

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

**O MECÔNIO CONTÉM POTENCIAIS BIOMARCADORES ASSOCIADOS A
IDADE DA MATRIZ E A QUALIDADE DA PINTAINHA POEDEIRA**

OTÁVIO CINTRA LEMOS OLIVIERI

UBERLÂNDIA – MG

2023

**O MECÔNIO CONTÉM POTENCIAIS BIOMARCADORES ASSOCIADOS A
IDADE DA MATRIZ E A QUALIDADE DA PINTAINHA POEDEIRA**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção
de título de mestre em Ciências Veterinárias pela
Universidade Federal de Uberlândia, sob
orientação da professora Dra. Belchiolina Beatriz
Fonseca.

UBERLÂNDIA

2023

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

O49 2023	Olivieri, Otávio Cintra Lemos, 1995- O MECÔNIO CONTÉM POTENCIAIS BIOMARCADORES ASSOCIADOS A IDADE DA MATRIZ E A QUALIDADE DA PINTAINHA POEDEIRA [recurso eletrônico] / Otávio Cintra Lemos Olivieri. - 2023. Orientadora: Belchiolina Beatriz Fonseca. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.683 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Veterinária. I. Fonseca, Belchiolina Beatriz, 1978-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências Veterinárias. III. Título. CDU: 619
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 18/2023				
Data:	22 DE DEZEMBRO DE 2023	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	11:45
Matrícula do Discente:	12112MEV020				
Nome do Discente:	OTÁVIO CINTRA LEMOS OLIVIERI				
Título do Trabalho:	O MECÔNIO CONTÉM POTENCIAIS BIOMARCADORES ASSOCIADOS A IDADE DA MATRIZ E A QUALIDADE DA PINTAINHA POEDEIRA				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	FORRAGICULTURA, MANEJO E EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DOS ANIMAIS E DE SEUS DERIVADOS				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	PRODUÇÃO E SANIDADE AVÍCOLA				

Reuniu-se no por videoconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Bruno Serpa Vieira (FAMEV/UFU); Oliveira Caetano de Freitas Neto (UFMG); Belchiolina Beatriz Fonseca (FAMEV/UFU), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa, Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, 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 a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado.

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

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 **Belchiolina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2023, às 13:07, 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 **Bruno Serpa Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 22/12/2023, às 13:51, 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 **Oliveiro Caetano de Freitas Neto, Usuário Externo**, em 22/12/2023, às 15:00, 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 **5017540** e o código CRC **DB2ECF54**.

Referência: Processo nº 23117.085708/2023-15

SEI nº 5017540

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos que me ajudaram diretamente na execução deste trabalho.

A querida orientadora e amiga Bia. Obrigado pela disposição em ajudar na execução do trabalho, pelas correções, dicas e ensinamentos. Sem você eu não teria conseguido.

A nossa amiga Simone. Sua proatividade em ajudar viabilizou todas análises do trabalho.

Ao Mário, nosso parceiro na identificação e leitura das amostras.

A colega Hebreia que nos emprestou sua inteligência para interpretar tantos dados.

Por fim, ao Incubatório Novo Mundo por valorizar a integração entre universidade e indústria.

DEDICATÓRIA

Meu amado e saudoso primo, Paulo. Obrigado pela parceria desde criança me ajudando a construir memórias, saiba que hoje, de onde estiver, você me ajuda construir esperanças. Obrigado por me ensinar a ver o mundo de outra maneira. De alguma forma eu sinto que você está orgulhoso, e é uma honra saber que um anjo se orgulha de mim. Te levarei comigo eternamente.

LISTA DE ABREVIACÕES

- (3R): “3R, 7R)- 1, 3, 7 Octanetriol”
- (4OX): “4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone”
- (7M): “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid”
- (AF): “AFMK”
- (AP): “Asn Phe”
- (BIS): “Bis(2-chloroethyl)ether”
- (CR): “creatine”,
- (D3): “1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epivitamin D3 / 1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epicholecalciferol”
- (D3T): “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol”
- (DI): “Dihydro Isorescinnamine”
- (GPL): “Gly Pro Lys”
- (HC2): “HC Blue No.2”
- (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol”
- (HV): “Hydroxypropyl-L-Valine”
- (KA): “Kikkanol A”,
- (LB): “L-beta-aspartyl-L-leucine”
- (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”
- (MG18): “MG(18:0/0/0/0:0)[rac]”
- (N6): “N6-Carbamoyl-L-threonyl-adenosine”
- (NC): “N-Cyclopropylammelide”
- (NN): “N – nitrosoguvacine”
- (NST): “N-stearoyl tryptophan”
- (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”
- (OAM): “1-(O-alpha-D-mannopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”
- (OXO): “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid”
- (PE): “PE (21:0:0)”
- (PI): “PI(O-20:0/21:0) ”
- (PIR): “Pirimicarb”
- (PS): “PS(O-16:0/15:0)”,
- (PTN): Pentahomomethionine”
- (SB): “Semilepidinoside B”
- (TO): “Trolamine”
- (TRH): “Thyrotropin releasing hormone”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – *Heatmap* e distribuição das amostras nas diferentes componentes da PLS-DA da expressão de metabólitos em mecônio de poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, oriundas de matrizes de idades nova, média e velha que apresentaram diferenças no teste t...23
- Figura 2** – *Heatmap* e distribuição das amostras nas diferentes componentes da PSL-DA da expressão de metabólitos em mecônio de poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, que apresentaram diferenças no teste t.....27
- Figura 3** – *Heatmap* da expressão de metabólitos de mecônio de poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, oriundas de matrizes de idades nova, média e velha que apresentaram diferenças no teste t.....29
- Figura 4** – Distribuição das amostras de pintainhas poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, oriundas de matrizes de idades nova, média e velha na Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de diagnóstico pelo PLS-DA de pintainhas poedeiras de boa qualidade oriundas de diferentes idades da matriz.....	23
Tabela 2 – Teste de diagnóstico pelo PLS-DA de pintainhas poedeiras de qualidade ruim oriundas de diferentes idades da matriz.....	25
Tabela 3 – Área sobre a curva e likelihood referente a expressão de cada metabólito ao comparar-se pintinhas oriundas de matrizes jovens em relação a médias e velhas em conjunto..	26
Tabela 4 – Área sob a curva dos metabólitos de maior peso no teste da PLS-DA de mecônios de poedeiras oriundas de matriz de idade jovem, média ou velha.....	34

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1 Metabolismo do embrião.....	8
2.2 Avaliação na qualidade do pintinho	10
2.3 Metabolômica.....	12
3 OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5 RESULTADOS	16
5.1. A idade da matriz influencia a expressão de metabólitos em mecônios de pintainhas	16
5.2. Pintainhas classificadas como boas expressam metabólitos diferentes de pintainhas classificadas como ruins a depender da idade da matriz.....	23
Tabela 4: Área sob a curva dos metabólitos de maior peso no teste da PLS-DA de mecônios de poedeiras oriundas de matriz de idade jovem, média ou velha.	28
6 DISCUSSÃO.....	29
6.1. Os metabólitos PI, TO, D3T e MG16 apresentam diferentes perfis de excreção em mecônio de pintainhas poedeiras dependendo da categoria de idade da matriz em pintainhas classificadas como boas ou ruins.....	29
6.2. Pintainhas de boa qualidade oriundas de reprodutoras jovens podem ser discriminadas das demais idade da matriz pelo perfil metabólico em mecônio com alta sensibilidade e especificidade com destaque para os metabolitos SB, CR, D3T e TRH.....	31
6.3. Há diferença entre o perfil metabólito de pintainhas classificadas como boas e ruins, porém a acurácia para associar o perfil metabólico depende da idade.....	34
6.4. Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes novas, o PE, D3, BIS, OXO, DI, PS, NST, SB, OAG foram excretados mais em pintainhas boas (Figura 3A.).....	35
6.5. Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes médias, os metabólitos HV, KA, NN, 4OX, AP, HCG, AF, HC2, PTN e MG16 expressaram mais em pintainhas de boa qualidade.	37
6.6 Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes velhas o PI e o OAM expressaram mais em pintainhas de boa qualidade (Figura 3 C).	39
7 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS	41
MATERIAL SUPLEMENTAR	54

RESUMO

A identificação precoce de pintainhas com condições de qualidade boas ou ruins permite destinação correta das aves no incubatório e uma melhor composição dos lotes que irão para a granja. Uma maneira de selecionar pintainhas pela qualidade pode ser através da identificação de biomarcadores em amostras biológicas. Paralelamente a isso, conhecer o perfil metabólico de pintainhas oriundas de matrizes de diferentes idades é base para pesquisas que visem desenvolver estratégias para diminuir o efeito da idade da matriz nos resultados de eclosão. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar se a qualidade da pintainha e a idade da matriz que as geram causam diferença no perfil metabólico em mecônio da pintainha poedeira. Para isso, 198 pintainhas oriundas de matrizes Lohmann, categorizadas nas faixas de idade de matriz jovem, média e velha, foram classificadas, por meio da avaliação visual, como de boa ou má qualidade, e em seguida tiveram mecônio coletado para teste de metabolômica. Pintainhas boas apresentaram 16 metabólitos que variaram entre as idades da matriz com acurácia geral 72,9%. A acurácia para predizer, baseando-se no perfil metabólito, se a pintainha tinha origem de matriz jovem foi de 92,31% com alta sensibilidade (92,30%) e especificidade (93,75%). Em pintainhas ruins, foram discriminados 4 metabólitos, com acurácia geral de 66,17%. Houve melhor separação de metabólitos na PSL-DA na categoria de pintainhas boas, e 6 destes apresentaram alto valor de área sob a curva (AUC) individual em pintainhas boas de matriz jovem. Foram estes, “Thyrotropin releasing hormone” TRH, “Creatine” (CR), “Semilepidinoside B” (SB), “Gly Pro Lys” (GPL), “Pirimicarb” (PIR) e “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradecahydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradecahydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol” (DT3). Ao desconsiderar a idade da matriz, 5 metabólitos variaram entre pintainhas boas ou ruins, porém, com um acurácia baixa de 63,38% para discriminar a qualidade através dos metabólitos encontrados. Pintainhas de matrizes novas, médias ou velha tiveram, respectivamente, 12, 11 e 2 metabólitos que variaram entre as qualidades boa e ruim e a acurácia para cada faixa de idade foi de 74,46%, 70,83% e 51,6%. Ao final, alguns metabólitos se apresentaram como potenciais biomarcadores para distinguir pintainhas de boas e ruins oriundas das idades jovens “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid” (OXO), “Dihydro Isorescinnamine” (DI), “PS(O-16:0/15:0)” (PS), “N-stearoyl tryptophan” (NST), “Creatine” (CR), “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid” (7M), médias “N – nitrosoguvacine” (NN), “Asn Phe” (AP), “AFMK” (AF), “HC Blue No.2” (HC2), “Pentahomomethionine” (PTN), “Hydroxypropyl-L-Valine” (HV) e velhas, “1-(O-alpha-D-mannopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol” (OAM). Esse é o primeiro trabalho da literatura que apresenta potenciais biomarcadores que distinguem a pintainha poedeira pela idade da matriz e pela qualidade da pintainha poedeira.

Palavras-chave: Metabólitos, metabolômica, embriões, pintainhas de um dia

ABSTRACT

Early identification of either good or poor-quality chicks is crucial for proper hatchery allocation and optimal farm flock composition. One approach to selecting chicks based on quality involves identifying biomarkers in biological samples. Concurrently, understanding the metabolic profile of chicks from different-aged breeders is essential for developing strategies to mitigate the age-related effects on hatchability. This study investigated whether chick quality and breeder age influence the metabolic profile in layer chick meconium. A total of 198 chicks from Lohmann breeder hens, categorized as young, middle-aged, and old, were visually assessed for quality, and meconium samples were collected for metabolomic analysis. Good-quality chicks exhibited 16 metabolites that varied across breeder ages with an overall accuracy of 72.9%. Using metabolite profiles, the accuracy for predicting if a chick originated from a young hen was 92.31%, with high sensitivity (92.30%) and specificity (93.75%). Four metabolites were discerned in poor-quality chicks with an overall accuracy of 66.17%. The Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) showed enhanced metabolite separation in good-quality chicks, with six metabolites exhibiting high area under the curve (AUC) values in chicks from young hens, namely "Thyrotropin releasing hormone" (TRH), "Creatine" (CR), "Semilepidinoside B" (SB), "Gly Pro Lys" (GPL), "Pirimicarb" (PIR), and "1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol" (DT3). Not taking into account maternal age, five metabolites varied between good and poor-quality chicks, but with a low accuracy of 63.38% for quality discrimination. Chicks from young, middle-aged, and old hens exhibited 12, 11, and 2 varying metabolites between good and poor qualities, with accuracies of 74.46%, 70.83%, and 51.6%, respectively. Certain metabolites emerged as potential biomarkers to distinguish between good and poor-quality layer chicks from young age groups. These include "Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid" (OXO), "Dihydro Isorescinnamine" (DI), "PS(O-16:0/15:0)" (PS), "N-stearoyl tryptophan" (NST), "Creatine" (CR), and "7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid" (7M) for chicks from young hens, "N – nitrosoguvacine" (NN), "Asn Phe" (AP), "AFMK" (AF), "HC Blue No.2" (HC2), "Pentahomomethionine" (PTN), "Hydroxypropyl-L-Valine" (HV) for middle-aged, and "1-(O- α -D-mannopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol" (OAM) for old ages. . This study represents the first in the literature to present potential biomarkers distinguishing layer chicks by maternal age and chick quality.

