possíveis efeitos deletérios da casca vítrea.

A translucidez da casca do ovo é um resultado da transferência de umidade do conteúdo do ovo pela membrana da casca e seu acúmulo na casca, levando ao aumento da transmissão de luz (Solomon, 1991). Sugere-se que variações nas estruturas das cascas dos ovos e das membranas das cascas estão implicadas na formação de ovos translúcidos (Wang *et al.*, 2017). Carvalho (2018) relatou maior proporção de matéria orgânica na casca do ovo vítreo de galinhas, por espectrometria Raman, sendo que este achado sugere uma distribuição desuniforme de umidade na casca como responsável por proporcionar a aparência vítrea.

O pintinho de frango de corte, devido aos melhoramentos genéticos, manejo nutricional e de produção, sanidade, ambiência, entre outros fatores, atinge cada vez mais cedo o peso ideal para o abate. Partindo do pressuposto que o peso dos pintinhos ao nascer tem influência também no peso ao abate, a uniformidade e a qualidade da progênie são atributos indispensáveis para a eficiência econômica dos lotes.

Ovos de casca vítrea de avós de frangos de corte apresentaram qualidade interna inferior nos parâmetros %Albúmen, Ind. Gema, Ind. Albúmen e UH, em relação aos de casca normal, além de perderem mais umidade na incubação. Sugere-se então que novos estudos envolvendo avaliações moleculares, como análises proteômicas e metabolômicas comparativas das cascas e membranas da casca dos ovos vítreos e normais, podem ter efeitos importantes na detecção de mecanismos e vias metabólicas que participam da formação de ovos vítreos.

Tais resultados são suficientes para se buscar alternativas que diminuam perdas em eficiência, como novas pesquisas de perfil molecular, além de outras que indiquem possíveis soluções a campo e também manejos de incubação específicos para ovos de casca vítrea.

Referências

- Barbosa LAJ. Qualidade de ovos de casca vítrea e casca normal de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e tempos de estocagem. 2015. 50 f. [Dissertação]. Uberlândia (MG): Universidade federal de Uberlândia; 2015.
- Sindirações. Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal: Métodos Analíticos. 3 ed. São Paulo (SP): Sindirações; 2009.
- Carvalho LSS. Fatores ambientais na produção de ovos de casca vítrea, qualidade de ovos e espectroscopia de casca. [Tese]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia; 2018.
- Carvalho FB, Stringhini JH, Jardim Filho RM, Leandro NSM, Café MB, Deus HASB. Qualidade interna e da casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. *Ciência Animal Brasileira* 2007; 8(1):25-29.
- Carvalho LSS, Fernandes EA. Formação e qualidade da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. *Medicina Veterinária* 2013; 7(1):35–44.
- Chousalkar KK, Flynn P, Sutherland M, Roberts JR, Cheetham BF. Recovery of Salmonella and Escherichia coli from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 142(1–2):207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.029>
- Costa CHR, Barreto SLT, Gomes PC, Hosoda, LH, Lipari CA, Lima HJD. Níveis de fósforo disponível em dietas para codornas japonesas de 45 a 57 semanas de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2011; 40(10):2152-2160. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001000013>

- 356 French NA. Proceedings of Incubation: What the Embryo Needs. In: Incubation 2010 - A One
357 Day Technical Conference; 2010; Utrecht. The Netherlands. p. 01-05.
- 358 Haugh RR. The Haugh unit for measuring egg quality. United States Egg Poultry Magazine
359 1937; 43(1):552-555.
- 360 Kim CH, Paik IK, Kil DY, Chang MB. Effects of increasing supplementation of magnesium in
361 diets on productive performance and eggshell quality of aged laying hens. Biological Trace
362 Element Research 2012; 151:38–42. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9537-z>
- 363 Lana SRV, Lana GRQ, Salvador EL, Lana AMQ, Cunha FSA, Marinho AL. Qualidade de ovos
364 de poedeiras comerciais armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem.
365 Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal 2017; 18(1):140-151.
366 <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-99402017000100013>
- 367 Leach RMJr, Gross JR. The effect of manganese deficiency upon the ultrastructure of the
368 eggshell. Poultry Science 1983; 62(2):499-504. <https://doi.org/10.3382/ps.0620499>
- 369 Lesson S, Summer JD. Broiler Breeder Production. 2 ed. Leicestershire; Reino Unido, Context
370 Products, 2009.
- 371 Lindes G, Lorient D. Bioquímica Agroindustrial: Revalorización Alimentaria de La producción
372 agrícola. 1 ed. Zaragoza; Espanha, 1996.
- 373 Mabe I., Rapp C, Bain MM, Nys Y. Supplementation of a Corn-Soybean Meal Diet with
374 Manganese, Copper, and Zinc from Organic or Inorganic Sources Improves Eggshell Quality in

- 375 Aged Laying Hens. Poultry Science 2003; 82(12):1903-1913.
376 <https://doi.org/10.1093/ps/82.12.1903>
- 377 Magalhães APC. Qualidade de ovos comerciais de acordo com a integridade da casca, tipo de
378 embalagem e tempo de armazenamento. [Dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade
379 Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007.
- 380 Nie, W. Effects of dietary phosphorus levels on laying performance, egg shell quality and Ca
381 and P absorption in laying hens with dwarf gene. [Tese]. Pequim: Chinese Agriculture
382 University; 2013.
- 383 Pereiro, JCC. Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal. 5 ed. Belo Horizonte,
384 Minas Gerais. FEPMVZ, 2008.
- 385 Rahn H, Ar A. The avian egg: Incubation time and water loss. The Condor 1974; 76(2):147-152.
386 <https://doi.org/10.2307/1366724>
- 387 Rodrigues PC. Contribuição ao estudo da conversão de ovos de casca branca e vermelha.
388 [Dissertação]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade
389 de São Paulo; 1975.
- 390 Rufino JPF, Cruz FGG, Filho PAO, Farias TM, Melo LD. Biotecnologias Aplicadas à
391 Reprodução de Aves. 1 ed. Manaus; Amazonas / EDUA; 2018.
- 392 Santa Rosa P, Parker HM, Kiess AS, McDaniel CD. Parthenogenesis in mated Chinese Painted
393 quail (*Coturnix chinensis*) hens decreases sperm-egg penetration and alters albumen

- characteristics. Theriogenology 2016; 86(7): 1695-1704.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.025>
- Santos GCF, Campo EJ, Silva PL. Efeito de linhagem e idade de reprodutoras pesadas e leves sobre a perda de umidade de ovos incubáveis aos 18 dias de incubação, submetidos a diferentes percentuais de umidade relativa. In: Anais da Conferência APINCO de Ciências e Tecnologias Avícolas; 2005; Campinas, São Paulo. Brasil. 21 p.
- SAUVEUR, B. El Huevo para Consumo: bases Productivas. 1 ed. Barcelona; Catalunha / Aedos Editorial; 1993.
- Schmidt GS, Figueredo EAP, Ávila VS. Incubação: Característica dos Ovos Incubados. 1 ed. Concórdia; Santa Catarina / Artigo Embrapa Suínos e Aves, Circular Técnica nº 35; 2003.
- Silversides FG, Twizeyimana F, Villeneuve P. A study relating to the validity of the Haugh unit correction for egg weight in fresh eggs. Poultry Science 1993; 72(4):760-764.
<https://doi.org/10.3382/ps.0720760>
- Solomon SE. Egg & Eggshell Quality. 1 ed. Aylesbury; England / Wolfe Publishing; 1991. DOI:
<https://doi.org/10.1017/S0021859600068878>
- Tullett SG. Science and the art of incubation. Poultry Science 1990; 69(1):1-15.
<https://doi.org/10.3382/ps.0690001>
- Vilela DR, Carvalho LSS, Fagundes NS, Fernandes EA. Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com cascas normal e vítrea. Ciência Animal Brasileira 2016; 17(4):509-518. <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v17i421535>

414 Wang DH, Li YJ, Liu L, Liu JS, Bao M, Yang N, Zhuo-Cheng H. Traits of eggshells and shell
415 membranes of translucent eggs. Poultry Science 2016; 96(2):351-358.
416 <https://doi.org/10.3382/ps/pew328>

CAPÍTULO 3

(Redigido de acordo com as normas da Revista British Poultry Science)

Avaliação proteômica das estruturas da casca de ovos normais e vítreos de reprodutoras pesadas

G. A. Mendonça^{1*}; M. C. A. Silva-Mendonça¹, B. B. Fonseca¹; E. A. Fernandes¹, P. S. Santos², M. S. G. Filho²; L. R. G. Filho²; M. E. Beletti¹

¹*Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG, Brasil.*

²*Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG, Brasil.*

Resumo: 1. Objetivou-se um estudo proteômico das estruturas das cascas de ovos de casca vítrea e casca normal de reprodutoras pesadas.

2. Foram utilizados ovos de quatro lotes de avós de frangos de corte, sendo selecionados 80 ovos férteis, 20 de cada lote (pool de 10 ovos de casca normal e 10 ovos de casca vítrea) pela característica externa da casca. De cada lote foram coletados fragmentos da estrutura da casca (cascas e membranas das cascas), triturados manualmente, homogeneizados e depois selecionado 1 grama de cada lote para formar a análise final, sendo diluído em coquetel inibidor de protease e congelados. As análises por espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo líquido (Agilent Infinity 1260), acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de ionização por eletrospray (Agilent 6520B Q-TOF).

3. Foram identificadas 309 proteínas (2989 peptídeos) diferentes na estrutura da casca entre os tratamentos estudados. Após análise estatística comparando todos os lotes e proteínas, foi identificada diferença somente para duas proteínas (ATPase-A0A1Y4CB63 e OVA fragmentos idêntica à Ovoalbumina- A0A2H4Y8Q2), sendo que as diferenças entre as proporções foram significativamente maiores para casca vítrea. Dentre as proteínas encontradas destacam-se: Ovotransferrina, Ovalbumina, diversos genes da proteína OVA fragmentos, Proteína Y relacionado à Ovoalbumina,

Serotransferrina, Ovomucóide, 2-c-methyl glycerol 4-phosphate cytidylyltransferase, SERPIN, Proteína Não Caracterizada (Gene Ovostatina), Alpha-1-acid glycoprotein, ATPase e Proteína Não Caracterizada (Gene B5G11_16010).

4. É possível supor alguma alteração de expressão gênica no útero, que pode levar a superexpressões proteicas (por exemplo proteína OVA/ Ovoalbumina), com aumento do conteúdo orgânico da matriz e desarranjos nas camadas biomineralizadas de ovos de casca vítrea.

Palavras chave: *Gallus gallus*; Membranas; Proteínas; Translúcido; Umidade.

INTRODUÇÃO

A casca de ovo de aves é um biomaterial composto por membranas não-calcificadas e pela matriz de casca calcificada subjacente (Gautron *et al.*, 2007). Um fator determinante para a manutenção da qualidade do ovo é a integridade da casca, sendo que esta deve ser livre de deformações e trincas que comprometam seu conteúdo interno, causando grandes prejuízos à indústria de ovos de consumo e reprodução (Vilela *et al.*, 2016).

A mineralização da casca ocorre em três fases distintas de calcificação (iniciação, crescimento e terminação), associadas a diversas proteínas da matriz que são secretadas no fluido uterino (Marie *et al.*, 2015). Segundo os mesmos autores o recente desenvolvimento de métodos analíticos levou à identificação de inúmeras proteínas na casca. Mann *et al.* (2006) identificaram 520 proteínas da matriz da casca do ovo de galinhas, por LC-MS/MS, e relataram que quase nada se sabe sobre a função de todas as proteínas identificadas na casca ou durante a formação da casca.

A casca vítrea é caracterizada por diversos pontos na cor cinza claro, com diâmetros variados, espalhados por praticamente toda a superfície do ovo. Tal característica sugere alguma alteração na estrutura da casca, que se torna mais evidente com o aumento no tempo de armazenamento (Vilela *et al.*, 2016). A casca de ovo translúcida é um problema de qualidade, formado por uma interação complexa entre umidade, estrutura da casca do ovo e ambiente externo (Wang *et al.*, 2016).

A análise proteômica permite que quantidades mínimas de proteínas biologicamente ativas no tecido ou fluido possam ser identificadas (Hincke *et al.*, 2012), sendo uma ferramenta importante na tentativa de estabelecer perfis de expressões proteicas e correlacionar suas funções. Portanto, objetivou-se realizar um estudo proteômico comparativo do conjunto de estruturas da casca de ovos de casca vítrea e casca normal de reprodutoras pesadas, com o intuito de identificar proteínas que possam ter relação com esta característica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovos férteis de avós de frangos de corte, provenientes de uma granja localizada no município de Uberaba-MG, coletados no mês de dezembro de 2017. As aves eram arraçadas uma vez ao dia no período do início da manhã e a água era fornecida à vontade. As rações foram formuladas a base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações de exigências nutricionais dos manuais das linhagens.

Os ovos foram encaminhados para o Laboratório de Análise de Matéria Prima e Ração da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LAMRA-UFU). O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética na Utilização de

Animais da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo A004/17, sendo isento de parecer por não manipular diretamente animais.

Os ovos avaliados foram de quatro lotes de avós de frangos de corte da linhagem Ross. A coleta dos ovos na granja ocorreu em ninhos mecanizados, pré-classificados e depositados em bandejas plásticas. Após esse processo as bandejas foram colocadas em caixas plásticas, fumigadas com paraformaldeído e levadas até a sala de ovos, com temperatura controlada (18 a 21° C), no prazo máximo de 2 horas após a postura.

Foram selecionados 80 ovos, 20 de cada lote (10 de casca normal e 10 de casca vítrea) pela característica externa da casca, sendo separados os ovos com casca visivelmente normal e ovos com casca vítrea. Foram excluídos ovos com trincas, quebrados, deformados e visivelmente sujos de fezes. A variação máxima de peso dos ovos selecionados foi de 0,5g, com peso médio de 66 gramas por ovo. Os ovos foram processados no laboratório cerca de 30 horas após a postura.

O delineamento experimental se consistiu em quatro lotes diferentes, como demonstrado:

M-46: linha macho com 46 semanas de idade;

M-38: linha macho com 38 semanas de idade;

F-46: linha fêmea com 46 semanas de idade;

F-38: linha fêmea com 38 semanas de idade.

Foram feitas coletas de fragmentos da estrutura da casca (cascas e membranas das cascas), de um modo que toda a estrutura foi coletada sem retirada de cutículas e membranas. A coleta se procedeu de um pool de 10 ovos de casca normal e 10 ovos de casca vítrea, formando uma amostra final para cada tipo de casca e lote. As estruturas foram lavadas com água destilada, secas em temperatura ambiente por cerca de 2 horas,

e depois trituradas manualmente até que virassem um fino pó. Após essa etapa, 1 grama de cada amostra foi colocada em microtubo e diluída em uma solução de água destilada e 5 μ L de coquetel inibidor de protease. As amostras foram congeladas para avaliação por espectrometria de massas.

Um total de 100 μ g de proteínas (quantificadas por BCA-Bicinchoninic Acid, Pierce BCA Protein Assay Kit- Thermo Scientific) foi submetida à digestão com tripsina. O agente surfactante RapiGest SF (Waters) foi usado para melhorar a eficiência da digestão enzimática. Após redução com Ditioneitol (Sigma-Aldrich) e alquilação com Iodoacetamida (Sigma-Aldrich). A amostra foi submetida à ação da tripsina (Promega) à 37°C por 16 horas. A ação da enzima foi interrompida pela adição de solução de ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich) 0,5%. Os peptídeos obtidos foram então submetidos à purificação em ponteira de C18 (Agilent Bond Elut OMIX). Após a secagem em concentrador de amostra, a mesma foi solubilizada em TFA 0,1% e acondicionada em vial específica para injeção no Espectrômetro de Massa.

As análises de espectrometria de massa foram realizadas em duplicata, em um cromatógrafo líquido (Agilent Infinity 1260), acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de ionização por eletrospray (Agilent 6520B Q-TOF), alocado no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo AdvanceBio Peptide Mapping, 2,1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 μ m, a fase móvel: água (A) e acetonitrila (B) ambas acidificadas com ácido fórmico (0,1% vv-1), com o gradiente: 2% de B (0 min), 2% de B (10 min), 15% de B (40 min), 50% de B (150 min), 70% de B (200 min), 98% de B (220 min), 98% de B (300 min), 100% de B (301 min) e 100% de B (400 min), em um fluxo de 400 μ L/min. Os parâmetros de

ionização foram: pressão do nebulizador de 45 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 325 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4KV.

A identificação das proteínas foi realizada levando em consideração a massa de alta resolução (erro com a massa exata menor que 10 ppm) e os espectros de massa/massa (EM/EM), sendo estes dados cruzados com banco de dados. A análise foi feita no programa Spectrum Mill MS Proteomics Workbench (Agilent Technologies) usando banco de dados online UniProt (2020).

O número total de contagens espectrais (número de peptídeos) de cada proteína foi considerado para análise semiquantitativa, como uma estimativa de abundância (abundância relativa). Cada conjunto de dados de proteínas foi transformado em porcentagem, dividindo o espectro encontrado naquela proteína de determinado grupo pelo número total de espectros daquele grupo (contagem espectral normalizada), para realização do teste estatístico.

Para as análises estatísticas foi feito um teste t pareado (Programa Action) considerando todos os lotes e proteínas (de acordo com as porcentagens descritas acima), com a diferença entre as proporções de cada lote.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem espectral, definida como o número total de espectros (peptídeos) identificados para uma proteína, ganhou aceitação como uma medida prática, sem rótulo e semiquantitativa da abundância de proteínas em estudos proteômicos (Lundgren *et al.*, 2010).

Foram identificadas 309 proteínas diferentes nas 8 amostras avaliadas (Anexo1). O número total de peptídeos encontrados foi de 2.989, sendo 390 no lote M-46 Normal,

301 no lote M-46 Vítreo, 652 no lote M-38 Normal, 303 no lote M-38 Vítreo, 393 no lote F-46 Normal, 267 no lote F-46 Vítreo, 312 no lote F-38 Normal e 371 no lote F-38 Vítreo.

Dentre as proteínas encontradas destacam-se: ovotransferrina, ovalbumina, diversos genes da proteína OVA (fragmentos- semelhante a ovoalbumina), proteína Y relacionada à ovoalbumina, serotransferrina, ovomucóide, 2-c-methyl glycerol 4-phosphate cytidylyltransferase, SERPIN, proteína não caracterizada (gene ovostatina), alpha-1-acid glycoprotein, proteína não caracterizada (gene B5G11_16010-*Drancourtella sp.* An57) e ATPase. Todas essas proteínas apresentaram mais de 10 peptídeos (mínimo de 0,33% de peptídeos em relação ao número total de peptídeos encontrados em todas as amostras), com um total de 2595 peptídeos (86,81% do total).

Dentre as 309 proteínas identificadas nesse estudo, 234 (75,72%) apresentaram apenas 1 peptídeo. A baixa abundância de peptídeos não indica necessariamente que essas proteínas não têm função durante a montagem da casca de ovo ou na regulação dos processos biológicos envolvidos, já que o oviduto contém muitos componentes e enzimas de transdução de sinal que podem ter efeitos importantes em baixas concentrações (Mann *et al.*, 2006).

Rose-Martel and Hincke (2009) revisaram estudos proteômicos da matriz da casca de ovo e definiram que as proteínas formam três grupos característicos. O primeiro é relacionado às proteínas da clara de ovo, como a ovalbumina, lisozima e ovotransferrina. O segundo grupo de proteínas é encontrado em muitos tecidos, como a osteopontina (glicoproteína fosforilada presente no osso e em outros tecidos duros) e a clusterina (glicoproteína secretora amplamente distribuída e encontrada na clara de ovo). O terceiro grupo é de proteínas específicas da matriz da casca do ovo, que são secretadas pelas células em regiões específicas do oviduto e continua até o útero, que

são as ovocleidinas e ovocalixinas. Proteínas dos dois primeiros grupos foram relatadas nesse estudo, porém as específicas da matriz da casca do ovo não foram identificadas, apesar de que proteínas do primeiro e segundo grupo já terem sido identificadas na camada paliçada e cones mamilares da casca do ovo (Jonchere *et al.*, 2010).

Neste estudo não foi realizada a desmineralização da camada da casca do ovo calcificada, com ácido acético a 10%, conforme relata Mann *et al.* (2006), muito provavelmente a tripsina não conseguiu acessar a parte mineralizada para fazer a digestão. Assim, as proteínas da matriz calcificada (inorgânica) comumente encontradas, como ovocleidina e ovocalixina (Mann *et al.*, 2006), não foram identificadas. O uso do ácido acético para desmineralização poderia desnaturar as proteínas da cutícula e membranas da casca do ovo, não sendo possível identificar as proteínas presentes nessas estruturas. Embora não se tenha feito a descalcificação, esse estudo foi o primeiro a considerar a proteômica de todas as estruturas da casca do ovo em conjunto, na busca por possíveis identificações e variações entre as proteínas nos diferentes tipos de casca.

Após análise estatística comparando todos os lotes e proteínas, foi identificada diferença somente para duas proteínas (ATPase- número de acesso A0A1Y4CB63 e Ova fragmentos- número de acesso A0A2H4Y8Q2), sendo que as diferenças entre as proporções dos lotes com casca vítrea e casca normal foram significativamente maiores para casca vítrea.

A proteína OVA foi previamente identificada na espécie *Gallus gallus*. É uma proteína da família SERPIN, e tem pelo menos 90% de identidade com a ovoalbumina (Uniprot, 2020). As funções da proteína OVA não estão claramente definidas, mas levando em conta algumas funções da ovoalbumina, ela pode realizar interação seletiva

e não covalente com íons cálcio (Ca^{2+}), e interação seletiva e não covalente com qualquer protease ou peptidase (Uniprot, 2020).

A maior proporção da proteína OVA (acesso A0A2H4Y8Q2) na casca vítrea, pode estar relacionada com os achados de Carvalho (2018). Em estudo com Espectroscopia Raman a pesquisadora concluiu que ovos de casca vítrea apresentaram maior proporção de componentes orgânicos na matriz da casca do ovo, em comparação com ovos de casca normal, e isso pode levar a um aumento da absorção e permanência da umidade nas estruturas da casca.

O achado desse estudo pode, portanto, levantar pelo menos duas hipóteses. A primeira é que essa proteína, como está presente em grande abundância nas estruturas da casca, pode ser a causa do aumento de material orgânico na casca do ovo e causar algum desarranjo em nível estrutural (matriz e/ou membranas). A segunda hipótese é que essa proteína OVA pode estar super-expressa, justamente para cobrir possíveis falhas primárias de mineralização e estruturação da casca. Gautron et al. (1997) sugerem que podem ocorrer alterações na expressão gênica no útero, e isso causar falhas no processo de mineralização, ocasionado principalmente por uma composição anormal da matriz orgânica da casca.

Solomon (1991) ainda relatou que, em ovos de casca vítrea, muito provavelmente ocorre passagem exagerada de água do conteúdo interno para as membranas e casca e seu posterior acúmulo na casca, levando ao aumento da transmissão de luz. Este quadro pode ocorrer por diferenças na distribuição de material orgânico na casca, com maior proporção de nitrogênio em cascas de ovos translúcidas (Talbot and Tyler, 1974), o que sugere infiltração de proteínas a partir do conteúdo dos ovos para a casca do ovo (Wang *et al.*, 2016).

Segundo Mann e Mann (2015) entre os principais componentes, a matriz de casca de ovo de codorna continha ovalbumina, avidina, proteína semelhante à ovostatina, proteína X relacionada à ovalbumina, ovotransferrina, lisozima C, cistatina e ovomucóide. Esses autores também relataram, após análise comparativa entre espécies, que estas proteínas também foram identificadas em matrizes de casca de ovo de galinhas e perus, em diferentes abundâncias, e que a ovalbumina está entre os componentes mais prevalentes da matriz de casca de ovo.

Já foi demonstrado que ovos vítreos têm membranas significativamente mais finas do que aqueles de ovos normais (Wang *et al.*, 2016). Diferentes tensões de falhas finais da membrana da casca podem alterar a capacidade de amortecimento para expansão térmica, contração e troca de calor do conteúdo do ovo. Isso pode ser causado pelo número de fibras das membranas, composições químicas ou qualquer outra alteração ainda não compreendida (Wang *et al.*, 2016).

O espectro Raman da casca vítrea evidenciou diminuição da intensidade das bandas em torno de 713 cm^{-1} e 1083 cm^{-1} , em algumas das regiões correspondentes a picos de calcita. Apesar da igualdade de composição e distribuição da calcita nos dois tipos de casca, o achado sugere uma diminuição da cristalinidade, o que pode contribuir para a composição do aspecto vítreo da casca (Carvalho, 2018).

Wang *et al.* (2010) relataram que a ovoalbumina modificou a morfologia dos cristais de calcita, através de um processo anisotrópico distinto em relação às quatro arestas dos degraus de cristal, e isso favoreceu a existência de fases instáveis, como carbonato de cálcio amorfo e vaterita cristalina.