Keywords: Metabolites, metabolomic, embryo, one day old chick

1 INTRODUÇÃO

Na última década, o Brasil testemunhou um aumento na produção de pintainhas de corte e postura comercial. Em 2012 foram alojadas 46,5 milhões e 907 mil matrizes de frango e poedeira, respectivamente. Ao passo que em 2022, os números subiram para 56,3 milhões e 1,9 milhões de matrizes alojadas (ABPA, 2023). Consequentemente, a avicultura brasileira registrou um notável crescimento na produção de carne de frango e ovos. O país é o maior exportador e segundo maior produtor de carne de frango do mundo, e produz em média 1.500 ovos por segundo para consumo humano (XIMENES, 2023; ABPA, 2023). Isto faz com que a avicultura assuma protagonismo na economia e na segurança alimentar do mundo todo.

A avaliação da qualidade de pintainhas na avicultura é uma etapa crucial para garantir o sucesso da produção avícola. Melhorias na qualidade do pintinho resultam em produção mais eficiente e mais lucrativa do lote, e métodos de avaliação acurados para classificar pintainhas são ferramentas para evitar perdas econômicas futuras (NARINC, 2021). Durante o desenvolvimento embrionário de pintainhas, ocorrem várias mudanças metabólicas cruciais à medida que as células se multiplicam e se diferenciam para formar os tecidos e órgãos do embrião (GIVISIEZ et. al., 2020). Situações que possam comprometer o metabolismo do embrião, acarretarão prejuízos na qualidade do pintinho eclodido (UDDIN e HAMIDU, 2014).

A prática de avaliação precoce da qualidade do pintinho é importante para o incubatório e para a granja. Para o incubatório esse é um parâmetro útil para avaliar a eficiência do processo de incubação, pois anormalidades nos pintainhas resultam em perda financeira e diminuição de lucro da empresa, devido a diminuição de pintainhas vendáveis (OGUNMOYO & ODUNSI, 2018). Para a granja, a presença de pintainhas de baixa qualidade está associado a um lote de baixo desempenho. Isso porque pintainhas de qualidade ruins são mais predispostos a infecções, o que consequentemente gera prejuízos no bem-estar animal, piora a conversão alimentar e a uniformidade das aves (VAN et. al., 2012).

A definição de um método para avaliar a qualidade do pintinho é algo difícil de se conseguir, há muita subjetividade nos julgamentos das variáveis entre os avaliadores (WILLEMSSEN, et. al, 2008, YEBOAH et. al., 2019). Dentre as principais técnicas para avaliar a qualidade do pintinho recém eclodido, destacam-se: avaliação visual, peso corporal, massa corporal menos massa de gema, comprimento do pintinho, porcentagem do peso do pintinho em relação ao ovo incubado, e os métodos de avaliação Tona ou Pasgar (MOLENAAR, 2011).

Além da qualidade da pintinha, variáveis podem interferir nos resultados de eclosão, como por exemplo a idade da matriz (NASRI et.al., 2020, YAMAK et. al., 2023). Nesse sentido, uma abordagem para se conhecer melhor biomarcadores que variam com a idade da reprodutora é interessante para pesquisar métodos que minimizem os efeitos da idade.

Tecnologias “ômicas” (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) possuem como objetivo avaliar de forma abrangente as biomoléculas de um tecido, célula, fluido ou organismo. Especificamente, a metabolômica surgiu como uma ferramenta poderosa para a compreensão de sistemas biológicos complexos, permitindo a detecção e análise de milhares de metabólitos em uma única amostra (MANJULA e GOWDA, 2010). No campo de pesquisa geral da avicultura, estas tecnologias “ômicas” desempenham papel promissor na descoberta de novos entendimentos em patologia e fisiologia, além de auxiliar na identificação de biomarcadores importantes para desempenho das aves (GOOSSENS et. al., 2022).

Dado a importância da melhoria constante nos processos de eclosão e de definir a qualidade dos pintainhas eclodidas, as limitações das técnicas visuais e a versatilidade da metabolômica esse trabalho buscou de maneira exploratória encontrar possíveis biomarcadores de idade e qualidade em mecônio de pintainhas poedeiras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metabolismo do embrião

O metabolismo do embrião é determinado basicamente pelo nível de suprimento de oxigênio e pelo tipo de substrato disponível em cada fase. O ovo constitui-se praticamente de lipídios e proteínas, enquanto carboidratos representa cerca de 1% da composição total de nutrientes (GIVISIEZ et. Al., 2020).

MORAN em 2007, segmentou o desenvolvimento embrionário em três fases: estabelecimento do disco germinativo, conclusão do embrião e eclosão.

A fase inicial ocorre durante a primeira semana, e consiste na formação dos compartimentos embrionários (âmnio, cório, alantóide e saco da vitelínico). Nesta etapa, devido a imaturidade de células sanguíneas e da membrana córioalantóide, a oferta de oxigênio é limitada. Portanto, a principal fonte de energia é relacionada às vias glicolíticas anaeróbias, suplementadas pela quantidade de glicose no ovo (KUCERA et al., 1984; MORAN, 2007). A glicólise resulta em 2 moléculas de piruvato e 6 ATPs. Normalmente o piruvato é oxidado para gerar mais ATP, porém este processo é dependente de oxigênio. Logo, em momentos de baixa

concentração de oxigênio o piruvato é armazenado na forma de lactato, e no momento que os níveis de oxigênio forem reestabelecidos, a glicose pode ser gerada a partir do lactato via ciclo de Cori (DE OLIVEIRA, 2008).

A manutenção de desenvolvimento embrionário e a formação de novos tecidos demandam a maior parte de energia produzida pelo embrião. Via de regra, o custo da formação de 1 grama de tecido, em média, necessita 3 vezes mais o custo de mantê-lo. Ao final da incubação, níveis de energia também serão utilizados para o processo de eclosão e termorregulação (MORTOLA e COONEY, 2008; MUELLER et. al., 2022).

A segunda fase, de conclusão do embrião, tem como ponto principal o término do desenvolvimento da membrana córioalantóide, que sustenta a troca de O₂-CO₂ suficientemente para atender o crescimento rápido do embrião (MORAN, 2007). Como ocorre um decréscimo no conteúdo de glicose na gema, a principal fonte de energia torna-se triglicerídeos e fosfolipídios (PULIKANTI et. al., 2010; DE OLIVEIRA et. al., 2008), que serão metabolizados via ciclo de Krebs e β -oxidação para produção de ATP (DE OLIVEIRA, 2008).

Por fim, a terceira etapa proposta por Moran 2007, é composta pela ingestão do âmnio pelo embrião, o acúmulo de glicogênio em músculos e fígado, início da respiração pulmonar, absorção da gema residual, bicagem da casca e eclosão propriamente dita. (CHRISTENSEN et. al., 2001; MORAN, 2007). A ingestão do fluido amniótico garante substratos para serem armazenados como glicogênio, que será fundamental para garantir energia no momento de baixa disponibilidade de oxigênio pós ruptura da membrana córioalantóide (UNI e FERKET, 2003; MORAN, 2007).

Não diferentemente de outros animais, o fígado é o órgão de maior atividade metabólica no embrião de aves (DE OLIVEIRA, 2008). Este órgão desempenha um papel crucial na absorção, armazenamento, modificação e exportação de nutrientes provenientes da circulação vitelina, do trato digestório e dos tecidos periféricos. Desde antigamente, sabe-se que além disso, o fígado é responsável por metabolizar os resíduos de outros tecidos para excreção ou reciclá-los em metabólitos úteis (ROMANOFF, 1960). Juntamente com a gema, o fígado assegura a reserva principal de glicogênio para o embrião (Uni et. al., 2005; YADGARY e UNI 2012). A gliconeogênese que ocorre no fígado é crucial como fonte de energia para o momento que vai da bicagem interna até a alimentação do pintinho. A glicose obtida desta via poderá ser exportada a outros tecidos ou armazenadas como glicogênio para uso posterior (DE OLIVEIRA, 2008).

Para finalizar o contexto geral do metabolismo do embrião de aves, os principais

hormônios atuantes no processo são insulina, glucagon, tri-iodotironina (T3), tiroxina (T4) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e IGF-II) (ZHOU et. al., 2007). A insulina e glucagon irão atuar no equilíbrio das concentrações de aminoácidos e glicose no organismo do embrião. (LU et. al., 2007). Os hormônios tireoidianos (T3 e T4) desempenham papel fundamental na termorregulação, crescimento muscular e mobilização de glicogênio (CHRISTENSEN et. al, 2003). Por fim, IGF-I e IGF-II, atuam na mobilização de aminoácidos do âmnio (KARCHER et. al., 2005) e contribuem na produção de glicogênio e proteína no fígado (DE OLIVEIRA, 2008).

2.2 Avaliação na qualidade do pintinho

Em 2008, WILLEMSSEN e colaboradores, já estudavam a importância de testes objetivos que investigassem a qualidade do pintinho no primeiro dia de vida, a fim de detectar pintinho com um bom potencial de desenvolvimento. A prática de avaliação precoce da qualidade do pintinho é importante para o incubatório e para a granja. Para o incubatório esse é um parâmetro útil para avaliar a eficiência do processo de incubação, pois anormalidades nos pintainhas resultam em perda financeira e diminuição de lucro da empresa, devido a diminuição de pintainhas vendáveis (OGUNMOYO & ODUNSI, 2018). Para a granja, a presença de pintainhas de baixa qualidade está associado a um lote de baixo desempenho. Isso porque pintainhas de qualidade ruins são mais predispostos a infecções, o que consequentemente gera prejuízos no bem-estar animal, piorar a conversão alimentar e a uniformidade das aves (VAN et. al., 2012).

A primeira semana de vida do pintinho é um período que apresenta alto risco de infecção bacteriana pelo fato do sistema imune da ave ainda não estar totalmente desenvolvido (OUATARRA et. al., 2020). Este quadro pode ser potencializado por pintainhas de baixa qualidade. Alterações, por exemplo, na qualidade do umbigo de pintainhas aumentam as chances de infecção do saco da gema (ULMER- FRANCO et. al., 2012; AGBEHADZI et. al., 2019)

A definição de um método para avaliar a qualidade do pintinho é algo difícil de se conseguir, há muita subjetividade nos julgamentos das variáveis entre os avaliadores (WILLEMSSEN, et. al, 2008, YEBOAH et. al., 2019). Dentre as principais técnicas para avaliar a qualidade do pintinho recém eclodido, destacam-se: avaliação visual, peso corporal, massa corporal menos massa de gema, comprimento do pintinho, porcentagem do peso do pintinho

em relação ao ovo incubado, e os métodos de avaliação Tona ou Pasgar (MOLENAAR, 2011).

DEEMING (2000) e MEIJERHOF (2005) classificam a avaliação visual como método qualitativo. Esta técnica avalia a coloração do pintinho, cicatrização do umbigo, limpeza, umidade da penugem, deformidades, brilho dos olhos, presença de saco da gema no umbigo, qualidade de pernas (IPEK & SÖZCÜ, 2013, DECUYPERE & BRUGGEMEN, 2007).

A avaliação visual trata-se de um método rápido e bastante difundido, porém é influenciada por percepções individuais e não permite que a qualidade seja registrada como número, apenas estimada (MOLENAAR, 2011). A subjetividade, a dificuldade de repetição e o treinamento de pessoas para a avaliação visual, foram os principais fatores que demandaram análise quantitativas para avaliação da qualidade dos pintainhas (IPEK & SÖZCÜ, 2013).

O peso corporal caracteriza-se como o primeiro parâmetro quantitativo que pode ser avaliado (DEEMING, 2000; DECUYPERE et al., 2002). Contudo, o peso corporal não desconsidera o peso da gema no interior do pintinho, o que pode levar a uma má interpretação do peso: um pintinho com resíduo de gema será um pintinho pesado que não absorveu corretamente o saco vitelínico (MOLENAAR, 2011). Para evitar este problema deve-se considerar a massa corporal menos massa de gema. Este é um parâmetro que tende assegurar mais corretamente a qualidade do pintinho do que o peso corporal somente (PREEZ, 2007, MOLENAAR, 2011). No entanto, para aferir este dado é necessário o sacrifício do pintinho, o que resulta em uma análise mais laboriosa, cara e demorada (MEIJERHOF, 2005, PREEZ, 2007, MOLENAAR, 2011).