Muitas proteínas de clara de ovo influenciam diretamente a mineralização de carbonato de cálcio *in vitro*, sendo que uma grande variedade dessas proteínas são muito

abundantes no fluido uterino, e mesmo a fraca ligação da calcita pode afetar a mineralização (Mann and Mann, 2015).

No presente trabalho foram identificadas também proteínas originadas de células bacterianas, provavelmente incorporadas às estruturas da casca logo antes da oviposição ou por contaminações na manipulação, armazenagem e transporte. Ainda é incerto se proteínas de origem bacteriana são apenas contaminantes ou se podem comprometer alguma estrutura da casca.

É interessante destacar que a proteína ATPase também apresentou maior diferença entre proporções em ovos de casca vítrea. Esta proteína é proveniente de uma bactéria denominada *Anaerofilum spp* (Uniprot, 2020). Yu et al. (2010) identificaram que dez isolados do intestino de galinhas foram capazes de transformar DON em DOM-1, que é uma forma menos tóxica da micotoxina Deoxinivalenol (DON). Os dados de sequência dos genes 16S rRNA parciais indicam que os dez isolados pertencem a quatro grupos bacterianos diferentes: *Clostridiales*, *Anaerofilum*, *Collinsella* e *Bacillus*.

A presença de micotoxinas (DON e aflatoxinas) no milho oferecido a poedeiras (25 semanas de idade) durante dez semanas causou efeitos adversos à qualidade dos ovos, influenciando negativamente a espessura da casca, unidades Haugh e gravidade específica (Lee et al., 2012). A partir desses entendimentos, pode-se levantar a hipótese do envolvimento de micotoxinas até mesmo no aparecimento da casca vítrea, e que a presença em maior quantidade de bactérias inibidoras dessas toxinas pode indicar também a maior presença das toxinas.

Rath *et al.* (2017) avaliaram a proteômica de membranas de casca de ovos incubáveis, e identificaram diversas proteínas abundantes de clara de ovo, como ovalbumina, ovotransferrina, ovocleidina-116 e lisozima, além de várias proteínas associadas às funções citoesqueléticas, de sinalização celular, antimicrobiana e catalítica

que envolvem carboidrato, ácido nucleico e metabolismo proteico. Os autores também identificaram 50 proteínas pertencentes a diferentes espécies de famílias gram-positivas, gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas de bactérias que incluíam *Candidatus*, *Enterococci*, *Yersinia* e *Butyrivibrio* e várias fitobactérias (*Sphingomonas taxi*), *Nocardioide* (bactérias do solo) e uma bactéria marinha (*Hyphomonas marinobacter adhaerens*). A maioria das proteínas bacterianas identificadas pertencia a *Pseudomonas M10*, uma família de bactérias gram-negativas seguida por *Candidatus*, *Hyphomonas* e *Sphingomonas*.

A membrana da casca do ovo forma uma matriz para elementos enzimáticos e proteicos. Em um estudo proteômico de membranas de casca de ovos de galinhas em diferentes estágios de incubação, foi detectado um total de 62 proteínas. Destas, apenas duas já tinham sido identificadas em membranas da casca do ovo: ovotransferrina e queratina. outras oito proteínas encontradas foram: lisozima c, precursor de ovalbumina, ovotransferrina, clusterina, proteína tenp, precursor de ovomucóide, ovocalixina 32 e precursor de ovocalixina 36 (Kaweewong *et al.*, 2013). Esses mesmos autores ainda relataram que pelo menos quatro proteínas (avidina, ovomucina, b-n-acetilglucosaminidase e colágeno tipo I, V, X), já observadas na membrana da casca do ovo, não foram detectadas possivelmente pela utilização de diferentes métodos que podem afetar a capacidade de extração. O presente estudo também não identificou essas quatro últimas proteínas em nenhum dos grupos.

As proteínas homólogas EDIL3, clusterina, ovocalixina 32, ovocalixina 36, precursor da ovalbumina e ovotransferrina estão relacionadas à biomineralização do carbonato de cálcio. Nas membranas da casca a ovalbumina e a ovotransferrina promovem a nucleação dos esferulitos de carbonato de cálcio no estágio inicial da deposição da casca de ovo (Kaweewong *et al.*, 2013).

A proteína Tenp foi relatada no presente estudo somente no grupo M-38 normal (6 peptídeos). Kaweewong *et al.* (2013) descreveram que essa proteína esteve presente no 1º ao 9º da incubação, e que ela é uma forte proteína bactericida (causa danos à membrana de bactérias Gram-negativas) e de aumento da permeabilidade (BPI).

Mann *et al.* (2006) identificaram 520 proteínas da matriz da casca do ovo de galinhas, por espectrometria de massas. Algumas proteínas identificadas como a clusterina, lisozima e osteopontina têm um papel específico na formação da casca de ovo ou na casca formada, sendo que a clusterina foi identificada somente no lote M-38 Normal (2 peptídeos) e a lisozima somente no lote M-46 Normal (2 peptídeos). A matriz da casca do ovo não contém apenas proteínas produzidas pelo epitélio da glândula da casca, mas também de outras seções do oviduto (Mann *et al.*, 2006). Essas proteínas podem desempenhar diversas funções moleculares, de processos biológicos e de biomineralização.

Segundo Kaweewong *et al.* (2013) a proteína Lisozima é encontrada em grande quantidade na membrana limitante que circunda a clara do ovo, nas membranas da casca e na matriz calcificada da casca, sendo que ela foi encontrada em todas as fases de incubação dos ovos. Essa proteína exibe diversas propriedades antimicrobianas, além de que a lisozima da matriz da casca pode fornecer proteína estrutural solúvel, que pode promover a deposição de carbonato de cálcio durante a calcificação.

Rose-Martel *et al.* (2012) avaliaram a proteômica da cutícula (membrana externa) da casca do ovo de galinhas. Algumas proteínas identificadas pelos autores citados também foram encontradas neste estudo com grande número de peptídeos, como ovoalbumina, ovotransferrina, proteína Y relacionada à ovoalbumina e algumas em menor prevalência como lisozima e clusterina. Ahlborn e Sheldon (2006) relataram a

presença de algumas proteínas de defesa química, como a lisozima e ovotransferrina, na membrana da casca do ovo.

Uma proteína identificada somente no lote M-38 Normal (proteína não caracterizada- número de Acesso A0A1D5P3R8) com 2 peptídeos é relativa ao gene OVST (ovostatina). Essa proteína tem a importante função de interromper, prevenir ou reduzir a atividade de endopeptidases, quaisquer enzimas que hidrolisam ligações peptídicas não-terminais em polipeptídeos (Uniprot, 2020). A proteína ovostatina foi previamente descrita em cutícula de casca de ovos de galinhas (Rose-Martel *et al.*, 2012) e está presente em todos os compartimentos dos ovos (Marie *et al.*, 2015).

Outra proteína encontrada somente no lote M-38 Normal com 3 peptídeos e no lote F-38 Normal com 1 peptídeo (proteína não caracterizada- Número de Acesso A0A1D5P3R8), é a relativa ao gene SPINK5, com identidade (> 90%) com a proteína ovoinibidora. A função molecular relatada para esse gene também inclui a inibição da endopeptidase (Uniprot, 2020). A proteína ovoinibidora foi previamente descrita em cutícula de casca de ovos de galinhas (Rose-Martel *et al.*, 2012).

As proteínas da clara de ovo, como ovalbumina, lisozima c e ovotransferrina, foram invariavelmente encontradas entre as principais proteínas das matrizes de casca de ovo (Mann *et al.*, 2006; Mann and Mann, 2013; Mann and Mann, 2015). A proteína ovoalbumina foi a segunda proteína mais encontrada em análise proteômica de casca de casca de ovo de codornas (Mann and Mann, 2015) e perus (Mann and Mann, 2013), assim como no presente estudo. Foi relatado que uma abundância de ovalbumina na membrana da casca do ovo indica uma provável função como proteína de armazenamento durante o desenvolvimento embrionário (Kaweewong *et al.*, 2013).

No presente estudo foram identificadas algumas fosfoproteínas importantes também relatadas por Mann and Mann (2015) na matriz de casca de ovo de codornas,

como SERPIN, ovoalbumina e osteopontina. Já a proteína ovocleidina 116, importante fosfoproteína de matriz de casca de ovo, não foi encontrada no presente estudo. Já foi relatado que a fosforilação afeta potencialmente os processos de biomineralização (Alvares, 2014), sendo que a identificação dessas proteínas e de seus locais de fosforilação podem trazer informações importantes.

A ovoalbumina e ovotransferrina estão entre as proteínas mais abundantes no fluido uterino (Marie *et al.*, 2015), sendo que ambas foram identificadas em grande abundância nas estruturas das cascas dos ovos normais e vítreos nesse estudo. Hincke (1995) and Gautron *et al.* (2001) reportaram a grande concentração dessas proteínas no líquido uterino na fase inicial, um estágio considerado crucial para a estrutura final da casca.

Alguns autores observaram que a ovalbumina e a ovotransferrina se ligam aos íons Ca^{2+} e modificam a morfologia do cristal de calcita *in vitro*, sugerindo que eles possam desempenhar um papel ativo durante a fase inicial da calcificação da casca (Hincke, 1995; Wang *et al.*, 2010). Hincke *et al.* (2012) concluíram que a ovotransferrina se liga a cristais menores e promove o desenvolvimento de cristais alongados nas cascas dos ovos.

A proteína SERPIN, foi encontrada em todos os grupos em diferentes expressões nessa pesquisa. SERPIN é uma proteína de ligação a glicosaminoglicanos, que também foi relatada no fluido uterino de galinhas segundo Marie *et al.* (2015). Esses autores ainda relataram que os proteoglicanos são os principais atores da calcificação no processo de biomineralização.

Marie *et al.* (2015) relataram que a proteína clusterina está presente em níveis significativamente aumentados no estágio inicial da formação da casca, regulando a

montagem das proteínas da matriz. Essa proteína foi encontrada somente no grupo M-38 Normal.

Segundo Mann *et al.* (2006) várias proteínas secretadas em outras partes do oviduto, além da glândula da casca, podem se difundir até esse local através do fluido do oviduto, podendo assumir ou não funções específicas na mineralização. Outras moléculas ainda podem ter sido liberadas por células em decomposição que revestem o oviduto.

Rikimaru and Takahashi (2009) encontraram DNA nuclear materno na casca de ovo calcificada de galinhas, sugerindo que uma variedade de constituintes celulares é incorporada passivamente à casca de ovo durante a sua formação, o que vai de acordo com alguns achados nesse estudo, como as proteínas Mitogen-activated protein kinase e DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, ambas da espécie *Gallus gallus*.

Li *et al.* (2016) reportaram que 2250 proteínas foram identificadas de forma confiável no epitélio da glândula da casca da galinha, o que demonstra a grande variabilidade de proteínas que podem ser encontradas na casca, e também a ampla gama de funções que estas podem desempenhar para formação e biomineralização da casca.

Muitas proteínas liberadas da matriz da casca de ovo por descalcificação são baixas em abundância (Hincke *et al.*, 2012). Mann *et al.* (2006) consideraram que os constituintes da matriz da casca de ovo podem surgir de uma mistura complexa de proteínas derivadas do útero, incluindo proteínas originárias de células degradadas e também associadas ao oviduto proximal (membrana da clara de ovo, gema e membrana vitelina). Isso sugere que uma variedade de constituintes celulares é incorporada passivamente à casca do ovo durante a sua formação (Hincke *et al.*, 2012).

A grande variedade de proteínas encontradas nesse estudo foi oriunda de diversas origens das próprias aves, como oviduto proximal, útero, glândula da casca,

DNA materno (provavelmente restos celulares de descamação), além de diversas proteínas de origem bacteriana. Todas essas proteínas podem exercer diversas funções relacionadas às estruturas da casca, ainda pouco conhecidas. As interações entre essas proteínas podem causar um interessante efeito em rede, sendo ainda uma incógnita quais são as características dessas redes, como elas variam e como são preservadas *in vivo*.

As proteínas da membrana da casca do ovo (membrana interna e externa) desempenham um papel primordial no arranjo de suas estruturas, podendo influenciar na passagem de conteúdos entre a parte interna, a casca e o meio exterior (umidade, calor, proteínas). Supõe-se que as características de ovos com casca vítrea possam também ter origem em alterações proteicas das membranas da casca, com alterações no arranjo das suas fibras.