Além do exposto acima, alguns estudos antigos já haviam encontrado a falta de relação entre o peso do pintinho ao nascimento e o peso final ao abate (DECUYPERE, 1979; MCLOUGHLIN & GOUS 1999; WOLANSKI et al. 2003; e TONA et al. 2004). Buscando alternativas, WOLANSKI et. al., (2006), concluíram que, juntos, os comprimentos do corpo e da perna do pintinho são parâmetros que se relacionam melhor com peso ao abate comparado com a medida de peso corporal ao nascimento. Em outros estudos (PETEK et al., 2010, KETELS, 2011), os pesquisadores confirmam a importância do comprimento do pintinho não só no desempenho de frangos de corte, mas também no desenvolvimento interno dos órgãos das aves. A desvantagem deste método está na variação que pode ocorrer entre diferentes avaliadores (MAULDIN et al. 2007, MOLENAAR, 2011).

Para contribuir com a avaliação das aves ao nascimento, dois sistemas de escores foram desenvolvidos para converter as verificações de qualitativas para quantitativas. O objetivo destes métodos é avaliar a viabilidade e performance dos pintainhas (DECUYPERE &

BRUGGEMEN, 2007). O método Pasgar avalia no pintinho a avidez, aparência do umbigo, conformação de bico, perna e o saco da gema (MOLENAAR, 2011, HJELM, 2018). De acordo com estas características é estabelecida uma nota de 0 (baixa qualidade) a 10 (alta qualidade). Já o teste Tona a nota vai de 0 a 100, em que 100 representa melhor qualidade, e os itens avaliados são: aparência da penugem, atividade do pintinho, absorção da gema, cicatrização do umbigo, aspecto do olho e pernas (TONA et. al., 2003). No entanto, foi sugerido por TONA et. al., em 2004 que os itens de avaliação, o peso atribuído a cada um e a relação entre eles deveriam ser revisados. Além disso, ambos os sistemas requerem um número mínimo de aves para avaliação de cada item, o que demanda muito tempo e mão de obra (MOLENAAR, 2011).

2.3 Metabolômica

Metabolômica é uma técnica capaz de identificar e quantificar de forma abrangente os metabólitos presentes em um material biológico, sejam eles conhecidos ou não (FIEHN, 2002). A metodologia mais utilizada para esta técnica é a espectrometria de massa, devido sua alta sensibilidade (CAJKA e FIEHN, 2016).

É possível duas abordagens para esta prática: direcionada e não direcionada (Roberts et al., 2012). A metabolômica direcionada consiste em analisar um conjunto de metabólito previamente estabelecidos, de modo que facilita a quantificação e identificação dos compostos e minimiza riscos de falsa interpretação, porém limita a técnica em relação a abordagens amplas (DEFOSSEZ, 2023). Por outro lado, a metodologia não direcionada, visa identificar o máximo de metabólitos possíveis e favorece a descoberta de possíveis biomarcadores (Ribbenstedt et al., 2018)

A metabolômica tem uma ampla gama de aplicações em estudos biológicos. Por exemplo, na medicina, ela pode ser usada para identificar biomarcadores de doenças, auxiliando no diagnóstico precoce e no monitoramento de tratamentos (TRIFONOVA, 2023). Além disso, a metabolômica é aplicada em estudos de nutrição e saúde para compreender os efeitos da dieta no quadro geral de saúde (CHAUDHARY et. al., 2023). Na área de toxicologia, essa abordagem é empregada para avaliar os efeitos de drogas e substâncias tóxicas no organismo (RAMIREZ, 2023). Também tem um papel importante na ecologia como forma de detecção de novos produtos naturais bioativos (WOLFENDER et. al., 2022).

No campo da avicultura, estudos utilizando metabolômica, transcriptoma e

proteômica já foram realizados a fim de investigar efeitos do estresse térmico em aves adultas (LI et al., 2011, WANG et al., 2015, SUN et al. 2015, NAPPER et al. 2015, WIJNEN et. al., 2020, DAI et. al., 2020). A técnica de metabolômica e transcriptoma foi recentemente utilizada por OUATTARA et. al., (2020) em plasma de pintainhas recém eclodidos para investigação de metabólitos relacionados à inclusão de um imunostimulador *in ovo*.

Tomonaga e demais pesquisadores em 2018, avaliaram o perfil metabólico em plasma de pintainhas submetidos a estresse térmico a partir do 5º dia de idade, e puderam identificar alterações em 35 vias metabólicas diferentes. Recentemente Qin et. al. (2023) utilizaram a técnica metabolômica a fim de estudarem biomarcadores relacionados à miopatias em frangos de corte.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se há diferença no perfil metabólito de mecônio de pintainha poedeira de acordo com a categoria da idade da matriz que a originou e a classificação de qualidade da pintainha.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se é possível distinguir a qualidade da pintainha de um dia pelo perfil metabólito do mecônio.
- Avaliar se há diferença entre metabólitos em mecônio de pintainhas oriundas de matrizes de diferentes idades.
- Detectar possíveis metabólitos que sirvam como biomarcadores para determinar a qualidade do pintinho

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais, protocolo SEI nº23117.010799/2022-54. A coleta das amostras foi realizada no incubatório comercial “Novo mundo” localizado em Uberlândia-MG. Para análise foram utilizadas pintainhas da linhagem “Lohmann”, coletadas durante a rotina usual do incubatório. Em resumo após a postura das matrizes os ovos eram desinfetados com formaldeído e armazenados a

temperatura controlada de 18°C entre 4-7 dias até a incubação. Os ovos foram incubados em máquinas de incubação “CASP®” transferidos para máquinas de nascedouro da mesma marca, com um total médio de 504 horas de incubação. Após término da janela de nascimento, que teve média de 26 horas para os lotes testados, as pintainhas foram então transferidos para a sala de classificação, onde avaliadores treinados avaliam caixa por caixa vinda dos nascedouros a fim de realizar a sexagem e classificar as pintainhas de acordo com a qualidade. Nesta etapa foram coletadas as aves para o estudo, de modo que nenhum manejo de vacinação ou debicagem fora realizado nas aves do estudos. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de incubação de aves e no Laboratório de Nanobiotecnologia Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho ambos da Universidade Federal de Uberlândia

Para delineamento do trabalho, foram determinadas três categorias de idade de matrizes para escolha dos lotes que seriam utilizados. A divisão foi baseada na idade das aves, de modo que obteve-se três faixas de idades diferentes: matriz jovem (26 - 32 semanas) matriz média (41-48 semanas) matriz velha (76-82 semanas). Para cada faixa etária foram amostradas pintainhas de três (3) lotes com idades diferentes dentro de cada faixa, totalizando nove (9) lotes. As idades amostradas dentro de cada categoria de faixa etária nesse trabalho foram escolhidas dependendo do nascimento do dia no incubatório. As pintainhas da categoria jovem eram oriundas de lotes de matrizes das idades de 26, 30 e 32 semanas, dos médios as idades das matrizes eram 41, 42 e 48 semanas e dos velhos 76, 80, 82 semanas. Para cada lote foram coletados mecônios individuais de 22 pintainhas sendo 11 classificados como boas e 11 classificadas como ruins.

A fim de definir se as pintainhas eram de boa ou má qualidade seguiu-se o método de avaliação visual usualmente utilizado no incubatório em que foi realizado as coletas. Para tal, após retirada das caixas de pintainhas dos nascedouros e a chegadas destas na sala de classificação, um avaliador treinado retirava da caixa pintainhas que fossem classificadas com de má qualidade, de modo que essas aves não seguiriam para alojamento na granja. Para ser classificado desta forma, a pintainha deveria apresentar pelo menos uma destas 10 características: comportamento sonolento, penugem encrostada, lesão em articulação, penugem muito branca, abdome e/ou cloaca emplastada, presença de cordão umbilical, olho melado, pernas desidratadas, penugem falha e penugem esverdeada. Pintainhas que apresentassem nenhuma ou leve alteração de olho, penugem, bico, pescoço, sistema locomotor, que tivessem umbigo normal ou apenas com presença de resíduo de até 2mm, pernas hidratadas ou levemente desidratadas, abdome firme e não emplastado, eram considerados como de boa qualidade.

As pintainhas foram submetidas a coleta manual de mecônio, que consiste em uma leve pressão da região abdominal da ave de modo que ocorra a liberação de todo conteúdo. O mecônio foi armazenado em criotubos e congelados em nitrogênio líquido durante o transporte para posterior armazenamento em ultra-freezer à temperatura de -80°C.

No laboratório só foram utilizadas amostras que eram possíveis perceber a presença de ácido úrico visualmente, a fim de padronizar a análise. E assim das 22 pintainhas coletadas foram utilizadas 16 pintainhas por idade sendo 8 por grupo a exceção da idade de 26 semanas em que apenas cinco (5) amostras de pintainhas ruins foram usadas devido à perda de conteúdo pela abertura dos ependorfes durante o transporte.

Ao chegar no laboratório, cada amostra de mecônio foi triturada e homogeneizada a fim de se obter uma amostra uniforme. Então, foi realizada a pesagem com o objetivo de padronizar a quantidade de 100mg de mecônio. Nessa amostra foi adicionada 1000 µL de metanol grau espectroscópico para então homogeneização em vórtex seguida de centrifugação por 15 minutos a 13.000g. O sobrenadante foi transferido a outro eppendorf que foi submetido ao concentrador a vácuo por aproximadamente 2 horas até completa secagem. O material foi ressuspenso em 400 µL de metanol e filtrado em filtro de 0,22 micrômetros.

As análises de metabólitos foram realizadas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/MS) hifenizada em um HPLC (Agilent Infinity 1260) hifenizado para espectrômetro de massa de alta resolução tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por eletrospray (IES) instrumento de eletrospray. A separação foi fornecida por uma coluna Agilent Poroshell 120 2,1 x 50 mm 2,7 µm. A fase móvel foi utilizada: água acidificada com ácido fórmico (0,1% vv) (A) e metanol (B), com gradiente: 10% B (0 min), 98% B (0-10 min); 98% B (10-17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás de secagem a 8L/min a 220 °C e energia de 4,5KV aplicada ao capilar. O volume de injeção foi de 4 µL.

O software MassHunter Qualitative v. 10.0 foi usado para processar os dados brutos. Uma ferramenta de ‘extração de características moleculares (MFE)’ foi usada para extração dos espectros de massa e conversão para extensão CEF. O software Agilent Mass Profiler Professional (MPP) v. B.13.1.1 foi usado para filtrar e analisar os compostos moleculares extraídos. Os filtros utilizados foram abundância absoluta mínima = 5.000 contagens e todas as cargas permitidas. Os parâmetros de análise foram tolerância ao tempo de retenção de 0,15 min; janela de massa 15 ppm + 2 mDa.

Os compostos moleculares considerados foram aqueles presentes em 75% de pelo

menos um grupo. As análises estatísticas dos dados gerados na análise metabolômica foram realizadas com valores transformados em $\log_2$. O teste Teste T não pareado foi aplicado com valor de $p < 0,05$ e o *fold change* igual ou superior a 2,00. Foram construídos os gráficos de *heatmap* para melhor visualização e realizada a Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) que utiliza a técnica de regressão multivariada por mínimos quadrados (PLS) e com validação cruzada que permite uma melhor visualização dos componentes e prediz a capacidade das diferentes categorias serem classificadas corretamente de acordo com os metabólitos excretados. Os metabólitos foram identificados utilizando o banco de dados METLIN 2019 (incluído no MPP). Após foi realizado um teste de regressão simples para elencar os metabólitos que mais interferem individualmente na categorização das pintainhas baseado no valor da área sob a curva (AUC) usando o programa GraphPad Prism (10.0). Para o teste da sensibilidade e especificidade para categoria de idade, cada faixa etária foi comparada com as demais em conjunto.

5 RESULTADOS

5.1. A idade da matriz influencia a expressão de metabólitos em mecônios de pintainhas

Para avaliação entre idades, dos 1531 metabólitos identificados, foi possível aplicar um filtro de frequência de 100% e encontrados 21 metabólitos nas pintainhas classificadas como boas e 15 nas pintainhas classificadas como ruins. Um total de 16 metabólitos apresentou *fold change* maior que 2 e diferença na excreção entre pintainhas classificadas como boas oriundas de matrizes novas, médias ou velhas. Ao avaliar-se as pintainhas classificadas como ruins, apenas quatro (4) metabólitos se diferiram com o decorrer da idade da matriz (Figura 1A e C).