Entretanto, parece mais razoável crer em alguma alteração de expressão gênica no útero (Gautron *et al.*, 1997), nas diversas fases de formação das estruturas da casca, o que pode levar a superexpressões proteicas (por exemplo proteína OVA/ Ovoalbumina), aumento do conteúdo orgânico da matriz (Carvalho, 2018) e desarranjos nas camadas biomineralizadas (Hincke *et al.*, 2012). Esses últimos autores ainda reforçaram essa ideia quando relataram que concentrações elevadas de proteínas da clara do ovo afetam o crescimento de cristais de calcita.

Sugere-se, inicialmente, que o controle da umidade e temperatura dos ambientes de estocagem e transporte de ovos incubáveis, desde a coleta nas granjas até serem colocados nas incubadoras, seja um fator que possa amenizar o aparecimento de ovos de casca vítrea. O manejo de incubação específico para ovos vítreos também deve ser estudado, já que esses ovos podem perder mais umidade e calor dentro das máquinas, diminuindo a eficiência do processo.

Outras pesquisas de perfil molecular, como proteômicas comparativas específicas de cutícula, matriz e membranas das cascas dos ovos, devem ser consideradas na busca por melhores interpretações das causas relacionadas às cascas vítreas.

Complementos futuros para os resultados dessa pesquisa podem ser interessantes, visto que técnicas como Western Blotting e Elisa podem confirmar com maior precisão as diferenças de abundância das proteínas descritas (Faça *et al.*, 2008), à partir da seleção de candidatos com diferenças nas suas expressões. A metabolômica, interactômica e outros ramos de pesquisa molecular podem contribuir com a determinação das funções, vias metabólicas e interações entre as diversas proteínas já descritas.

Além de identificar 309 proteínas que podem desempenhar inúmeras funções no processo de formação da casca do ovo de galinhas reprodutoras, esses achados também abrem novas perspectivas e sugere novas áreas de investigação molecular na busca pelas causas que levam ao aparecimento da casca vítrea. O uso da contagem espectral (contagem de peptídeos) é conveniente e informativo na pesquisa proteômica (Gilchrist *et al.*, 2006), mesmo gerando dados relativos de abundância das proteínas.

REFERÊNCIAS

- AHLBORN, G.J., CLARE, D.A., SHELDON, B.W., KELLY, R.W. (2006). Identification of eggshell membrane proteins and purification of ovotransferrin and b-NAGase from hen egg white. *The Protein Journal*, 25: 71-8. <https://doi.org/10.1007/s10930-006-0010-8>
- ALVARES, K. (2014) The role of acidic phosphoproteins in biomineralization. *Connective Tissue Research*, 55: 34–40. <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.867336>
- CARVALHO, L.S.S. (2018) Fatores ambientais na produção de ovos de casca vítrea, qualidade de ovos e espectroscopia de casca. [Thesis]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia, 105 p.
- FAÇA, V.M., VENTURA, A.P., FITZGIBBON, M.P., PEREIRA-FAÇA, S.R., PITTERI, S.J., GREEN, A.E., IRETON, R.C., ZHANG, Q., WANG, H., O'BRIANT, K.C., DRESCHER, C.W., SCHUMMER, M., MCINTOSH, M.W., KNUDSEN, B.S., HANASH, S.M. (2008) Proteomic Analysis of Ovarian Cancer Cells Reveals Dynamic Processes of Protein Secretion and Shedding of Extra-Cellular Domains. *Plos One*, 3: e2425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002425>
- GAUTRON, J., HINCKE, M.T., NYS, Y. (1997) Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages 296 of eggshell formation in hens. *Connective Tissue Research*, 36: 195–210. <https://doi.org/10.3109/03008209709160220>
- GAUTRON, J., HINCKE, M.T., PANHELEUX, M., GARCIA-RUIZ, J.M., BOLDICKE, T., NYS, Y. (2001) Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell

membranes and basal calcified layer. *Connective Tissue Research*, 42: 255-67.

<https://doi.org/10.3109/03008200109016840>

GAUTRON, J., MURAYAMA, E., VIGNAL, A., MORISSON, M., MCKEE, M.D., REHAULT, S., LABAS, V., BELGHAZI, M., VIDAL, M.L., NYS, Y., HINCKE, M.T. (2007) Cloning of Ovocalyxin-36, a Novel Chicken Eggshell Protein Related to Lipopolysaccharide-binding Proteins, Bactericidal Permeability-increasing Proteins, and Plunc Family Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 5273–5286. DOI: [10.1074/jbc.M610294200](https://doi.org/10.1074/jbc.M610294200)

GILCHRIST, A., AU, C.E., HIDING, J., BELL, A.W., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J., LESIMPLE, S., NAGAYA, H., ROY, L., GOSLINE, S.J.C., HALLETT, M., PAIEMENT, J., KEARNEY, R.E., NILSSON, T., BERGERON, J.J.M. (2006) Quantitative Proteomics Analysis of the Secretory Pathway. *Cell*, 127: 1265–1281. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.036>

HINCKE, M.T. (1995) Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. *Connective Tissue Research*, 31: 227-33. <https://doi.org/10.3109/03008209509010814>

HINCKE, M.T., NYS, Y., GAUTRON, J., MANN, K., RODRIGUEZ-NAVARRO, A.B., MCKEE, M.D. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, 17: 1266-1280. DOI: [10.2741/3985](https://doi.org/10.2741/3985)

JONCHÈRE, V., RÉHAULT-GODBERT, S., HENNEQUET-ANTIER, C., CABAU, C., SIBUT, V., COGBURN, L.A., NYS, Y., GAUTRON, J. (2010) Gene expression

profiling to identify eggshell proteins involved in physical defense of the chicken egg.

BMC Genomics, 11:57. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-57>

KAWEEWONG K., GARNJANAGOONCHORN, W., JIRAPAKKUL, W., ROYTRAKUL, S. (2013) Solubilization and Identification of Hen Eggshell Membrane Proteins During Different Times of Chicken Embryo Development Using the Proteomic Approach. *Protein Journal*, 32: 297–308. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9487-0>

LEE, J.T., JESSEN, K.A., BELTRAN, R., STARKL, V., SCHATZMAYR, G., BORUTOVA, R., CALDWELL, D.J. (2012) Effects of mycotoxin-contaminated diets and deactivating compound in laying hens : 2 . Effects on white shell egg quality and characteristics. *Poultry Science*, 91: 2096–2104. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02137>

LI, G., SUN, C., WU, G., SHI, F., LIU, A., YANG, N. (2016) ITRAQ-based quantitative proteomics identifies potential regulatory proteins involved in chicken eggshell brownness. *PLoS ONE*, 11: 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168750>

LUNDGREN, D.H., HWANG, S., WU, L., HAN, D.K. (2010) Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Review Proteomics* 7: 39–53. <https://doi.org/10.1586/epr.09.69>

MANN, K., MACEK, B., OLSEN, J.V. (2006) Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics*, 6: 3801–3810. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600120>

MANN, K., MANN, M. (2013) The proteome of the calcified layer organic matrix of Turkey (Meleagris gallopavo) eggshell. *Proteome Science*, 11: 40.
<https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-40>

MANN, K., MANN, M. (2015) Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: A comparison to chicken and turkey eggshell proteomes. *Proteome Science*, 13: 1–19.
<https://doi.org/10.1186/s12953-015-0078-1>

MARIE, P., LABAS, V., BRIONNE, A., HARICHAUX, G., HENNEQUET-ANTIER, C., NYS, Y., GAUTRON, J. (2015) Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *Journal of Proteomics*, 113: 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.024>

RATH, N.C., LIYANAGE, R., MAKKAR.S.K., LAY JR, J.O. (2017) Protein profiles of hatchery egg shell membrane. *Proteome Science*, 15: 4.
<https://doi.org/10.1186/s12953-017-0112-6>

ROSE-MARTEL, M., DU, J., HINCKE, M.T. (2012) Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal of Proteomics*, 75: 2697–2706.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.019>

ROSE-MARTEL, M. AND HINCKE, M.T. (2009) Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins. *Cellular and Molecular Life Science*, 66: 2707–2719.
<https://doi.org/10.1007/s00018-009-0046-y>

RIKIMARU, K. and TAKAHASHI, H. (2009) A simple and efficient method for extraction of PCR-amplifiable DNA from chicken eggshells. *Animal Science Journal*, 80: 220-223. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00624.x>

SOLOMON, S.E. (1991) *Egg & Eggshell Quality*. Vol. 1, 149 p. (Aylesbury, Wolfe Publishing). <https://doi.org/10.1017/S0021859600068878>

TALBOT, C.J. and TYLER, C. (1974) A study of the fundamental cause of natural translucent areas in egg shells. *British Poultry Science*, 15: 197–204. <https://doi.org/10.1080/00071667408416096>

UNIPROT. (2020) *Proteins data bank, Inc.* Available on: <http://www.uniprot.org/>, Accessed on: Jan 1st 2020.

VILELA, D.R., CARVALHO, L.S.S., FAGUNDES, N.S., FERNANDES, E.A. (2016) Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com cascas normal e vítrea. *Ciência Animal Brasileira*, 17: 509–518. <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v17i421535>

WANG, D., HUA, L., GAO, Y., LIU, J., YANG, X., NING, Z. (2016) Research Progress on Formation of Translucent Eggshell. *China Poultry*, 38: 44–48.

WANG, X., WU, C., TAO, K., ZHAO, K., WANG, J., XU, H., XIA, D., SHAN, H., LU, J.R. (2010) Influence of Ovalbumin on CaCO₃ Precipitation during in Vitro Biomineralization. *Journal Physical Chemistry B*, 114: 5301-5308. <https://doi.org/10.1021/jp1008237>

WANG, X., KONG, R., PAN, X., XU, H., XIA, D., SHAN, H., LU, J.R. (2009) Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization. *Journal of Physical Chemistry B*, 113: 8975-8982. <https://doi.org/10.1021/jp810281f>

YU, H., ZHOU, T., GONG, J., YOUNG, C., SU, X., LI, X-Z., ZHU, H., TSAO, R., YANG, R. (2010) Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. *BMC Microbiology*, 10: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-182>

ANEXO 1

Quadro com todas as proteínas encontradas, números de acesso, massa molecular (Daltons), e quantidade total de peptídeos por proteína e em cada lote (M-46: linha macho com 46 semanas; M-38: linha macho com 38 semanas; F-46: linha fêmea com 46 semanas; e F-38: linha fêmea com 38 semanas) e tipo de casca (Nomal e Vítreo).

Número de Acesso	Proteínas	Massa Molecular (Da)	Total de peptídeos	M-46 Normal	M-46 Vítreo	M-38 Normal	M-38 Vítreo	F-46 Normal	F-46 Vítreo	F-38 Normal	F-38 Vítreo
P02789	Ovotransferrin	79600,9	302	38	28	81	22	32	28	34	39
E1BQC2	Ovotransferrin	85428,4	292	37	25	72	23	32	28	35	40
A0A2H4Y814	OVA (fragments)	43207,8	242	27	23	40	32	37	22	29	32
A0A2H4Y7T6	Ovoalbumin	43162,7	240	26	23	40	32	37	22	29	31
A0A2H4Y7V4	OVA (fragments)	43193,8	240	26	23	40	32	37	22	30	30
A0A2H4Y8G0	OVA (fragments)	43207,7	236	25	23	39	31	36	23	28	31
A0A2H4Y8M4	OVA (fragments)	43223,8	230	26	22	36	32	37	19	28	30
A0A2H4Y7S6	OVA (fragments)	43281,9	228	27	22	36	32	35	19	28	29
A0A2H4Y8H6	OVA (fragments)	43241,9	182	26	17	37	19	24	17	17	25
A0A2H4Y8Q2	OVA (fragments)	43226,8	176	25	16	36	18	21	17	18	25
I0J178	Ovoalbumin- related protein Y	44056,7	62	6	7	20	2	10	8	5	4
P02787	Serotranferrin	79344,7	32	2	3	16	1	3	1	0	6
P01005	Ovomucoid	23675,1	32	5	4	4	2	5	5	4	3
A0A1Y4P1R4	2-c-methyl glycerol 4-phosphate cytidylyltransferase	28793,3	31	5	7	7	0	9	0	0	3
A0A1D5PI58	Serpin domain-containing protein	43854,8	20	1	3	8	0	2	2	3	1
A0A1Y4FXM9	Uncharacterized protein (Gene OVST)	77473	15	2	1	4	1	2	2	1	2

A7UEB0	Aplha-1-acid glycoprotein	22549,2	14	2	0	5	1	2	0	1	3
A0A1Y3W8L4	Uncharacterized protein (Gene B5G11_16010)	41757,9	11	2	2	1	2	2	0	1	1
A0A1Y4CB63	ATPase	94585,2	10	1	2	2	2	0	1	0	2
A0A3Q2UC95	VWFD domain-contaning protein	53119	8	0	2	1	1	0	3	1	0
A0A1C0VZ88	Dehydrogenase	37974,8	7	2	1	1	2	0	0	1	0
A0A146J2V2	Protein TENP	47727,7	6	0	0	6	0	0	0	0	0
A0A1D5PN26	Exostosin glycosyltransferase 1	53198,5	6	2	2	1	0	1	0	0	0
U1I2J0	tRNA uridine 5- carboxymethylaminometh yl modification enzyme MnmG	19996,5	5	1	1	1	0	0	0	1	1
A0A0N1MQI0	Chemotaxis protein CheA	46942,6	5	1	0	2	0	0	0	0	2
A0A023KQH2	ChuX-like family protein	63649,7	5	1	0	0	0	0	2	1	1
A0A1Y4E1K1	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein CoaBC	103468	4	2	0	1	0	0	1	0	0
A0A3Q2UJ85	Uncharacterized protein (Gene SPINK5- Ovoibithor)	51998,3	4	0	0	3	0	0	0	1	0
A0A1Y4LJT8	Integration host factor subunit alpha	33878	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4HFN5	Imidazole glycerol phosphate syntase subunit Hisf	28429,9	3	0	0	3	0	0	0	0	0
A0A1Y4LMN4	Transcriptional regulatory protein	26567,7	3	1	0	1	0	1	0	0	0
A0A1Y3TMT4	Flavodoxin 5 domain- containing protein	20703,5	3	0	1	0	0	0	1	0	1
A0A109DF66	LytR family trancriptional regulator	41119,1	3	0	0	3	0	0	0	0	0

A0A1Y3VНК8	Uncharacterized protein	21593,8	3	0	0	1	1	0	0	1	0
A0A1Y3TNC0	Uncharacterized protein	26120,5	3	2	0	0	1	0	0	0	0
A0A0S7AMU7	Short-chain dehydrogenase-reductase SDR	27133,9	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A0D6G3G9	Methyl viologen efflux MFStransporter SmvA	70418,9	3	0	1	1	0	0	0	0	1
A0A1Y3V037	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing)	60216,1	3	1	1	0	0	1	0	0	0
A0A1Y3Z937	3-phosphoglycerate dehydrogenase	72490,4	3	0	0	0	2	0	0	0	1
A0A1Y4VV59	Uncharacterized protein	38624,5	3	1	1	0	0	0	1	0	0
A0FFK9	Hemagglutinin	61671,4	3	0	1	0	0	2	0	0	0
A0A1Y4WLJ3	Amidohydro_3-domain- containg protein	22527,8	3	0	0	3	0	0	0	0	0
A0A1Y4AGI7	Two-component sensor histidine kinase	72454,9	3	3	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3VVE9	Thioredoxin domain- containig protein	37202,7	3	1	0	1	0	0	0	0	1
A0A1L1RKY9	Caldesmon	60267,7	2	0	0	2	0	0	0	0	0
A0A1D5P3R8	Uncharacterized protein	167899	2	0	0	2	0	0	0	0	0
Q9YGP0	Clusterin	51975,1	2	0	0	2	0	0	0	0	0
A0A1Y4WDX9	tRNA (Adenosine (37)- N6)- thereonlycarbomyltransfer ase complex ATPasesubunit 1 TsaE	17173,7	2	0	0	0	0	0	0	1	1
AOA1Y3XSF1	Probable potassiumtransport system protein kup	75678,9	2	1	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4UP86	Cysteine desulfurose NifS	43240,5	2	0	1	1	0	0	0	0	0
B8YJN9	Lysozyme	16675,8	2	2	0	0	0	0	0	0	0

A0A1Y4FL76	Heavy metal translocating P-type ATPase	64080,3	2	1	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3TG06	ABC tranp aux domain-containing protein	55458,5	2	0	0	0	0	1	1	0	0
A0A1Y4TKA5	Pyridine nucleotide-disulfide oxireductase	48744,3	2	0	0	2	0	0	0	0	0
A0A1Y4LWB9	ArsC family transcriptional regulator	38986,6	2	0	1	0	0	0	0	0	1
A0A174NFR6	RagB-SusD family nuterient uptake outer membrane protein	12829,4	2	0	0	0	0	0	0	0	2
A0A1Y4T5Z2	Alanine transporter	32947,5	2	0	0	2	0	0	0	0	0
A0A1Y4GKF6	Ppx-GppA domain-containing protein	36270	2	0	0	0	0	0	2	0	0
A0A1Y4S4L5	Cyclic-di-AMP phosphodiesterase	32417,5	2	0	1	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4F1Z6	Uncharacterized protein	89594,9	2	0	0	1	0	1	0	0	0
A0A2U2V4G9	Uncharacterized protein	106934	2	0	0	0	0	0	1	1	0
A0A4Q1X4S9	Phage portal protein	41117,6	2	0	0	1	0	1	0	0	0
A0A1D5NXJ8	Uncharacterized protein	10504,3	2	0	0	0	1	0	0	0	1
A0A1Y3UZX3	Esterase	66815,9	2	0	0	2	0	0	0	0	0
A0A1Y3S0S0	Collagen-binding protein	58335,5	2	0	0	0	0	0	1	0	1
A0A0X5F516	DNA helicase	55106,6	2	1	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4S0S4	Aldo/keto reductase	57175,6	2	1	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4AB67	TonB-dep_Rec domain-containing protein	29631,7	2	0	0	0	0	1	0	0	1
A0A1Y3Y5P3	Uncharacterized protein	55749,5	2	0	0	0	1	0	1	0	0
A0A1Y4B224	Uncharacterized protein	35753,8	2	0	0	2	0	0	0	0	0
A0A1Y3VHU5	OMP_b-brl_3 domain-containing protein	46405,3	2	1	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4FAN9	Uncharacterized protein	52230,3	2	0	0	1	0	0	0	0	1

A0A385XM78	Amino-acid permease RocE	98096,6	2	0	0	0	0	0	0	2	0
A0A1Y4MRB2	Uncharacterized protein	51826,4	2	0	0	0	0	0	2	0	0
A0A1Y4G059	DNA helicase	67236,5	2	2	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4FDI2	Uncharacterized protein	200424	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4UL50	Uncharacterized protein (fragment)	32418,4	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4WJE4	Small multidrug export protein	18227,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A076JCH8	DNA-binding response regulator	26459,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3U798	Reverse rubrerythrin	20854,1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y3WDD1	AB hydrolase-1 domain-containing protein	36439,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4B214	ABC transporter permease	64927,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AOA1D5PAQ0	Ig-like domain-containing protein	10500,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4KLE4	Carbamoyltransferase	82418,7	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A3Q2TU08	Vitellogenin-2	162875	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3SCI7	MFS transporter	207198	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3UN34	DUF218 domain-containing protein	43367,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1C7FJR1	Dihydroxyacetone kinase	52190,4	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y3YRT0	Anti-sigma factor	45638,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4RQ23	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyl adenosine synthase	64863,3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A4U7T9B8	Galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	55370,5	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y3TIP7	Ribonuclease Y	8185,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0

A0A1Y4FNP4	Glyco trans 2-like domain-containing protein	58295,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3WZX5	Lipid Kinase	53929	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3V2D8	Integrase	74110,2	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y3U8D7	Sodium:proton antiporter	89842,9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4P1M5	Uncharacterized protein	72216,6	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4L582	Uncharacterized protein	143795	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3W4Q3	Uncharacterized protein	45523,4	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3V3D3	DNA helicase	15875,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1C0W138	NADH dehydrogenase	77805,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A0N1MNS3	Aminotranferase Deg T	93313,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4KXB5	LysR family transcriptional regulator	43616,8	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y3WN94	8-amino-7-oxononanoate synthase	34555	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4V4S8	Conjugal tranfer protein TraE	43536	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4HK51	Thiamine biosynthesis protein ThiF	86779,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4D2L9	Uncharacterized protein	18388,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1L1RT64	Myosin motor domain-containing protein	102183	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4UIR0	Type III-A CRISPR-associated RAMP protein Csm3	262563	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A0S7ARW3	UDP-glucose lipid carrier tranferase	25015,3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5PIQ9	G domain-containing protein	37938,6	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4VF53	Fimbrillin_C domain containing protein	69262,7	1	1	0	0	0	0	0	0	0

A0A1L1RK07	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	58262	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4BAZ3	Uncharacterized protein	477327	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5P775	Transcriptional activator GLI3	52995,7	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y4NXT6	ATO-binding protein	172658	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1D5PXC6	Mitogen-activated protein kinase	66849,8	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4H4Q0	SusD-RagB family nuteient-bindingouter membrane lipoprotein	483343	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3WLI2	Uncharacterized protein	9550,8	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3UCT5	Uncharacterized protein	83286,8	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y4NPV0	Uncharacterized protein	45719,1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3W0C5	Polysacc_synt_C domain containing protein	12066,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4DDY4	GTPase Hfix	189348	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y3WYQ0	Uncharacterized protein (fragment)	59936,1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3THQ5	Histidinol-phosphate aminotransferase	8096,2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3YIP3	Uncharacterized protein	40816,3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4DVN9	Serine-threonine protein phosphatase	36568,5	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y3UBP5	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	37465	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3WZ47	Aldehyde dehydrogenase	59043,9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3WBR7	Uncharacterized protein	38705,3	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4JPQ1	UPF 0597 protein B5F24_08365	96971,7	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4PS95	Transporter	46327,6	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4RDU4	Uncharacterized protein	147503	1	0	0	1	0	0	0	0	0

A0A1Y4H5T5	Vitamin B12 dependent methionine synthase activation subunit	71262,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A3Q2TSI0	Uncharacterized protein	25091,3	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4B0I9	HTH marR-type domain-containing protein	147895	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3TUZ6	Uncharacterized protein	18597,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A2T5D868	Zinc ABC transporter substrate-binding protein AdcA	7383,5	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3T250	Peptidase	57718,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4GSZ0	AAA family ATPase	99380,7	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4KVK3	Fibronectin type-III domain-containing protein	47877,9	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4F057	Phosphatase	255297	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y3XTT3	Uncharacterized protein	31133,9	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4D3W4	Transglutaminase	32320,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4J2N4	Uncharacterized protein	99917,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
F1P0T4	Uncharacterized protein	54968,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3U7A1	Transcription terminator factor Rho	61002,1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y3WGP0	Cell division protein FtsZ	84804,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4R343	Voltage-gated chloride channel protein	42097,1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A133CSJ3	YkoY family integral membrane protein	44416	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y3TET9	Aspartyl/glutamyl-tRNA aminotransferase subunit B	25064,9	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A0D6HNR0	L-idonate 5-dehydrogenase	55661,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4JF19	Uncharacterized protein	37737,5	1	0	0	0	0	0	0	1	0

A0A1Y4JVV6	SusC-RagA family TonB-linked outer membrane protein	68999,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4GME8	Asp-23/Gls24 family envelope stress response protein	129520	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3QYP4	Uncharacterized protein	18811,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A3R0C2Z9	Uncharacterized protein	86382,3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3TE86	TrpR protein	7639,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4C7V8	Uncharacterized protein	11437,6	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4DWK2	Phosphoribosylamine-glycine ligase	105588	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4FMC3	Transporter	45277,5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4BT49	Uncharacterized protein	114208	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Q6IAX5	Transcriptional regulator	14420,3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1D2KGE6	Methulphosphotriester-DNA alkyltransferase	111296	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3Y6T7	Uncharacterized protein	21779,5	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4FTW8	Peptidase U32	17865,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
T1RZ97	Hemagglutinin	91434,2	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1C0VZG3	Uncharacterized protein	63007,2	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A2S5U4Y7	ATP-denpendet endonuclease	21539,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3R8L0	Uncharacterized protein	72252,9	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A481WKJ0	Uncharacterized protein	134903	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3TAM7	Ribonucleoside triphosphate reductase	122277	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4AIT3	Efflux transporter periplasmic adpator subunit	90402,4	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4LRD8	Uncharacterized protein	36596,9	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Q5ZJJ2	Replication protein a 70 kDa-binding subunit	53425,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4CAA5	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing)	68741,3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4I067	Restriction endonuclease	58502,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4MAR0	Elp3 domain-containing protein	50365	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4GQC3	DNA polymerase III subunit gamma/tau	37200,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1V4FLY1	Glucokinase	68866,4	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4W8T8	Uncharacterized protein	34662,5	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4DBT6	Molybdenum cofactor guanylyltransferase	60650	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1M2IZK0	RecBCD enzyme subunit RecD	25375,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4GP63	B-12 binding domain-containing radical SAM protein	77400,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3WAH9	Beta-galactosidase	73108,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4USH0	TlyA family rRNA (Cytidine-2-O)-methyltransferase	100614	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A3Q2UB21	Uncharacterized protein	30015,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3W7R3	HATPase_c_5 domain-containing protein	108249	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4IWD5	DUF 4906 domain-containing protein	51331,5	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y3VFR6	Peptidase S8	104318	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4I8X0	SusC-RagA family TonB-linked outer membrane protein	55373,6	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y3RSY9	TIGR02680 family protein	129899	1	0	0	1	0	0	0	0	0