Os quatro metabólitos que variaram entre as idades em pintainhas ruins, também variaram nas pintainhas de boa qualidade: “PI(O-20:0/21:0)” (PI), “Trolamine” (TO), “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol” (D3T) , “MG(0:0/16:0/0:0)” (MG16) (Figura 1 A e C).

Além dos metabólitos descritos acima, nas pintainhas boas, outros metabólitos variaram entre as idades: “3R, 7R)- 1, 3, 7 Octanetriol” (3R), “N-Cyclopropylammelide” (NC), PS(O-16:0/15:0) (PS), “Gly Pro Lys” (GPL), Semilepidinoside B (SB),

“MG(18:0/0:0/0:0)[rac]” (MG18), “Pirimicarb” (PIR), 1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol (OAG), Creatine (CR), N-Nitrosoguvacine (NN), “Thyrotropin releasing hormone” (TRH) e “Hexadecyl Acetyl Glycerol” (HCG) (Figura 1 A e C).

Os metabólitos expressos em mecônio de pintainhas boas e ruins (TO, D3T e MG16) no geral apresentaram um resultado similar entre amostras oriundas de matrizes jovens, médias e velhas. Pintainhas oriundas de matrizes mais velhas apresentaram menor excreção de TO no mecônio tanto em boas quanto em ruins (Figura 1 A). Amostras de mecônio de pintainhas oriundas de matrizes velhas expressaram mais MG16 tanto na categoria ruim como boa. Pintainhas oriundas de matrizes novas, expressaram no mecônio menos D3T tanto na categoria das pintainhas de qualidade boa quanto ruim. Para o metabólito PI a excreção foi maior nas pintainhas oriundas de matrizes jovens classificadas como boas comparado as demais idades da matriz e para as pintainhas classificadas como ruins foi a idade média que apresentou maior expressão de PI (Figura 1 A e C).

Já os metabólitos que se diferenciaram exclusivamente dentre os mecônios de pintainhas boas 3R, TRH, NN, MG18, HCG e CR tiveram menor excreção em pintainhas geradas por matrizes novas. Por outro lado, a expressão de NC, PS, SB, OAG, GPL, PI e PIR foi maior no mecônio de pintainhas de boa qualidade oriundos de matrizes novas (Figura 1A e C).

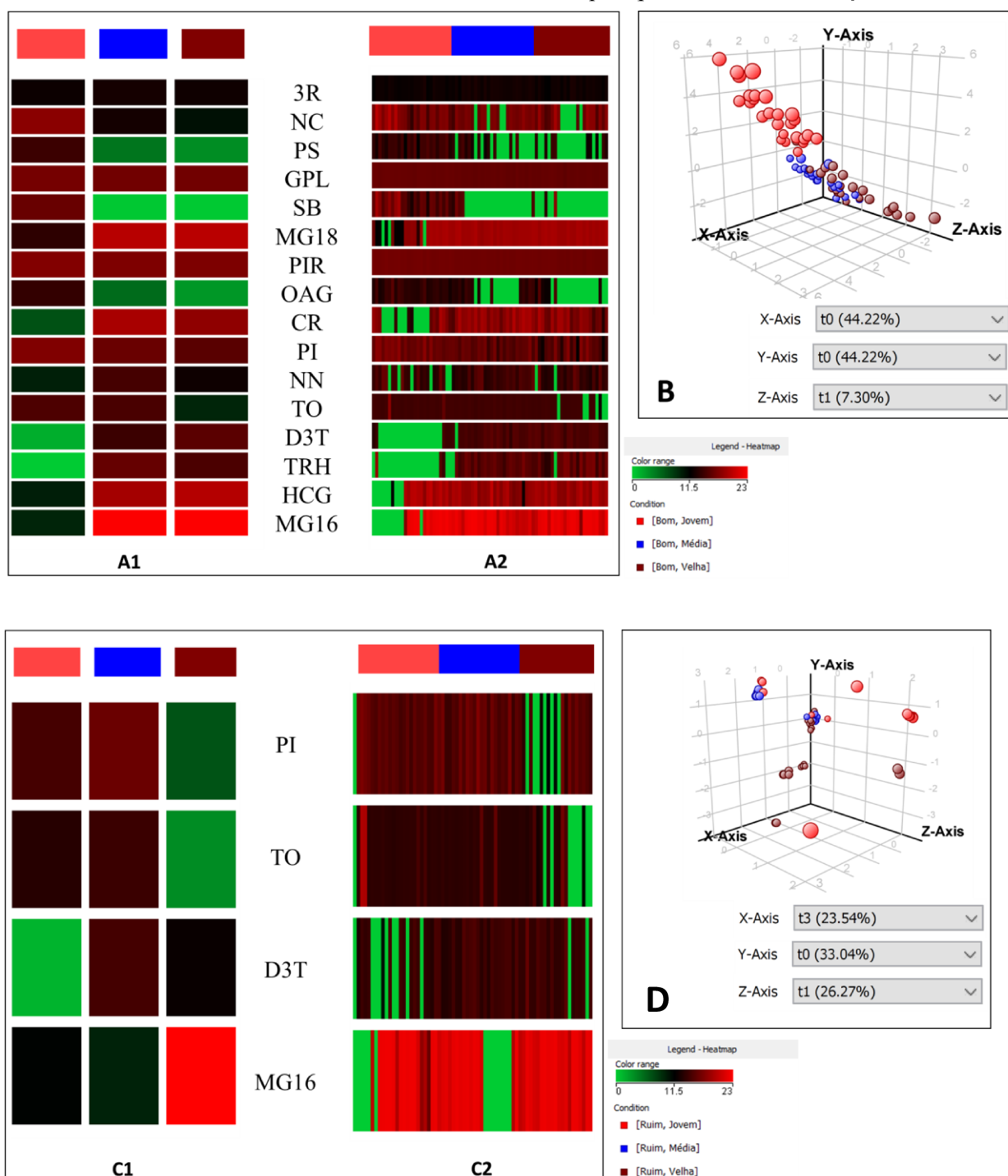
Para pintainhas oriundas das diferentes idades classificadas como boas há uma melhor separação de componentes pelo teste da PLS-DA em especial das oriundas de matrizes jovens (Figura 1B). O peso de cada metabólito nas componentes está descrito na tabela suplementar 1 e dentre aqueles que se repetiram em pintinhos de boa e má qualidade apenas o DT3 e MG16 apresentavam maior peso na primeira componente. Do grupo das pintainhas classificadas como boas os metabólitos GPL, SB, PIR, CR, D3T, TRH e MG16 apresentaram maior peso.

A acurácia geral para classificar as pintainhas boas, oriundas de matrizes das idades jovens, média e velha, de acordo com os 16 metabólitos onde houve diferença estatística, foi de 72,97% (Tabela 1). Na categoria de pintainhas boas, houve alta acurácia ao classificar a idade jovem (92,31%) o que cai à medida que a idade avança sendo 70,8% de acurácia para pintainhas oriundos de idade média e 54% para pintainhas de idade velha com acurácia geral de 72,9% (Tabela 1).

O teste da sensibilidade e especificidade, ao considerar cada idade em relação às demais (por exemplo, a jovem em relação à média e velha juntas), mostrou alta sensibilidade

(92%) e especificidade (93,75%) para classificar pintainhas boas oriundas de matrizes jovens. Para as pintainhas boas oriundas de matrizes médias a sensibilidade foi de 70,8% e a especificidade de 78%. No caso das velhas a sensibilidade foi de 54,17% e a especificidade de 88% (Tabela 1).

Figura 1: *Heatmap* e distribuição das amostras nas diferentes componentes da PLS-DA da expressão de metabólitos em mecônio de poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, oriundas de matrizes de idades nova, média e velha que apresentaram diferenças no teste t.



A1. *Heatmap* da excreção média, em massa de ions log2, de metabólitos em mecônio de poedeiras classificadas como boas oriundas de matrizes de idade jovem, média e velha. A2. *Heatmap* da excreção individual, em massas de ion log2, de metabólitos em mecônio de pintainhas classificadas como boas oriundas de matrizes de idade jovem, média e velha. B. PSL-DA das amostras de pintainhas classificadas como boas nas idades jovem, média e velha. C1. *Heatmap* da excreção média, em massa de ions log2, de metabólitos em mecônio de poedeiras classificadas como ruins oriundos de matrizes de idade jovem, média e velha. C2. *Heatmap* da excreção individual, em massa de ions log2, de metabólitos em mecônio de pintainhas classificadas como ruins oriundos de matrizes de idade jovem, média e velha. D. PSL-DA das amostras de pintainhas classificadas como ruins nas idades jovem, média e velha. (3R): “3R, 7R)- 1, 3, 7 Octanctriol”, (CR): “creatine”(D3T): “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol”, (GPL): “Gly Pro Lys”, (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol”, (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”, (MG18): MG(18:0/0:0/0:0)[rac]”, (NC): “N-Cyclopropylammelide”, (NN) “N – nitrosoguvacine”, (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”, (PI): “PI(O-20:0/21:0), (PIR): “Pirimicarb”, (PS): “PS(O-16:0/15:0)”, (SB): “Semilepidinoside B”, (TO): “Trolamine”, (TRH): Thyrotropin releasing hormone”

Tabela 1: Teste de diagnóstico pelo PLS-DA de pintainhas poedeiras de boa qualidade oriundas de diferentes idades da matriz

	Pred jov	Pred méd	Pred vel	Sens (%)	Espec (%)	Acurácia (%)
Verd jov	24	2	0	92.30	93,75	92,31
Verd méd	1	17	6	70,83	78.00	70,8
Verd vel	2	9	14	54.16	88.00	54,16

Acurácia geral	72,97
-----------------------	-------

Verd: verdadeiro, Pred: predição, sens: sensibilidade, Espec: especificidade, jov: amostras de pintainhas oriundas de matrizes jovens, méd: amostras de pintainhas oriundas de matrizes médias, vel: amostras de pintainhas oriundas de matrizes velhas. Matrizes jovens: Idade entre 26 e 32 semanas, matrizes médias: Idade entre 41 e 48 semanas, matrizes velhas: idade entre 76 e 82 semanas.

No caso das pintainhas de qualidade ruim não é possível ver uma separação clara entre as componentes (Figura 1D) e o programa não resultou em nenhuma componente. A acurácia geral foi de 66,17%. Para pintainhas oriundas de matrizes de idade jovem a acurácia é baixa (38%), embora aumente para a idade média (100%) e torna baixar na idade velha (56%) com uma acurácia geral de 66% (Tabela 2). O teste da sensibilidade e especificidade para pintainhas de qualidade ruim considerando cada idade em relação às outras duas idades em conjunto, mostrou sensibilidade baixa (38,09%) e especificidade alta (95,74%) para classificar pintainhas boas oriundas de matrizes jovens. Para as pintainhas boas oriundas de matrizes médias a sensibilidade foi alta (100%) e a especificidade baixa (54,54%). No caso das velhas a sensibilidade foi 56,52% e a especificidade alta (97,77%) (Tabela 2).

Tabela 2: Teste de diagnóstico pelo PLS-DA de pintainhas poedeiras de qualidade ruim oriundas de diferentes idades da matriz

	Pred jov	Pred méd	Pred vel	Sens	Espec	Acurácia
Verd jov	8	12	1	38,09	95,74	38,09
Verd méd	0	34	0	100,00	54,54	100,00
Verd vel	2	8	13	56,52	97,77	56,52

**Acurácia
geral**

66,17

Verd: verdadeiro, Pred: predição, sens: sensibilidade, Espec: especificidade, jov: amostras de pintainhas oriundas de matrizes jovem, méd: amostras de pintainhas oriundas de matrizes média, vel: amostras de pintainhas oriundas de matrizes velha. Matrizes jovens: Idade entre 26 e 32 semanas, matrizes médias: Idade entre 41 e 48 semanas, matrizes velhas: idade entre 76 e 82 semanas.

Considerando a alta acurácia, especificidade e sensibilidade para as pintainhas classificadas como de boa qualidade oriundas das matrizes jovens, a regressão logística foi avaliada. O teste mostra os maiores área sob a curva (AUC) para os metabólitos GPL, SB, PIR, CR, D3T, TRH (Tabela 3). O *heatmap* mostra a distribuição das amostras individuais e é possível notar visualmente nas pintainhas classificadas como boas a melhor separação entre jovens e as classificadas como médias e velhas para SB, CR, D3T, TRH, GPL (Figura 1A 2).

Tabela 3: Área sobre a curva e likelihood referente a expressão de cada metabólito ao comparar-se pintinhas oriundas de matrizes jovens em relação a médias e velhas em conjunto.

Metabólito	Jovem em relação às demais	Likelihood (p-value)	AUC
3R	Menos expresso	10,42 (0,001)	74,74
NC	Mais expresso	9,39 (0,002)	63,86
PS	Mais expresso	35,67 (<0,0001)	86,3
GPL	Mais expresso	50,7 (<0,0001)	93,75
SB	Mais expresso	63,86 (<0,0001)	93,91
MG18	Menos expresso	31,89 (<0,0001)	74,12
PIR	Mais expresso	64,27 (<0,0001)	96,39
OAG	Mais expresso	33,16 (<0,0001)	81,09
CR	Menos expresso	38,18 (<0,0001)	95,42
PI	Mais expresso	18,66 (<0,0001)	78,93
NN	Menos expresso	5,56 (<0,0001)	56,33
TO	Mais expresso	8,96 (<0,0001)	58,49
D3T	Menos expresso	52,21 (<0,0001)	96,39
TRH	Menos expresso	64,35 (<0,0001)	93,23
HCG	-Menos expresso	18,21 (<0,0001)	52,24

MG16	Menos expresso	24,71 (<0,0001)	61,54
------	----------------	-----------------	-------

(3R): “3R, 7R)- 1, 3, 7 Octanetriol”

(CR): “creatine”, (D3T): “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol”, (GPL): “Gly Pro Lys” , (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol”, (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”, (MG18): “MG(18:0/0:0/0:0)[rac]”, (NC): “N-Cyclopropylammelide”, (NN) “N – nitrosoguvacine”, (NST): “N-stearoyl tryptophan”, (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”, (PI): “PI(O-20:0/21:0) ”, (PIR): “Pirimicarb”, (PS): “PS(O-16:0/15:0)”, (SB): “Semilepidinoside B”, (TO): “Trolamine”, (TRH): “Thyrotropin releasing hormone”

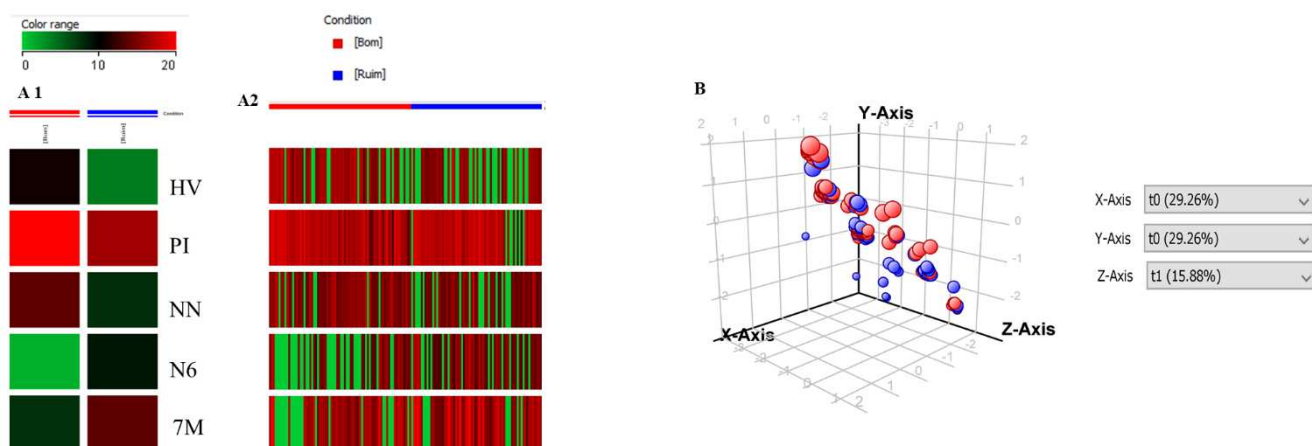
5.2. Pintainhas classificadas como boas expressam metabólitos diferentes de pintainhas classificadas como ruins a depender da idade da matriz

Ao avaliar de forma geral, sem levar a idade em consideração, dos 1531 metabólitos identificados, após o filtro de frequência de 75%, foram selecionados 33. Desses, houve diferença na expressão de 5 metabólitos entre mecônio de pintainhas de boa e má qualidade no geral (Figura 2 A). Pintainhas boas tiveram maior excreção em mecônios dos metabólitos “Hydroxypropyl-Valine” (HV), “PI(O-20:0/21:0)” (PI) e “N – nitrosoguvacine” (NN) e menor excreção de N6 e 7M (Figura 4A).

A análise da PSL-DA mostra que não há uma discriminação evidente entre pintainhas ruins e boas referente aos 5 metabólitos onde houve diferença na excreção em mecônio (Figura 2B). A acurácia para discriminar pintainhas boas e ruins, com base nos metabólitos diferente entre elas, foi de 63,38% com sensibilidade de 59,45% e especificidade de 60,5% (Figura 4C). O N6 e o 7M tiveram maiores pesos na primeira e segunda componentes (Tabela suplementar 2).

Ao realizar a análise da regressão, os maiores valores de *likelihood ratio* foram para HV, NN e N6, porém com valor da AUC inferior a 70% (Tabela 4).

Figura 2: *Heatmap* e distribuição das amostras nas diferentes componentes da PSL-DA da expressão de metabólitos em mecônio de poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, que apresentaram diferenças no teste t.

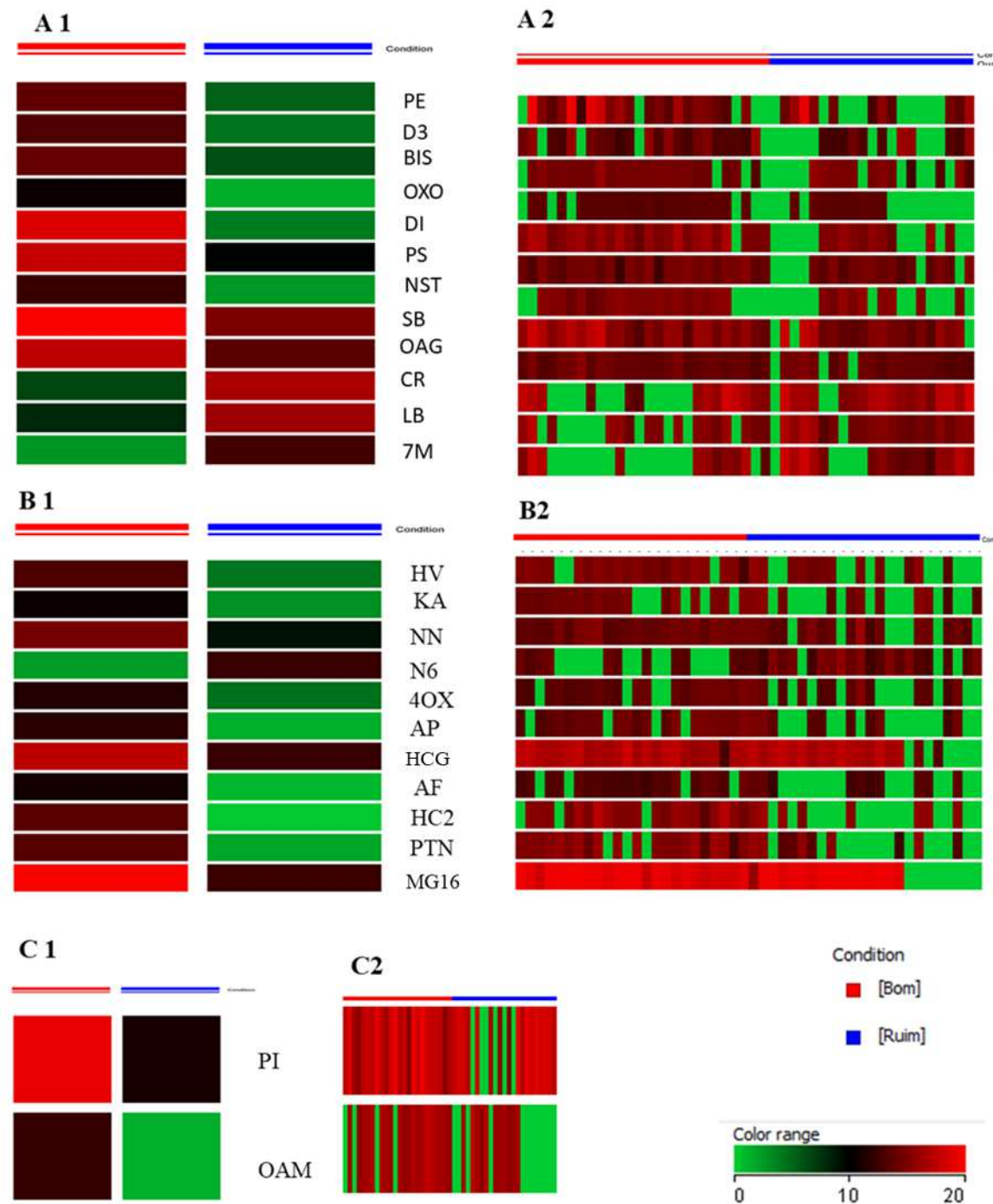


Heatmap da expressão da média dos metabólitos com diferença significativa entre a média (A1) e individuais (A2) de pintainhas boas e ruins. B. PSL-DA das pintainhas boas e ruins. HV: “Hydroxypropyl-Valine”. PI: “PI(O-20:0/21:0)”. NN: “N – nitrosoguvacine”. N6: “N6-Carbamoyl-L-threonyl-adenosine”. 7M: “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid”.

Ao estratificar as amostras por idade, dos 1531 metabólitos encontrados, o filtro de 75% de frequência permitiu identificar 43, 52 e 41 metabólitos para matriz jovem, média e velha respectivamente. O teste Teste T não pareado com valor de $p < 0,05$ e o *fold change* igual ou superior a 2,00 resultou em 12, 11 e 2 metabólitos diferentes nas idades de jovem, média e velha respectivamente (Figura 3).

Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes novas, os metabólitos “PE (21:0:0)” (PE), “1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epivitamin D3 / 1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epicholecalciferol” (D3), “Bis(2-chloroethyl)ether” (BIS), “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid” (OXO), “Dihydro Isorescinnamine” (DI), “PS(O-16:0/15:0)” (PS), “N-stearoyl tryptophan” (NST), “Semilepidinoside B” (SB) e “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol” (OAG) foram excretados mais em pintainhas boas. Em contrapartida, os metabólitos, “creatine” (CR), “L-beta-aspartyl-L-leucine” (LB) e “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid” (7M), excretaram-se mais em pintainhas ruins (Figura 3A).

Figura 3: *Heatmap* da expressão de metabólitos de mecônio de poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, oriundas de matrizes de idades nova, média e velha que apresentaram diferenças no teste t

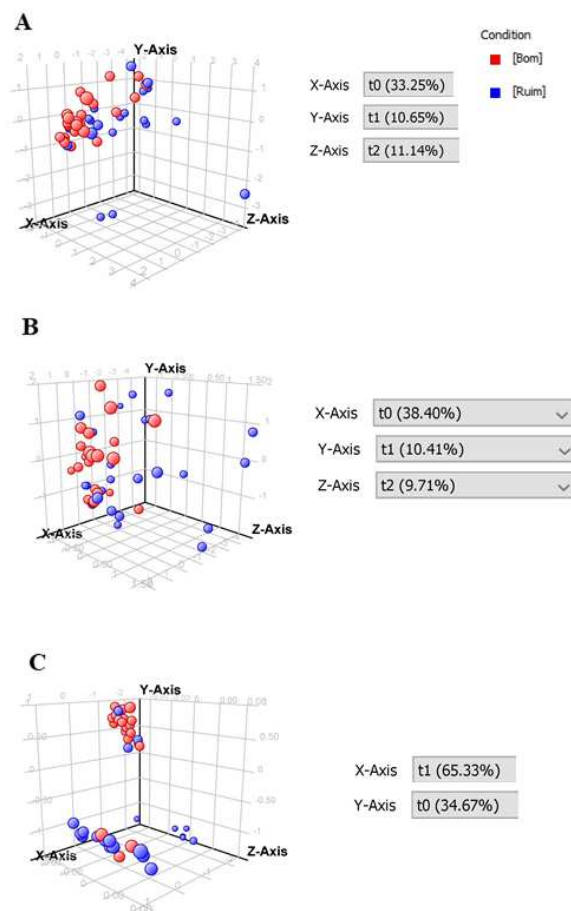


A1. Média dos metabólitos em mecônio de pintainhas dos grupos bons e ruins oriundas de matrizes de idade jovem. A2. Resultados individuais dos metabólitos em mecônio de pintainhas oriundas de matrizes de idade jovem. B1. Média dos metabólitos em mecônio de pintainhas dos grupos bons e ruins oriundas de matrizes de idade média. B2. Resultados individuais dos metabólitos em mecônio de pintainhas oriundas de matrizes de idade média. C1. Média dos metabólitos em mecônio de pintainhas dos grupos bons e ruins oriundas de matrizes de

idade velha. A2. Resultados individuais dos metabólitos em mecônio de pintainhas oriundas de matrizes de idade velha. (4OX): “4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone”, (7M): “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid”, (AF): “AFMK”, (AP): “Asn Phe”, (BIS): “Bis(2-chloroethyl)ether”, (CR): “creatine”, (D3): “1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epivitamin D3 / 1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epicholecalciferol”, (D3T): “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol”, (DI): “Dihydro Isorescinnamine”, (HC2): “HC Blue No.2”, (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol”, (HV): “Hydroxypropyl-L-Valine”, (KA): “Kikkanol A”, (LB): “L-beta-aspartyl-L-leucine”, (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”, (N6): “N6-Carbamoyl-L-threonyl-adenosine”, (NN) “N – nitrosoguvacine”, (NST): “N-stearoyl tryptophan”, (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”, (OXO): “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid”, (PE): “PE (21:0:0)”, (PI): “PI(O-20:0/21:0)”, (PS): “PS(O-16:0/15:0)”, (PTN): Pentahomomethionine”, (SB): “Semilepidinoside B”.