A0A1Y4NWH4	Protein GrpE	161421	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4S2C3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	27620,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1L1RW22	CTP_transf-like domain-containing protein	36831,4	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y3UEW9	Uncharacterized protein	24488,6	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3WQK6	HTH tetR-type domain-containing protein	43413	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4E2A8	TPR_REGION domain-containing protein	24969,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D2LGG2	Thioredoxin reductase	48241,5	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3WJH7	Phage tail protein	34547,2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
H9L0M3	Histone-lysine N-methyltransferase	17910	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y3Z1S6	Endonuclease	341016	1	0	0	0	0	1	0	0	0
F5VG09	Uncharacterized protein	34618	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y3QSR1	Two-component sensor histidine kinase	17980,3	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3XZ56	UvrABC system protein C	57831,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3VNQ3	Uncharacterized protein	78758,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4S7P1	ABC transporter	56521,9	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A411NYU2	Hemagglutinin	71998,1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4E0R7	30S ribosomal protein S4	63869,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A4Q1YQ43	Radical SAM protein	22920,1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4BJG7	Aminotransferase	48268,8	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A2K3TR46	Lactaldehyde reductase	45442,7	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1C2D5H3	Catabolite control protein A	40637,8	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1D5P6M3	Aamy domain-containing protein	37148,6	1	0	0	0	1	0	0	0	0

A0A1Y3VWV2	Uncharacterized protein	81154,1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4I1K4	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	48540,9	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3S360	Pyruvate phosphate dikinase	17627,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4VLZ7	Acyl-CoA dehydrogenase	100884	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4G4E8	Transcription-repair-coupling factor	41494,8	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A0J2AXQ8	Nitrite reductase	127217	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4H2Z1	2-isopropylmalate synthase	94333,8	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4W9T8	Uncharacterized protein	63184,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4FAM5	PTS beta-glucoside transporter subunit EIIBCA	48715,9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1D5PMY8	Uncharacterized protein	69054,1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3UZA9	Alpha-glucosidase	99689,6	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A449ENA9	LacI family transcriptional regulator	74987,7	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4A637	IS110 family transposase	36610,1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3X0G2	Uncharacterized protein	45730,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4IFF8	Chorismate synthase	110726	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3T225	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit Hisf	39849,3	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3X458	Uncharacterized protein	45886,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Q0WYK7	D-alanine--D-alanine ligase	306452	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3YQK8	GNAT family N-acetyltransferase	37955,8	1	0	0	0	0	0	0	1	0
E2QLK8	Cardiolipin synthase A	19862,2	1	0	0	0	0	1	0	0	0

A0A3Q3AWE6	Uncharacterized protein	132074	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4KNL6	Phage prohead protein	225294	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4DSL0	Uncharacterized protein	22613,4	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1D5PSL5	Uncharacterized protein	35081,1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
E3WD48	Plamid replication control	228770	1	0	0	0	0	1	0	0	0
B6V3H8	CAPN2	11594,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3TP24	Alongation factor P	80123,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4CD86	Uncharacterized protein	21008,4	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4EMH1	NPCBM domain-containing protein	9442,6	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4HIH8	Uncharacterized protein	233411	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A0K2HDJ5	O-antigen ligase domain-containing protein	52450,2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4DKC3	Ribonuclease PH	63310,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4A8Z5	VKc domain-containing protein	26514,6	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A346B147	DUF 4373 domain-containing protein	37426,7	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y4CR98	Uncharacterized protein	35630,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4F5L7	Uncharacterized protein	51451	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4AGX3	Xaa-Pro Aminopeptidase	28017,3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3UFX2	60 kDa chaperonin	51625	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A4Q0U855	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyl-adenosine synthase	57167	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4CWJ9	DNA helicase	50945	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1D2LDZ6	Orotidine 5'Phosphate decarboxylase	101430	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1D5P2B7	Nuclear factor NK-kappa-B p100 subunit	25498,7	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y3URI7	SAF domain-containing	99797	1	0	0	0	1	0	0	0	0

	protein										
A0A1Y3TST2	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransfer ase	55487,2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4RXR6	Uncharacterized protein	36522,1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A4Q0L9H4	Uncharacterized protein	34031,9	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y3XAQ2	Uncharacterized protein	9864,2	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4CTD7	Arginine-tRNA ligase	51230,3	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4VSH9	Uncharacterized protein	62180,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Q5ZI51	ADP ribose glycohydrolase ARH3	56505,8	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y4Q1H3	Glutamine--fructose-6- phosphate aminotransferase	40365	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4NZY8	TPR_REGION domain- containing protein	66148	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4BTX8	Uncharacterized protein	41745,5	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y4L0J2	UDP-N- acetylglucosamine--N- acetylmuramyl- (pentapeptide)pyrophosph oril-undecaprenol N- acetylglucosamine	13328,6	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A3V7IB14	Uncharacterized protein	39701,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4GMF8	N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase	36632,9	1	0	0	0	0	0	1	0	0
U1I6H8	AAA domain-containg protein	22007,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4GBG8	Amidophosphoribosyltran sferase	69336,6	1	0	0	0	0	0	0	0	1
A0A1Y3T173	Uncharacterized protein	49844,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4CYC0	TraG-D_C domain-	11965,6	1	1	0	0	0	0	0	0	0

	containg protein										
A0A1Y4NZF2	Uncharacterized protein	77362,6	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y4VM67	SusC-RagA family TonB-linked outer membrane protein	123245	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y4BAJ2	Uncharacterized protein	126312	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y4G0N3	Lactamase_B_domain-containing protein	25808,3	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4CJL0	Uncharacterized protein (fragment)	33400,5	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1D5PM68	Uncharacterized protein	89944,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4SAB8	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase	146530	1	0	0	0	0	0	1	0	0
A0A1Y4GNM9	Multifunctional fusion protein	37235,7	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4PEJ5	Uncharacterized protein	51778,6	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4QKE5	DNA polymerase IV	27522,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4WCU5	Plastocyanin	45985,3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A0N0LU54	Uncharacterized protein	46012,7	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4WP93	B-12 binding domain-containing protein	27744,4	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3R5R2	Uncharacterized protein	29100,3	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4DWP5	Uncharacterized protein	26461,3	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4AIH1	UPF 0234 protein B5F89_06840	101725	1	0	0	1	0	0	0	0	0
F1P174	Peptidase_M3 domain-containing protein	18328,4	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A174QJ66	RNA polymerase sigma E-factor	91027,4	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A346AWP5	Filamentus hemagglutinin N-terminal domain-	19391,5	1	0	1	0	0	0	0	0	0

	containg protein										
A0A4P9PZK5	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	46155,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4GMX7	MarR family transcriptional regulator	47067,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4CJS2	Uncharacterized protein	32970,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4HHC9	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase	34390,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4AR03	Usp domain-containing protein	35677,8	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y4B7L3	Uncharacterized protein	16822,9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A2U2UUE5	Integrase	21114,9	1	0	0	0	0	1	0	0	0
A0A1Y3QTG8	Uncharacterized protein	42236,9	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4IGQ9	Uncharacterized protein	23820,9	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4R306	2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase	65391,8	1	0	0	0	0	0	0	1	0
A0A1Y4FRW3	HTH marR-type domain-containing protein	158563	1	0	0	0	1	0	0	0	0
A0A1Y4BE00	Acetyltransferase	16919,8	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A3L3AUL3	Phosphonate C-P lyase system protein PhnL	16395,2	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y3V134	Transcriptional regulator	24847,2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
A0A1Y4FTX7	Glutamate--cysteine ligase	64474,8	1	0	1	0	0	0	0	0	0
A0A1Y4TUI1	DNA replication protein DnaD	47978,6	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Total			2989	390	301	652	303	393	267	312	371

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi evidenciado que ovos de casca vítrea de avós de frangos de corte, apresentam qualidade interna inferior em relação aos ovos de casca normal, além de perderem mais umidade na incubação. A maior quantidade da proteína OVA (idêntica à Ovoalbumina- acesso A0A2H4Y8Q2) na casca vítrea sugere maior proporção de componentes orgânicos nesse tipo de casca (já que é uma das proteínas mais abundantes em várias avaliações), em comparação com ovos de casca normal, e isso pode levar a um aumento da absorção e permanência da umidade nas estruturas da casca.

À partir dos achados é possível supor que alguma alteração de expressão gênica no útero pode levar a superexpressões proteicas (por exemplo proteína OVA/ Ovoalbumina), com aumento do conteúdo orgânico da casca e desarranjos nas camadas mineralizadas de ovos de casca vítrea. Sugere-se manejo de incubação específico para ovos de casca vítrea, já que esses ovos perdem mais umidade dentro das máquinas. Devem ser consideradas outras pesquisas de perfil molecular, como proteômicas comparativas entre as estruturas da casca, metabolômica, interatômica, técnicas como Western Blotting e Elisa que podem confirmar com maior precisão as diferenças de abundância das proteínas descritas, a partir da seleção de candidatos com diferenças nas suas expressões.

ANEXO

NORMAS BRAZILIAN JOURNAL OF POULTRY SCIENCE

Instruções para autores

A publicação da Revista Brasileira de Ciência Avícola é coordenada pela comissão editorial da FACTA (Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas). Todas as conclusões e resultados publicados são de responsabilidade integral do(s) autor(es).

A Revista Brasileira de Ciência Avícola é publicada trimestralmente e aceita apenas trabalhos originais de pesquisa que sejam relevantes à área de ciência avícola. As áreas consideradas para publicação são: Bioquímica e Biologia Celular; Construção, Ambiente e Bem-estar; Aves Silvestres; Produção e Manejo; Imunologia, Doenças Avícolas e Controle; Aves de Postura e Produção de Codornas; Nutrição; Fisiologia, Genética, Reprodução e Incubação; Tecnologia, Processamento e Segurança Alimentar.

O objetivo principal da Revista é o de publicar artigos científicos e técnicos completos, assim como revisões de literatura na área de ciência avícola, escritos por pesquisadores e especialistas da área. Os autores que gostariam de publicar uma revisão de literatura, um editorial ou uma revisão técnica devem entrar em contato com o editor da Revista.

Todos os manuscritos devem ser enviados em inglês e serão avaliados de modo confidencial e imparcial.

O envio de um manuscrito à Revista Brasileira de Ciência Avícola significa que:

1. O artigo nunca foi publicado.
2. O artigo não está sendo enviado para publicação em outro lugar.
3. Todos os autores aprovaram o envio do artigo a Revista Brasileira de Ciência Avícola.
4. Todos os autores obtiveram permissão para publicar por parte dos empregadores ou instituições às quais são filiados.
5. As permissões necessárias, incluindo a aprovação ética, foram obtidas. Serão desconsiderados os trabalhos que descrevam experimentos que demonstrem uma falta de preocupação com os padrões éticos e de bem estar animal.

O manuscrito deve ser enviado pelo sistema ScholarOne: <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbca-scielo>, as outras correspondências devem ser enviadas preferencialmente por email ou por correio para:

Brazilian Journal of Poultry Science**FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas**

Avenida Andrade Neves, 2501

13070-001 – Campinas, SP, Brasil

Tel. 55 (19) 3243-6555

Fax. 55 (19) 3243-8542

E-mail: revista@facta.org.br

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO**Artigos científicos**

O manuscrito deve conter os resultados de pesquisas originais que contribuem de modo relevante para o avanço da ciência avícola. Se alguma parte dos resultados já tiver sido publicada anteriormente como um resumo ou pequeno trabalho em algum evento científico, esta informação precisa constar no trabalho. Manuscritos que tragam novos conceitos, metodologias ou abordagens experimentais inovadoras terão prioridade.

O manuscrito deve ter as seguintes sessões:

Título

Autor(es)

Endereço para correspondência

Resumo

Palavras-chave

Introdução

Materiais e métodos

Resultados

Discussão

Referencias

Agradecimentos que devem ser incluídos após a Discussão

As sessões Resultados e Discussão podem ser apresentadas em conjunto. O resumo deve ter no máximo 250 (duzentas e cinquenta) palavras. As palavras-chave devem vir imediatamente após o resumo, em ordem alfabética, devem ser no máximo 5 (cinco) e devem ser palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do artigo.