A PSL-DA mostra que não há uma separação nítida entre pintainhas de qualidade ruim e boa oriundas de matrizes jovens (Figura 4A) porém as amostras de pintainhas classificadas como boas se concentram mais em uma componente. A acurácia para discriminar pintainhas boa, pelos metabólitos encontrados em seus mecônios, foi de 74,468% com sensibilidade de 80,7% e especificidade de 66,66%. Os metabólitos de maior peso na primeira componente foram BIO, OXO, DI, OS, NST, CR e 7M (tabela suplementar 3). Na análise da regressão individual os maiores valores de AUC foram para CR e DI (73,27% e 77,31% respectivamente) (Tabela 4).

Figura 4: Distribuição das amostras de pintainhas poedeiras classificadas em qualidade boa ou ruim, oriundas de matrizes de idades nova, média e velha na Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais



Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes médias, os metabólitos “Hydroxypropyl-Valine” (HV), “Kikkanol A” (KA), “N – nitrosoguvaccine” (NN), “4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone” (4OX), “Asn Phe” (AP), “Hexadecyl Acetyl Glycerol” (HCG), “AFMK” (AF), “HC Blue No.2” (HC2), “Pentahomomethionine” (PTN) e “MG(0:0/16:0/0:0)” (MG16) expressaram mais em pintainhas de boa qualidade. Por outro lado, o metabólito “N6-Carbamoyl-L-threonyladosine” (N6) se expressa mais em pintainhas ruins (Figura 3 B).

Na análise da PSD-LA as pintainhas, oriundas de matrizes médias, de qualidade boa estão mais concentradas na primeira componente (Figura 4B). Os metabólitos de maior peso na primeira componente foram NN, 4OX, AP, AF, HC2 e PTN (Tabela suplementar 4). A acurácia para discriminar pintainhas boas, ruins ou geral foi de 70.83% com sensibilidade e especificidade apresentando este mesmo valor. A análise individual da regressão logística, mostra que os metabólitos com maiores valores ACU (70%) foram HV, NN, AP, AF, HC2 e PTN (Tabela 4).

Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes velhas, os metabólitos “PI(O-20:0/21:0)” (PI) e “1-(O-alpha-D-

mannopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol” (OAM) expressaram mais em pintainhas de boa qualidade (Figura 3 C). Embora a PSL-DA mostre uma concentração maior das amostras das pintainhas boas na primeira componente não é discriminatória o que é reforçado pela baixa acurácia 51,6% com sensibilidade de 41,16% e a especificidade de 60,8%. De acordo com a regressão, o valor da AUC foi maior para o OAM (71,56%) (Tabela 4).

Tabela 4: Área sob a curva dos metabólitos de maior peso no teste da PLS-DA de mecônios de poedeiras oriundas de matriz de idade jovem, média ou velha.

Metabólito	Geral	Jovem	Média	Velha	Likelihood ratio (p-value)	AUC (%)
HV	> bons **	-	> bons **	-	7,23 (0,007)	66,18
NN	> bons **	-	> bons **	-	7,21 (0,007)	67,25
PI	> bons ***	-	-	> bons ***	7,43 (0,006)	50,44
7M	> ruins *	> ruins *	-	-	6,45 (0,011)	58,92
N6	> ruins	-	> ruins **	-	10,47 (0,001)	61,03
BIS	-	> bons	-	-	4,43(0,035)	55,77
D3	-	> bons	-	-	5,85(0,015)	64,13
DI	-	> bons	-	-	16,69 (<0,0001)	77,31
NST	-	> bons	-	-	5,60 (0,018)	64,42
OAG	-	> bons	-	-	4,92 (0,026)	53,27
OXO	-	> bons	-	-	5,66(0,17)	59,04
PE	-	> bons	-	-	4,56 (0,032)	64,13
PS	-	> bons	-	-	10,5 (0,0012)	64,36
SB	-	> bons	-	-	7,32 (0,007)	65,96
CR	-	> ruins	-	-	6,09 (0,013)	73,27
LB	-	> ruins	-	-	5,12 (0,023)	64,13
7M		> ruins *			5,90 (0,015)	65,48
HV	> ruins **		> ruins **		8,49 (0,004)	72,40
NN	> ruins **		> ruins **		11,15 (0,0008)	71,53
N6	> ruins **		> ruins **		10,32 (0,001)	73,70
AF	-	-	> bons	-	9,14 0,002\	72,22
AP	-	-	> bons	-	9,77 (0,002)	75,87
HCG	-	-	> bons	-	8,83 (0,0029)	60,76
MG16	-	-	> bons	-	11,95 (0,0005)	64,41
4OX	-	-	> bons	-	4,957 (0,026)	66,49
HC2	-	-	> bons	-	15,41 (<0,0001)	72,64

KA	-	-	> bons	-	4,416 (0,003)	64,58
PTN	-	-	> bons	-	12,92 (0,0003)	78,13
OAM	-	-	-	> bons	7,01 (0,008)	71,56
PI	> bons ***	-	-	> bons ***	8,26 (0,004)	59,85

- não diferencia entre bons e ruins. * repete no geral e no jovem ** repete no geral e nas médias *** repete no geral e nas velhas. > : mais expressos. (4OX): “4-Oxo-1-(3-pyridyl)-1-butanone”, (7M): “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid”, (AF): “AFMK”, (AP): “Asn Phe”, (BIS): “Bis(2-chloroethyl)ether”, (CR): “creatine”, (D3): “1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epivitamin D3 / 1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epicholecalciferol”, (DI): “Dihydro Isorescinnamine”, (HC2): “HC Blue No.2”, (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol”, (HV): “Hydroxypropyl-L-Valine”, (KA): “Kikkanol A”, (LB): “L-beta-aspartyl-L-leucine”, (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”, (N6): “N6-Carbamoyl-L-threonyl-adenosine”, (NN): “N – nitrosoguvacine”, (NST): “N-stearoyl tryptophan”, (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”, (OAM): “1-(O-alpha-D-mannopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol”, (OXO): “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid”, (PE): “PE (21:0:0)”, (PI): “PI(O-20:0/21:0)”, (PS): “PS(O-16:0/15:0)”, (PTN): Pentahomomethionine”, (SB): “Semilepidinoside B”.

6 DISCUSSÃO

6.1. Os metabólitos PI, TO, D3T e MG16 apresentam diferentes perfis de excreção em mecônio de pintainhas poedeiras dependendo da categoria de idade da matriz em pintainhas classificadas como boas ou ruins

Metabólitos PI, TO, D3T e MG16 diferem suas excreções entre as idades tanto em pintainhas classificadas como ruins quanto em pintainhas classificadas como boas (Figura 1 A e C). O TO possui ação tamponante e surfactante, e por ser seguro, é amplamente utilizado na indústria farmacêutica (FIUME et. al., 2013). Embora atualmente sejam escassos os trabalhos relacionados com TO e embriões, um trabalho antigo mostra o efeito tamponante desse metabólito no metabolismo embrionário de galinhas (SISKEN et. al 1985). A origem do TO em organismo de animais vivos não é estabelecida na literatura. Nosso estudo é o primeiro relato existente deste composto em mecônio de pintainhas. Uma das hipóteses possíveis para a menor quantidade de TO em embriões de aves mais velhas pode estar relacionada com a qualidade de casca dos ovos incubados. À medida que o embrião avança no desenvolvimento embrionário ocorre um aumento da concentração de CO₂ no sangue causando um consequente acúmulo de bicarbonato para o equilíbrio ácido básico (BRUGGEMAN et. al., 2007). Cascas de matrizes mais novas são menos porosas (ARAUJO, 2017) e podem dificultar a troca gasosa entre a membrana corioalantóide e meio externo (CHRISTENSEN et al 2005), de modo que seja necessário um maior controle interno com substâncias tamponantes como, por exemplo, TO.

Amostras de mecônio de pintainhas oriundas de matrizes velhas expressam mais MG16 tanto na categoria ruim como boa (Figura 1 A e C). Os glicerídeos tornam-se importantes fontes de energia para o embrião quando os níveis de glicose da gema estão baixos (PULIKANTI et. al., 2010; DE OLIVEIRA et. al., 2008) e a via metabólica dos monoglicerídeos é a principal para síntese de triglicérides no embrião de galinha (SPEAKE e

NOBLE, 1998). Neste sentido, o metabólito MG16 assume grande importância, uma vez que se trata de um monoglicerídeo. O fato de ter sido expresso mais nas pintainhas oriundas de matrizes velhas, levanta a hipótese de que estes embriões consumiram mais energia do que o de matrizes mais novas. Essa hipótese é embasada em estudos que mostram que embriões de matrizes mais velhas (WAGT et al., 2020; NANGSUAY et al., 2023) e de ovos mais pesados (WAGT et al., 2020) possuíam maior quantidade de energia disponível, devido o maior tamanho da gema o que contribui com maior consumo de energia pelo embrião.

Pintainhas boas e ruins, oriundas de matrizes novas, expressam no mecônio menos D3T em relação as de matrizes médias e velhas. (Figura 1 A e C). Esse metabólito é um produto do metabolismo da vitamina D (KIM et. al., 2022) que é de extrema importância na osteogênese, adipogênese e miogênese (GU et al., 2021) e na atividade antioxidante (GU et al., 2021) dos embriões. Por meio dos estudos disponíveis na literatura sobre o tema, é difícil criar hipóteses sobre o fato de D3T ter sido menos excretado em pintainhas oriundas de matrizes de idade jovem, porém, acreditamos que possa estar relacionado ao menor peso dos ovos e, consequentemente, menor peso do embrião comparada com os de matrizes mais velhas que são maiores (NARINÇ, 2021).

A expressão do PI seguiu um padrão semelhante dentre as idades, foi menor em pintainhas oriundas de matrizes velhas tanto de qualidade boa quanto ruim, embora fosse mais excretado em pintainhas oriundas de matrizes novas da categoria boa ou média da categoria ruim (Figura 1 A e C). Este metabólito é classificado como um dos glicerofosfolídeos que são compostos resultantes da esterificação de gliceróis, e atuam como componentes essenciais em membranas celulares (WANG et. al., 2022; VALENTINE, 2020), compõem a membrana do cérebro de embriões de poedeiras (FREYSZ, HORROCKS E MANDEL, 1980), além de desempenharem funções como fusão celular, fagocitose e transporte de vesículas (SCHLEGEL e WILLIAMSON, 2001; OHASHI et. al., 1995). Liu et. al., 2021, identificaram enriquecimento nos metabólitos do metabolismo dos glicerofosfolídeos na gema de ovos embrionados de frango de corte no terço inicial do desenvolvimento embrionário. Tal, fato foi compreendido pelos pesquisadores como um indicativo de uma alta taxa de síntese de DNA, proliferação celular e armazenamento de energia.

Os resultados destacam a importância dos metabólitos TO, D3T, MG16 e PI que se repetiram tanto em pintainhas classificadas como boas quanto em pintainhas classificadas como ruins mostrando que são metabólitos excretados dependentemente da idade da matriz. De todos eles, o D3T parece ser o que mais apresenta associação com a idade da matriz visto que para pintainhas de boa qualidade ele apresenta alta AUC (93,39%) (tabela 1). Embora tenhamos encontrado a importância de alguns dos metabólitos para o embrião e termos hipotetizado explicações para a influência dos de cada metabólito na idade do matiz nós não temos base

suficiente para uma explicação completa. No entanto fato é que esses metabólitos são importantes como potenciais biomarcadores, com grande destaque para o DT3 que apresentou alto valor de AUC.