Notas técnicas e Estudos de caso

Notas técnicas e estudos de caso devem ter a mesma estrutura de artigos científicos, incluindo as sessões (Introdução, Resumo, Material e métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências). Estas devem ser apresentadas em um texto com no máximo 1000 (mil) palavras, sem contar o Resumo e Referências, e não devem conter mais de três figuras e/ou tabelas.

Artigos técnicos

Artigos técnicos devem apresentar o desenvolvimento de novas metodologias e/ou técnicas que possam ser utilizadas de modo a contribuir para a área de ciência avícola. Estes artigos devem ter todas as sessões dos artigos científicos.

Editoriais e Revisões de convidados

Editoriais e Revisões de convidados serão publicadas somente através de convite. As revisões devem seguir as normas editoriais dos artigos científicos, porém sem as sessões Materiais e Métodos, Resultados e Discussão.

LAYOUT DO MANUSCRITO

1. **Formato:** cada manuscrito original deve ser devidamente identificado pelo título e nome(s) do(s) autor(es). A fonte utilizada deve ser Arial (tamanhos de fonte: 16pt para o título, 14pt para os subtítulos no corpo do texto e 12pt para o corpo do texto), em espaçamento duplo e em papel A4 (21,0 x 29,7cm) com margens de 1,5 cm. As linhas e páginas devem ser numeradas consecutivamente. O manuscrito deve ser salvo em .doc (Microsoft Word ou editor de texto compatível). Somente nomenclaturas oficiais e reconhecidas serão aceitas. Abreviações não devem ser utilizadas no título.
2. **folha de rosto:** todos os manuscritos devem ter uma folha de rosto com o título, o(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) e a instituição de origem. Uma nota de rodapé com o endereço para correspondência completo e o email do autor a quem principal deve ser incluída nesta página.

3. **Tabelas:** as tabelas devem ser numeradas consecutivamente em números indo-arábicos e devem ter um título descritivo. Todas as explicações devem ser dadas em uma legenda imediatamente abaixo da figura. Todas as abreviações que apareçam na tabela devem ser explicadas nesta legenda, mesmo que sejam também explicadas no corpo do texto. As tabelas devem poder ser compreendidas sem qualquer referência ao corpo do texto.
4. **Ilustrações (fotografias, gráficos e desenhos):** as ilustrações devem ser numeradas consecutivamente em números indo-arábicos e devem ser enviadas no mesmo documento (arquivo) mas em páginas separadas, que devem também trazer o nome do artigo, o(s) nome(s) do(s) autor(es) e a indicação do local no corpo do texto onde a ilustração deve aparecer. Fotografias, figuras e material escaneado devem ser enviados em alta resolução (no mínimo 600 dpi) e no formato .tif ou .jpg. As figuras serão publicadas em preto e branco. Um acordo em relação aos custos da impressão colorida deve ser firmado caso o autor deseje publicar as ilustrações coloridas.
5. **Unidades:** o Sistema Internacional de Unidades (SI) deve ser usado para medidas e abreviações.
6. **Referências:** as referências devem aparecer em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do autor. A lista completa de referências deve ser mencionada. Todos os autores de cada artigo devem ser citados.

Exemplos:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. Poultry Science 1997; 76(1):83-90.

Bouzoubaa K, Nagaraja KV. Epidemiological studies on the incidence of salmonellosis in chicken breeder/hatchery operations in Morocco. In: Snoeyenbos GH, editor. Proceedings of the International Symposium on Salmonella; 1984; Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists; 1985. p.337.

Briceno WNO, Guimarães FCR, Cruz FGG. Efeitos da densidade populacional de frangos de corte em época quente no município de Manaus. In: 10º Congresso Brasileiro de Avicultura; 1987; Natal, Rio Grande do Norte. Brasil. p. 131-2.

Gabriel JE. Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis do seu mRNA no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1996.

Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. Poultry Science 1997; 76(1):91-5.

Simon VA, Oliveira C. Vacinação em avicultura através da água de bebida. In: Macari M, editor. Água na avicultura industrial. Jaboticabal: Funep-Unesp; 1996. p. 73-85.

Summers JD, Leeson S. Commercial poultry nutrition. 2 ed. New York; N.Y / State Manual Book & Periodical Services; 1997.

7. **Citações no corpo do texto:** o sobrenome do autor deve ser seguido pelo ano em parênteses. No caso de dois autores, os dois sobrenomes devem aparecer. No caso de mais de dois autores, a citação deve ser feita usando-se o sobrenome do primeiro autor seguido pela expressão *et al.* (em itálico).

Exemplos: Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno et al. (1987)

8. **nomes científicos de microorganismos:** seguir as recomendações do Berg's Manual
9. **Taxas:** a taxa para publicação é de US \$ 400,00 (quatrocentos dólares) por artigo aprovado.
1. **Versão editorada:** Uma versão editorada e diagramada será enviada ao autor cujos dados para correspondência aparecem na página de rosto do manuscrito. Eventuais correções feitas pelo autor nesta versão devem ser retornadas em até três dias, preferencialmente via fax. O editor se reserva o direito de enviar o manuscrito para a impressão sem o envio da versão editorada ao autor. O editor não deve ser considerado responsável por eventuais erros que apareçam no artigo publicado.
1. **Direitos autorais:** a transferência dos direitos autorais do artigo à FACTA é uma das condições para publicação na Revista Brasileira de Ciência Avícola. Os autores podem usar o artigo após a publicação sem autorização prévia da FACTA contanto que os devidos créditos sejam dados à Revista como o local original de publicação. Os autores são responsáveis pela obtenção de permissões para reproduzir no artigo materiais de outras fontes que sejam protegidos por direitos autorais.

Instructions to the Authors

The publication of the Brazilian Journal of Poultry Science is coordinated by the Publishing Committee of FACTA (APINCO Foundation of Poultry Science and

Technology). All published research data and conclusions are of authors' full responsibility.

The Brazilian Journal of Poultry Science is published quarterly and the journal will consider for publication only original research material relevant to the field of poultry science. Considered subject areas will include: Immunology, Biochemistry and Cellular Biology, Housing and Environment, Wasting Control, Avian Diseases, Nutrition, Genetic Improvement, Physiology and Breeding, Management, Egg Production, Meat Technology, and Wild and Exotic Birds and Quail Production.

The journal's main objective is to publish complete scientific and technical papers as well as literature reviews in the area of poultry science written by researchers and poultry science specialists. Authors wishing to submit a review, guest editorial or technical review should contact the journal's editor.

All submitted manuscripts will be evaluated in a total confidential and impartial way. Manuscripts should be submitted in the **English language only**.

Submission of a manuscript to the Brazilian Journal of Poultry Science implies that:

1. it has not been previously published;
2. it has not being submitted for publication elsewhere;
3. all authors have approved the submission;
4. all authors have obtained permission from their employer or institution to publish it, and
5. that relevant permissions, including ethical approval, has been obtained. Papers describing experiments which demonstrate a lack of concern of current ethical and welfare standards will not be considered for publication.

The manuscript and other correspondence should be sent preferentially by e-mail: <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbca-scielo>

PREPARING THE MANUSCRIPT

Full length article

It should contain the results of original research which contributes in a relevant way to the development of poultry science. If part of the results has been published previously as a summary or short paper in scientific events, it must be stated. Priority will be given to manuscript presenting new concepts, methodologies or innovative experimental approaches.

The manuscript should have the following sections:

Title

Abstract

Introduction

Material and Methods

Results

Discussion

References

Acknowledgements should be included after Discussion.

The sections Results and Discussion can be presented jointly if preferred. The Abstract should contain up to 250 (two hundred and fifty) words, followed by the key words in alphabetic order, limited to 5 (five) words which correspond to words or expressions that identify the contents of the article.

Short communications and Case Reports should have the same layout as full length papers, including the headings (Introduction, Abstract, Material and Methods,

Result, Discussion, Acknowledgments and References). They should be presented in a text with up to 1000 words (plus Abstract and References) and should contain no more than three tables and/or figures.

Technical article

Technical articles should present the development of new methodologies and/or techniques that can be applied to improve poultry production. These should follow the editorial norms including all sections of the scientific article.

Guest Editorial and Invited Review

Both Guest Editorial and Invited Review will be published by invitation only. The review should follow the norms of the scientific article without the sub-items of Material and Methods, Results and Discussion and preserving all others present in a full length manuscript.

LAYOUT OF THE MANUSCRIPT

1. **Cover Page:** all manuscripts should have a cover page with the title, complete name(s) of the author(s) and institution of origin. A footnote mentioning the complete address (e-mail is essential) of the author to whom correspondence should be addressed.

2. **Tables:** must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text. Tables must have a descriptive title. All explanatory information should be given in a footnote below the table. All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text. Tables must be understandable without referring to the text.
3. **Illustrations (photographs, graphs, drawings):** must be numbered consecutively with Arabic numerals. All figures should be submitted on separate pages with the title of the article, name(s) of the author(s) and indication of the part of the text where they should appear.

Photographs, figures and scanned material must be sent in high resolution (minimum 600 dpi, .tif or .jpg format). The figures will be published in black and white. Previous expenses agreement is needed if the author wishes to publish color photos and or figures.

4. **Units:** the International Metric System must be used for units and abbreviations.
5. **References:** these should be arranged in alphabetic order by the author's last name. The complete title of the journal should be mentioned. All authors of the article must be cited.

Examples:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. *Poultry Science* 1997; 76(1):83-90.

Bouzoubaa K, Nagaraja KV. Epidemiological studies on the incidence of salmonellosis in chicken breeder/hatchery operations in Marocco. In: Snoeyenbos GH, editor. *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*; 1984; Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists; 1985. p.337.

Briceno WNO, Guimarães FCR, Cruz FGG. Efeitos da densidade populacional de frangos de corte em época quente no município de Manaus. In: 10º Congresso Brasileiro de Avicultura; 1987; Natal, Rio Grande do Norte. Brasil. p. 131-2.

Gabriel JE. Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis do seu mRNA no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1996.

Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poultry Science* 1997; 76(1):91-5.

Simon VA, Oliveira C. Vacinação em avicultura através da água de bebida. In: Macari M, editor. *Água na avicultura industrial*. Jaboticabal: Funep-Unesp; 1996. p. 73-85.

Summers JD, Leeson S. Commercial poultry nutrition. 2 ed. New York; N.Y / State Manual Book & Periodical Services; 1997.

6. **Quotations in the text:** state the last name of the author followed by the year in parenthesis. In the case of two authors both should be stated. In the case of more than two authors the quotation should be given by the last name of the first author followed by the expression *et al.* (in italic).

Examples: Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno *et al.* (1987)

7. **Scientific names of microorganisms:** must follow Berg 's Manual recommendation.
 8. **Fees:** the author(s) will be charged US\$ 400,00 (four hundred dollars) per edited article and the payment should be made previously the publication. No reprints will be supplied to authors as the articles are shown at www.scielo.br/rbca
 9. **Manuscript Proof:** will be sent to the corresponding author, who should be identified on the cover page of the manuscript. Corrected proof should return within three days, preferable by fax. The Editor reserves the right to forward the manuscript to press without submitting the final proof to the author. The Editor shall not be hold responsible for any mistakes shown in the final publication.
 10. **Offsprints:** There is no free offsprints. They can be provided after Editor consultation.
 11. **Copyright:** it is a condition of publication that the authors issue copyright of their article to FACTA. Authors may use the article after the publication without prior permission from FACTA, provided that acknowledgement is given to the journal as its original source of publication. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce in the text copyright material from other sources.
 12. **Submission:** manuscript should be submitted via ScholarOne at: <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbca-scielo>.
-

NORMAS BRITISH POULTRY SCIENCE

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements.

AUTHORSERVICES

Supporting Taylor & Francis authors

For general guidance on every stage of the publication process, please visit our [Author Services website](#).

EDITINGSERVICES

Supporting Taylor & Francis authors

For editing support, including translation and language polishing, explore our [Editing Services website](#)

SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

The instructions below are specifically directed at authors who wish to submit a manuscript to *British Poultry Science*. For general information, please visit the Author Services section of our website.

British Poultry Science considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to *British Poultry Science*, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere. Authors who fail to adhere to this condition will be charged with all costs which *British Poultry Science* incurs and their papers will not be published.

Contributions to *British Poultry Science* must report original research and will be subjected to review by referees at the discretion of the Editorial Office. Papers reporting experiments, observations, modelling and methodological approaches that advance knowledge of poultry science will be considered for publication. *British Poultry Science* will also consider high quality review papers covering particularly important current topics.