6.2. Pintainhas de boa qualidade oriundas de reprodutoras jovens podem ser discriminadas das demais idade da matriz pelo perfil metabólico em mecônio com alta sensibilidade e especificidade com destaque para os metabolitos SB, CR, D3T e TRH

Interessantemente, alguns metabólitos só se diferenciaram entre as idades nas pintainhas de boa qualidade. Houve maior excreção de NC, PS, SB, OAG, GPL, PI e PIR em pintainhas de boa qualidade da idade jovem. NC é descrito na literatura como um metabólito oriundo da degradação de moléculas de herbicidas (HU et. Al, 2011, ZHOU et al., 2021, SHAPIR et. al., 2002, CRUICKSHANK-QUINN, 2017), bem como o PIR é classificado como um carbamato utilizado como inseticida em plantações (CHEN, 2009). Não há identificação prévia destes metabólitos em mecônio de pintinhos, de modo que este resultado de nosso trabalho não é suficiente para determinar sua atuação no metabolismo do embrião. Apenas podemos supor que possam estar relacionados a uma presença na nutrição da matriz.

Assim como a PI, o PS é um glicerofosfolípídeo e foi mais expresso pintainhas boas oriundas de matrizes jovens. Há poucas informações sobre o PS na literatura, mas ele é encontrado em plantas (VUCO et. al., 2022), e em plasma de ratos que foram alimentados com proteína de origem de galinha (ONUH et. al., 2016). Porém baseado nestes estudos, não foi possível elencar motivos para nosso resultado referente a este metabólito.

SB e OAG são compostos glicosídeos. Os glicosídeos, amplamente presentes em plantas, constituem uma variedade de metabólitos secundários com estrutura diversificada, úteis na farmacologia devido às suas bioatividades comprovadas (BARTNIK e FACEY, 2023). Os relatos na literatura não nos mune de informações suficientes para discutir a diferença de expressão destes metabólitos em mecônio de pintainhas. Apenas podemos hipotetizar que a nutrição da matriz pode ter contribuído para essa diferença já que SB especificamente é um metabólito com presença descrita em planta (ALBALAWI et. al., 2023, AKBAR et al., 2020), e podemos supor o mesmo para OAG, devido ser da mesma classe. E, em especial, o SB apresentou alto valor de AUC com pintinhos bons oriundos de matrizes idade jovem o que reforça a importância de estudar mais esse metabólito.

Por fim, dos metabólitos que foram expressos mais em mecônio de pintainhas boas oriundas de matrizes novas, tem-se o GPL, um peptídeo que atua como constituinte de proteínas (PAN et al., 2011). Baseando-se no trabalho de PEN et., (2018), que associou o aumento de diversos peptídeos no sangue de embriões de frangos de corte com a síntese proteica das aves, supomos que aves jovens excretaram mais peptídeos do que as velhas devido ao fato que os

embriões mais velhos utilizem mais aminoácidos para a formação de seu corpo maior (MACHADO et. al., 2020). Embora não tenhamos base para compreender melhor este resultado, o GPL é um metabólito que discrimina a pintainha de acordo com a idade e deve ser alvo de mais estudos.

A literatura não traz relatos sobre a função do 3R em aves, mas em humanos ele tem um efeito protetor por ser um antioxidante (FARIAS et. Al., 2021, RADUAN et. Al., 2022). Em embriões de aves a presença deste composto no mecônio das pintainhas pode ser explicada pela presença deste metabólito na alimentação das matrizes, já que é um composto presente no milho (DA HORA, 2021). Pela falta de informações disponíveis não conseguimos compreender por que ele aparece menos em pintainhas oriundas de matrizes jovens e assim, são necessários mais estudos sobre esse composto.

Em relação aos metabólitos TRH, NN, MG18, HCG e CR a expressão em mecônio das pintainhas boas foi menor nas oriundas de matrizes novas. TRH é um hormônio que possui sua excreção realizada pelo hipotálamo, ativa o hormônio estimulante da tireoide que por sua vez irá atuar na liberação dos hormônios T3 e T4 (FLACH et al., 2021). Embora fatores estressantes durante o período de incubação de ovos de possa inibir os efeitos do TRH, e consequentemente atrasar o crescimento e metabolismo do embrião (CHELNOKOVA et al, 2023), isso não explica o motivo do TRH ser menos expresso em pintainhas oriundas de matrizes jovens. Novamente isso pode estar relacionado ao peso do ovo da matriz jovem que é menor (WAGT et al., 2020). Apoiado no fato que esse metabólito apresentou uma alta associação com a idade da matriz com elevada AUC (Tabela 3) é mandatório mais estudos para entender melhor a atuação desse hormônio.

Assim como o MG16, o MG18, também é um glicerídeo com menor expressão em mecônios de pintainhas oriundas de matrizes jovens, porém só se diferiu entre as categorias de idades das pintainhas classificadas como boas. A forma que interpretamos este resultado segue a mesma que discutimos parágrafos acima para o MG16 com a necessidade de mais estudos.

A CR é um proteína de importante valor energético e está disponível para o embrião das aves graças a deposição deste composto na gema feita pela galinha (REICHER et. al., 2020), Além disso, os embriões também são capazes de sintetizar este metabólito para suprir as suas necessidades (LIU et. al., 2021, WALKER, 1979). A CR é expressa a partir do 11º dia de incubação em embriões de frango e atua como fonte energética para a ave (Dayan et al., 2023). A injeção de CR in ovo melhorou a taxa de eclosão de pintinhos de frangos de corte, em comparação a ovos que não receberam suplementação, devido a um maior aporte energético garantido pela CR no final da incubação (FIRMAN et. al., 2023). Assim como discutido sobre os metabólitos MG16 e MG18, é possível que aves de matrizes novas terão menor expressão de metabólitos relacionados como fonte de energia, pois utilizam menos energia devido seu

menor tamanho. No entanto, reforçamos a necessidade de estudos específicos para auxiliar nesta constatação em especial para o CR que apresentou uma alta AUC.

Outro metabólito que participa deste mesmo contexto é o HCG, classificado como um éter lipídico (RANGHOLIA et. al., 2021). Estes compostos possuem importantes funções biológicas como constituição de membranas, regulação de diferenciação e sinalização celular e atividade antioxidante (DEAN e LODHI, 2018). No nosso trabalho, ele foi menos expresso em mecônio de pintainhas oriundas de matrizes mais novas classificadas como boas sem que a literatura traga base para entendermos tal evento.

Por fim, metabólito que apresentou uma menor expressão no mecônio das pintainhas de qualidade boa oriundas de matrizes jovens e de difícil interpretação foi o NN. Não há trabalhos recentes sobre esse metabólito, mas estudos antigos definem NN como um composto alcalóide, oriundo de plantas e que possui propriedades citotóxicas (SUNDQVIST, 1989, OHSHIMA, 1989).

A PSL-DA exibe uma melhor separação entre componentes de pintainhas classificadas como de boa qualidade oriundas de matrizes jovens (Figura 1B) o que é confirmado pelo alto valor da acurácia, sensibilidade e especificidade (tabela 1). Na primeira componente houve a maior participação do TRH, CR, SB, GPL, PIR D3T, MG16 (Figura suplementar 1). Com objetivo de avaliar separadamente os componentes com a alta sensibilidade e especificidade das pintainhas de boa qualidade nós realizamos o teste da regressão logística avaliando as jovens com demais. A AUC foi alta (>90%) para os metabólitos TRH, CR, SB, GPL, PIR e DT3 mostrando que esses metabólitos em conjunto ou isoladamente estão altamente associados com a idade sendo eficientes em classificá-las como jovens ou não jovens.

Nosso trabalho é o primeiro a associar metabólitos excretados em mecônio de pintainhas e idade da matriz. Embora o trabalho deixe muitas dúvidas para entender o motivo pelo qual alguns metabólitos são mais ou menos excretados, em pintainhas oriundas de matrizes da idade jovem, média ou velha, ele deixa muito claro que a diferença entre essas idades existe. É robusto na literatura trabalhos que mostram diferenças em janela de nascimento e eclosão entre pintainhas oriundas de diferentes idades (NASRI et. al., 2020, REBOLLEDO, 2023, YAMAK et. al, 2023). Assim, nosso trabalho reforça a necessidade de um tratamento especial para cada categoria de idade. Ademais, é um trabalho que abre portas para outros já que, aqui trazemos metabólitos que podem apresentar potencial para contribuir para melhorar resultados de incubação dependendo da idade da matriz. Outro ponto a se destacar foi uma menor associação entre os metabólitos encontrados em pintinhos de qualidade ruim e a idade. Isso pode ser compreendido pois nossa seleção foi baseada em pintinhos ruins sem levar em conta a causa dessa condição. Assim, trabalhos futuros devem ser realizados no sentido de separar os

pintinhos bons e ruins pelo tipo de defeito que levou a classificação da pintainha ruim. Outro ponto que chama atenção é o resultado do PLS-DA das pintainhas boas (Figura 1B) onde percebemos uma boa separação da idade jovem. Ao separar as categorias de idade usamos uma classificação normalmente utilizada nas empresas avícolas, porém em relação a classificação fisiológica da matriz e do embrião, há justificativa para supor que essa classificação deva ser revista.

6.3. Há diferença entre o perfil metabólito de pintainhas classificadas como boas e ruins, porém a acurácia para associar o perfil metabólico depende da idade

Pintainhas boas tiveram maior excreção em mecônio dos metabólitos “Hydroxyprolyl-Valine” (HV), “PI(O-20:0/21:0)” (PI) e “N – nitrosoguvacine” (NN) e menor excreção de N6 e 7M (Figura 4A).

HV é um dipeptídeo, oriundo de uma quebra incompleta de proteínas nos processos de digestão ou catabolismo destas (WISHART, 2022). Não há trabalhos que apresentem a função específica deste metabólito no embrião de aves. Sabe-se que, os dois peptídeos que o compõe, hidroxiprolina e valina, exercem funções no metabolismo de embriões de aves. A injeção de valina em ovos embrionados de poedeira é capaz de aumentar o peso do pintinho eclodido, reduzir a janela de nascimento e incrementar produção de mioblastos (KITA et. al., 2015, KITA e MAKINO 2016). Por sua vez, hidroxiprolina, estimula crescimento de vasos sanguíneos e cartilagem em embriões de frango de corte (BECK et. al., 2015). Nossos resultados reforçam a importância desses metabólitos para o metabolismo do embrião já que ele foi maior em pintainhas de boa qualidade. E assim, corroborando com os autores antes mencionados, a valina e a hidroxiprolina são compostos com potencial para melhorar a qualidade do pintinho de um dia.

A excreção do PI e do NN foi maior em pintainhas classificadas como boas (Figura 2). Como anteriormente discutido, o PI está associado a uma alta taxa de síntese de DNA, proliferação celular e armazenamento de energia (Liu et. al., 2021) além de desempenharem funções como fusão celular, fagocitose e transporte de vesículas (SCHLEGEL e WILLIAMSON, 2001; OHASHI et. al., 1995) o que provavelmente é determinante para explicar o porquê pintinhos de boa qualidade apresentam maior excreção de PI em seu mecônio. Novamente, torna-se difícil explicar a maior excreção de NN em pintainhas de boa qualidade já que não há trabalhos para nos guiar.

O N6 é classificado como um nucleosídeo de purina (WISHART, 2022), que por sua vez atua como constituintes de ácido nucleico em todos os organismos vivos (ELGEMEIE et. al., 2022), relatos de N6 especificamente ocorrem na literatura majoritariamente como constituinte de leite ou urina de fêmeas mamíferas (SCHLIMME et. al., 1994, PALOU, 2020, ZHOU et. al., 2022). Portanto, sem embasamentos para auxiliar nossa interpretação deste

metabólito no mecônio das aves. O mesmo ocorre para 7M, que é definido como um monoterpênóide iridóide glicosídico (CHEBI, 2022), que é uma classe de produtos naturais normalmente derivado de plantas e com propriedades farmacológicas (LIU et. al., 2021). Apesar de poder ser encontrados em animais (KUMAR et. al., 2005), não há relatos na literatura deste composto em aves. No entanto nosso trabalho reforça a importância desses dois metabólitos por apresentarem uma maior associação com a qualidade do pintinho com uma AUC maior que 70% (Tabela 4).

Desconsiderando a idade, a acurácia geral (63,38%), a sensibilidade (59,45) e a especificidade (60,5%) para classificar as pintainhas boas e ruins de acordo com metabólitos com diferença no teste t foi baixa. E isso provavelmente se deve a fatores já observados nesse trabalho como por exemplo interferência da idade da matriz no perfil metabólito das pintainhas e mesmo a necessidade de uma estratificação detalhada do tipo de defeito do pintinho classificado como ruim. No entanto, mesmo assim, é clara a diferença entre a influência dos metabólitos em relação a qualidade da pintainha que pode mostrar tais metabólitos como potenciais compostos para estudos de qualidade.

6.4. Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes novas, o PE, D3, BIS, OXO, DI, PS, NST, SB, OAG foram excretados mais em pintainhas boas (Figura 3A.).