Further information about the journal including links to the online sample copy and contents pages can be found on the [journal homepage](#).

Please note that *British Poultry Science* uses CrossCheck™ software to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *British Poultry Science* you are agreeing to any necessary originality checks your paper may have to undergo during the peer review and production processes.

MANUSCRIPT SUBMISSION

All submissions should be made online at the [British Poultry Science ScholarOne Manuscripts site](#). New users should first create an account. Once logged on to the site, submissions should be made via the Author Centre. Online user guides and access to a helpdesk are available on this website.

Manuscripts may be submitted in any standard format, including Word, EndNote and PDF. These files will be automatically converted into a PDF file for the review process. LaTeX files should be converted to PDF prior to submission because ScholarOne Manuscripts is not able to convert LaTeX files into PDFs directly. **There are no submission fees, publication fees or page charges for publication in *British Poultry Science*.** For any queries relating to Manuscript Central please email bps@tandf.co.uk.

Click [here](#) for information regarding anonymous peer review

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's responsibility

to ensure the soundness of data. Any errors in the data rest solely with the producers of the data set(s).

MANUSCRIPT PREPARATION

General guidelines

- Papers are accepted only in English. British English spelling and punctuation is preferred. Please use double quotation marks, except where “a quotation is ‘within’ a quotation”.
- Papers must be double-spaced, leaving a margin of at least 40 mm on the left-hand side. Pages of text and references should be numbered at the top right hand corner.
- All the authors of a paper should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. One author should be identified as the corresponding author. The affiliations of all named co-authors should be the affiliation where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after the article is accepted.
- For all manuscripts non-discriminatory language is mandatory. Sexist or racist terms should not be used.
- Authors must adhere to SI units. Units are not italicised.
- When using a word which is or is asserted to be a proprietary term or trade mark, authors must use the symbol ® or TM.

Layout

Most manuscripts will be divisible into conventional form, but if another seems more appropriate the authors should consult the Editor. The conventional form comprises the following sections.

Abstract. *A series of numbered sentences or numbered short paragraphs briefly describing the purpose, approach, results and conclusions of the work, not to exceed 5% of the length of the following text (excluding references).*

Keywords

Please include 5-8 keywords of terms relevant to your specific work, which are not used in the title. Preferably some of the keywords should be selected from [this list](#).

Introduction. A description of background material to explain why the work was undertaken or culminating in a hypothesis. The object of the study should be clearly stated. Only representative, relevant references should be quoted.

Materials and Methods. A description of the broad outline of the approach taken and descriptions of the methods used *in sufficient detail to allow the work to be repeated*.

Results. A description of the findings.

Discussion. A consideration of the findings in relation to other published information and any initial hypothesis. The final paragraph(s) should present conclusions, but a separate heading is not required.

Acknowledgements. Brief formal acknowledgements may be included.

References. The journal uses the [Chicago Author-Date reference style](#), with the modification that, where a paper has 3 or more authors, the in-text citation should cite the first author only.

The author is wholly responsible for the accuracy of the references.

Data availability statement. If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.

Data deposition. If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.

Tables & Figures

These should follow the List of References.

Tables

- Tables should be strictly limited in number and authors should consider whether a point can be made without a Table, by a description and a few values in the text.
- Each Table must be presented on a separate page, be numbered (except if it is the only Table) and be described by a brief informative title.
- Specific points of detail should be made in numbered footnotes.
- Very large Tables may cause difficulties in reproduction and should be avoided.
- Supplementary data may be stored in a data banking system and a reference included to register this fact.

Figures

- Figures should only be included if they impart information not given in Tables.
- Where values may be of intrinsic interest a Table is preferable.
- Measures of variance are as important in Figures as in Tables. Lines must be bold and all symbols or hatching clear; symbols and points should be neat, well-defined (e.g. open or closed squares, circles or triangles) and unambiguous.
- Diagrams and line drawings should be clear- and bold - in black, on white.
- All Figures should be submitted larger than they are expected to appear in the Journal.
- Approximate positions in the text should be indicated.
- Explanatory captions should be brief but sufficient and typed where prompted on file upload.
- Where appropriate a scale marker should be included and top and bottom indicated.
- They should be identified as images/photographs, and numbered separately from figures. Details of numbering, identification and legends are as required for figures.
- It is in the author's interest to provide the highest quality figure format possible. Please be sure that all imported scanned material is scanned at the appropriate resolution: 1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour.
- Figures must be saved separate to text. Please do not embed figures in the paper file.
- Files should be saved as one of the following formats: TIFF (tagged image file format), PostScript or EPS (encapsulated PostScript), and should contain all the necessary font information and the source file of the application (e.g. CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).

- All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper (e.g. Figure 1, Figure 2). In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. Figure 1(a), Figure 1(b)).
- Figure captions must be saved separately, as part of the file containing the complete text of the paper, and numbered correspondingly.
- The filename for a graphic should be descriptive of the graphic, e.g. Figure1, Figure2a.
- Colour figures will be reproduced in colour in the online edition of the journal free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply. Charges for colour pages in print are £250 per figure (\$395 US Dollars; \$385 Australian Dollars; 315 Euros). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$80 US Dollars; \$75 Australian Dollars; 63 Euros).

Aids to presentation

Contributors should consult recent issues of British Poultry Science for general presentation and remember that readers might require to translate the paper into another language. Complicated language and jargon will invite editorial alteration. In each specialist area of poultry science authors should approach the subject using the nomenclature and general standards of primary British journals in the field of study (e.g., *Journal of Physiology*, *Biochemical Journal*, *British Journal of Nutrition*, *Journal of Applied Bacteriology*, *Physics in Medicine and Biology*, *Heredity*, *Animal Behaviour*).

Nomenclature: chemical nomenclature should follow the conventions of the Biochemical Society (*Biochemical Journal*, **145**: 13-14, 1975). Biochemical nomenclature should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission (*Biochemical Journal*, **169**: 11-16, 1978). Enzymes should be defined initially by their full recommended names and EC numbers (*Enzyme Nomenclature* 1973, Amsterdam, Elsevier) and thereafter be referred to by accepted short names. Other specialised nomenclature should follow recent recommendations of a primary journal in the field. *Vitamins must be given their chemical names and identified as advised by IUNS* (*Nutrition Abstracts and Reviews Series, Series A*, **48**: 831-835, 1978).

Approved names for genes can be accessed at the NCBI Entrez gene database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Names of avian genes should follow those for human genes. Names of gene, RNA and proteins for different species must be formatted following international guidelines available at http://en.wikipedia.org/wiki/Gene_nomenclature. For birds, symbols of genes, *cDNA* and *mRNA* are in upper case italics and proteins are in upper case normal font.

Units. The International System (SI) must be used - Baron, D.N. (1977)

Units, Symbols and Abbreviations. London, The Royal Society for Medicine. Common fundamental units are: metre (m), litre (l), kilogram (kg), Joule (J - the calorie is not acceptable), mole (mol), degree Celsius (°C) (kelvin (K) may also be used), lux (lx), Newton (N), Pascal (Pa). The following prefixes are used to indicate order of magnitude: n (10⁻⁹), µ (10⁻⁶), m (10⁻³), k (10³), M (10⁶), G (10⁹). Authors in unusual specialities should check carefully for conformity with the SI system.

Abbreviations. Very commonly used abbreviations in specific areas (for example, DNA, ATP) may be used without explanation. Abbreviations permitted in other areas that may not be familiar in poultry science (for example, releasing hormones) should be explained. If in doubt, explain. Units should appear in Roman type, symbols in italic and other abbreviations in Roman capitals without stops. Abbreviations are generally used in the

singular and authors should avoid excessive use of idiosyncratic abbreviations and codings.

Concentrations, compositions, proportions. Chemical solutions should be expressed in molarities (M), where possible. In other cases w/v measures based on litres should be used. For solvent mixtures, ratios (for example: 1 chloroform: 2 methanol (v:v)) will be allowed. For compositions (for example, diet profiles), w/v expressions based on a relevant order of magnitude (g, kg) should be used. *Vitamins should be expressed as their chemical names and concentrations must be expressed on a mass basis, not in IU. Percentages are not to be used for any of these measures.*

Determinations and assays. All such methods must be accompanied by proof of, or a reference establishing, validity. The validity of any departures from an established method must be established. For binding assays (for example, radioimmunoassays) the guidelines of the **Journal of Endocrinology** (1980), **84**: 1-8 must be used. In addition to a reference, a statement concerning sensitivity, accuracy and specificity must be included.

Nomenclature for type of bird. Chicks: up to 2 weeks of age. (Broiler) chickens: meat type strains up to 8 weeks (or time of slaughter). Growers: layer type strains up to 12 weeks. Pullets: female layer type strains from 12 weeks to sexual maturity. Hens: mature females. Cockerels: mature males. **Note:** males between 12 weeks and maturity should simply be described as immature males.

Miscellaneous expressions. Indices of digestibility, protein quality (for example, Biological Value), proportional retention or availability (for example, nitrogen retention, net availability of ME) should be expressed as decimal coefficients or in identifying units (not as percentages). Egg production should be expressed as g egg/hen d or eggs produced/hen d (not as percentage production). Efficiency of food utilisation may be used as a general term but in specific reference to values, the ratio (preferably gain:food ratio) is required. In general, production measure:food ratios are preferred to their reciprocals.

Ethical standards. *Papers describing experiments which demonstrate a lack of concern for current ethical and welfare standards will not be accepted for publication.* The decision of the Editorial Board in this respect will be final.

Statistical standards. The experimental design and method of statistical analysis must be fully described. The statistical model must reflect the experimental design including both treatments and different sources of variation. The latter are identified by the experimental units to which treatments are applied. For example variation may be between pens or birds, or within birds when each bird receives several treatments. In analysis of variance these determine the appropriate residual mean squares against which treatment effects should be assessed. Special techniques may be necessary for correlated data from repeated sampling of individuals. Data transformation or analysis using Generalised Linear Models is more appropriate where data show non-constant variance, which sometimes arises from a restricted scale of measurement.

Presented results should include numbers of observations for each treatment combination. Parameters, such as means, differences between means, slopes etc., should be accompanied by estimates of variation. For unbalanced designs a residual standard deviation may be useful. Where transformations are used estimates of variation on the transformed scale are needed and means of

transformed values should be derivable from those presented. For tests of hypotheses, distributions, degrees of freedom and values of test statistics should be presented along with significant probabilities. Experimental treatments with quantitative levels are more succinctly and appropriately described by contrasts of means (often polynomials) than by multiple range tests, following an overall test of the effect of the treatment. The conclusions should consider the possible influence of any confounded treatments on the response.

Procedures

Authors will be emailed a PDF proof and a copyright transfer form. One corrected proof should be returned without delay. The copyright transfer form should be returned to the Publisher. Any special requirements about copyright should be made known by writing to the editor. The copyright and translation rights of papers become the property of British Poultry Science Limited.

Matters relating to subscriptions, offprints and advertising should be addressed to the Publisher: Taylor & Francis Ltd, 4 Park Square, Milton Park, Abingdon, Oxfordshire OX14 4RN, UK.

ARTICLE ACCESS

As an author, you will receive free access to your article on Taylor & Francis Online. You will be given access to the My authored works section of Taylor & Francis Online, which shows you all your published articles. You can easily view, read, and download your published articles from there. In addition, if someone has cited your article, you will be able to see this information. We are committed to promoting and increasing the visibility of your article and have provided [guidance on how you can help](#).

Corresponding authors can receive a complimentary copy of the issue containing their article. Article reprints can be ordered when you receive your proofs. If you have any queries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk. To order extra copies of the issue containing your article, please contact our Customer Services team at OrderSupport@TandF.co.uk.

COPYRIGHT

It is a condition of publication that all contributing authors grant to British Poultry Science Ltd the necessary rights to the copyright in all articles submitted to the Journal, which is published for British Poultry Science Ltd by Taylor & Francis. Authors are required to sign an Article Publishing Agreement to facilitate this. This will ensure the widest dissemination and protection against copyright infringement of articles. The “article” is defined as comprising the final, definitive, and citable Version of Scholarly Record, and includes: (a) the accepted manuscript in its final and revised form, including the text, abstract, and all accompanying tables, illustrations, data; and (b) any supplemental material. Copyright policy is explained in detail [here](#).

Using third-party material in your paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

OPEN ACCESS

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).

Taylor & Francis Open Select gives you, your institution or funder the option of paying an article publishing charge (APC) to make an article open access. Please contact openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

Updated 18-05-2018