Não foram encontrados trabalhos sobre a função do PE em aves. Mas o PE é um fosfolípídeo e como já discutido anteriormente, esta classe de compostos são componentes de membranas celulares e desempenham funções no metabolismo de embriões de aves (WANG et. al., 2022; VALENTINE, 2020), porém não há meios de justificar, baseado em nossos achados e na literatura, o motivo de este metabólito ter sido mais excretado em pintainhas boas de idades de matriz jovens.

D3, assim como o D3T, também é classificado como participantes do metabolismo da vitamina D (CHEBI, 2021). Visto a importância deste metabólito no metabolismo do embrião, discutida anteriormente, é válido considerar que nosso estudo corrobora com o fato deste metabólito ser benéfico ao metabolismo da ave, uma vez que foi detectada maior expressão em mecônio das pintainhas boas em comparação com ruins, oriundas de matrizes novas.

O fato de termos detectado BIS no mecônio de aves é de difícil compreensão pois os únicos relatos dos efeitos deste metabólito em animais que encontramos foi toxicidade e carcinogênese em ratos (LINGG et. al., 1982) e a constatação da toxicidade deste produto para humanos (EPA, 2000). Uma hipótese para maior quantidade de BIS em pintainhas boas oriundas de matrizes jovens é que que as pintainhas boas foram mais eficientes em excretá-la.

O composto OXO, que esteve dentre os mais expresso no mecônio das pintainhas boas oriundas de matrizes jovens, é um metabólito da degradação do ácido linoleico que é capaz de aumentar o metabolismo energético de ratos (KIM et. al., 2017). A suplementação de ácido linoleico aumenta e diminui a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados, respectivamente, na gema de ovos de matrizes pesadas, o que contribuiu com uma redução de acúmulo de gordura nos embriões de frango de corte (FU et. al., 2020). É difícil concluir o porque esse metabólito estava mais em pintinhas de qualidade boa mas uma hipótese é que essas aves podem ter um metabolismo mais ativo.

O composto DI, teve sua primeira descrição como um alcalóide enontrado em raízes de planta *rauwolfia serpentina* (SIDDIQUI et. al., 1987) e estudos mais recentes atribuem a este composto o potencial de ser utilizado como droga contra câncer (ABUZENADAH et. al., 2022). Baseado no que há na literatura não temos embasamento para discutir o porque esse composto tem alta associação com a qualidade da pintainha sendo mais expresso em pintainhas de boa qualidade.

Como anteriormente discutido, o PS é um glicerofosfolipídeo cuja explicação de sua presença e m mecônio é difícil devido a poucos estudos na literatura que relatam sua ocorrência, até onde sabemos foi detectado em rato (ONUH et. al., 2016) e em plantas (VUKO et. al., 2022).

O metabólito NST é um derivado do metabolismo de aminoácidos em especial do triptofano (DA CUNHA et. al., 2022). Especificamente em embriões de aves, não há relatos na literatura do metabólito NST especificamente. Sabe-se sobre a atuação do triptofano propriamente dito no metabolismo das aves, injeção deste aminoácido em ovos embrionados de frango de corte contribuíram com aumento de fibras musculares do músculo do peito e teve efeito positivo na imuno modulação das aves (NAYAK et. al., 2018) e estimulou crescimento intestinal de embriões de frangos, favorecendo ganhos de performance na vida adulta (NAYAK et. al., 2015). Dado os efeitos benéficos do triptofano no metabolismo do embrião, a expressão maior do metabólito NST em pintainhas de melhor qualidade oriunda de jovens pode estar relacionado a estas vias estarem mais ativas.

Os metabólitos CR, LB e 7M, foram mais expressos em pintainhas de qualidade ruim (Figura 3A). Como antes discutido a CR é uma proteína com importante valor energético e benéfica para o embrião (FIRMAN et. al., 2023) e foi mais expressa em pintinhos classificados como ruins. Má qualidade de pintinhos está relacionado muitas vezes a processos estressantes (NARINÇ, 2021) e durante tais períodos o metabolismo energético desses animais fica comprometido o que pode explicar a maior quantidade de CR no mecônio.

Poucos trabalhos trazem evidências sobre o LB. Trata-se de um composto da classe

dos peptídeos híbridos, que consiste em um peptídeo com dois aminoácidos em sua constituição (HMDB, 2021). Como discutido em relação ao GPL, esta classe de metabólitos está relacionada com a formação corporal do embrião, de modo que maior quantidade dele em mecônio signifique menor uso deste peptídeo pelo embrião, o que pode acarretar prejuízos, porém, garantir esta correlação requer estudos específicos.

A acurácia para classificar a qualidade das pintainhas de acordo com o perfil metabólico na idade jovem foi de 73,36% com boa sensibilidade (80,7%) mostrando que pintainhas boas podem ser classificadas com maior acerto que pintainhas ruins já que a especificidade foi de 66,66%. Dos metabólitos que mais influenciaram nessa classificação destaca-se o OXO, DI, OS, NST, CR e 7M (Tabela 4) que podem ser potenciais biomarcadores para qualidade das pintainhas jovens e devem ser mais explorados para testes futuros.

6.5. Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes médias, os metabólitos HV, KA, NN, 4OX, AP, HCG, AF, HC2, PTN e MG16 expressaram mais em pintainhas de boa qualidade.

Os efeitos benéficos do HV foram discutidos quando apresentamos os resultados independentemente da idade. E novamente em pintainhas oriundas de idade média tem-se o efeito benéfico da valina e da hidroxiprolina para qualidade do pintinho e considerando uma AUC maior de 70% a HV é sem dúvida um potencial candidato como biomarcador de qualidade.

KA é um metabólito classificado como um integrante da classe dos sesquiterpenóides de eudesmane, compostos extraídos de plantas com propriedades medicinais (WU et. al., 2006). Em animal, os únicos relatos de nosso conhecimento trata-se da atividade dele em reduzir atividade da aldose redutase, uma enzima atuante no metabolismo da glicose, em ratos (YOSHIKAWA et. al., 1999; WU et. al., 2006). Não há relatos deste metabólito no organismo de aves e embora o KA tenha se diferenciado entre pintainhas de boa e má qualidade, ainda não somos capazes de explicar esse resultado. Mas esse resultado sugere que é possível que compostos de plantas oriundos da alimentação da matriz influencie na qualidade da pintainha.

O metabólito NN novamente apareceu sendo mais expresso em pintainhas de boa qualidade, porém sem informações na literatura para embasarmos nossa discussão. No entanto, a AUC maior que 70%, apresenta-se como possível metabólito como marcador de qualidade da pintainha.

Recentemente, foi identificado aumento do 4OX, metabólito presente nas vias que

participa a enzima citocromo p450, no plasma de cabras intoxicadas por aflatoxina B1 (SHI et. al, 2022). A intoxicação de ovos embrionados de poedeiras por glifosato causou prejuízos ao fígado do embrião devido a expressão da enzima p450 no órgão (FATH et. al., 2020). Esta enzima participa do metabolismo de xenobióticos (SHI et. al., 2022), que sustenta nosso pensamento de que estes compostos ou toxinas, oriundos da alimentação da matriz, são metabolizados pelo embrião, uma vez que um metabólito oriundo da enzima que degrada estes produtos foi encontrado no mecônio de pintainhas. E ainda que a capacidade de metabolizar os xenobióticos é maior em pintainhas de boa qualidade oriundas de matrizes de idade média.

Embora não tenhamos base para entender o porquê AP foi mais expresso em pintainhas de boa qualidade oriundas de matrizes de idade média, a ocorrência dos aminoácidos que constituem esse peptídeo (asparagina e fenilalanina) é mais frequente na literatura. Asparagina teve sua concentração aumentada no líquido amniótico de ovos embrionados de frango de corte relacionado com o incremento no peso do embrião (ZHU et. al., 2022). Por sua vez, fenilalanina, atribuída a processos de produção de hormônios e neurotransmissores, reduziu na gema de ovos embrionados de frangos de corte durante os dias 15 e 19 de incubação (LIU et. al., 2021). Assim como discutido em relação ao HV em parágrafos anteriores, acreditamos que esses dipeptídeos estejam relacionados ao metabolismo das proteínas pelo embrião, e que pintainhas de melhor qualidade serão mais eficientes em fazer uso dessas vias, por isso a maior excreção destes metabólitos.

Outros metabólitos relacionados com metabolismos de aminoácidos são o AF, participante do metabolismo do triptofano (LIU et. al., 2023) e o PTN que participa do metabolismo da metionina (KEEG, 2023). Suplementação de metionina em embriões de frangos de corte tiveram efeito positivo no empenamento do embrião (CHEN et. al., 2020) e na formação do intestino dos pintinhos de corte (CHEN et. al., 2021) e de poedeiras (FARIAS et. al., 2023). Seguimos a mesma interpretação referente ao NST, que o AF e PTN por se tratar de metabólitos sem a referência específica em embriões de aves, consideramos a importância dos seus precursores triptofano e metionina no metabolismo do embrião. E da mesma forma que NST foi mais expresso em mecônio das pintainhas boas de matrizes jovens, AF e PTN tiveram maior expressão nas boas de idades médias, o que leva a crer que o embrião usufruir melhor das vias de metabolismo de aminoácidos, influencia positivamente a qualidade da pintainha.

HC2 é um composto químico denominado nitrocomposto (NIH, 2023). Este produto foi reportado ser isolado em plantas, fungos, bactérias e mamífero, possui propriedades antibacterianas, antitumorais e de sinalização celular (PARRY et. al., 2011). Nosso trabalho, até onde sabemos, é o primeiro relato dele de alguma forma presente no organismo de aves, e os embasamentos teóricos fornecidos pela literatura não nos permite discutir o motivo de sua expressão no mecônio de aves.

O HCG como anteriormente discutido faz parte de um grupo que possui importantes funções biológicas como constituição de membranas, regulação de diferenciação e sinalização celular e atividade antioxidante (DEAN e LODHI, 2018). Esse fator de constituição e proteção devido, a atividade antioxidante, pode explicar o porquê a maior quantidade desse metabólito em mecônio de pintainhas boas oriundas de matrizes de idades médias.

O MG16 também ocorreu em maior quantidade em mecônio de pintainhas oriundas de matrizes médias de boa qualidade. Como esse composto está relacionado ao metabolismo energético ele pode, supostamente, ter uma maior excreção em pintainhas boas devido a um metabolismo mais eficiente dessas aves.

Ainda para pintainhas de matrizes médias, o metabólito N6 foi mais expresso em pintainhas de qualidade ruim. Conforme antes discutido, embora o N6 seja um metabólito importante não temos bases para discutir o porquê ele foi mais expresso em pintainhas de qualidade ruim.

A acurácia, a sensibilidade e a especificidade para classificar as pintainhas da idade média em relação à qualidade foi de 70,83% o que mostra que temos potenciais biomarcadores com foco para NN, AP, AF, HC2, PTN e HV por apresentarem maior UC.

6.6 Em relação a diferença entre o grau de expressão de metabólitos de pintainhas boas e ruins oriundas de matrizes velhas o PI e o OAM expressaram mais em pintainhas de boa qualidade (Figura 3 C).

OAM, expresso em maior quantidade em mecônio de pintainhas de boa qualidade geradas por matrizes velhas, trata-se de um metabólito sem relatos abundantes na literatura, mas um trabalho associou sua maior expressão em ratos com obesidade (COWAN et. al., 2016). Por também se tratar de um glicosídeo, podemos discuti-lo da mesma forma que o OAG, ou seja, o único fato compreendido por nós que pode justificar sua ocorrência no mecônio de pintainhas é através da nutrição da matriz, já que esta classe de metabólitos é encontrada em plantas (BARTNIK e FACEY, 2023).

Como anteriormente discutido, o PI tem importantes funções como fusão celular, fagocitose e transporte de vesículas (SCHLEGEL e WILLIAMSON, 2001; OHASHI et. al., 1995) e pode estar relacionado com o armazenamento de energia no embrião (Liu et. al., 2021). Novamente, embora não possamos explicar exatamente o porquê, nosso trabalho mostra a importância do PI em distinguir embriões classificados como bons e ruins oriundos de matrizes de idade velha.

Na idade velha a acurácia, sensibilidade e especificidade para classificar os pintinhos de acordo com os metabólitos que apresentaram diferença é baixa. Isso sugere que

embora haja diferença na excreção dos metabólitos em mecônio, deve haver mais variáveis interferindo na qualidade dos pintinhos nessa idade. De todo modo, PI e OAM apresentam influência sobre a qualidade da pintainha, em especial o OAM que teve uma AUC maior que 70% (Tabela 4)

Além da relação com a idade da matriz nós apresentamos de forma inédita metabólitos que se relacionam com a qualidade da pintainha poedeira. Houve diferença entre metabólitos de aves classificadas como boas e ruins de forma geral ou nas diferentes categorias de idade. No entanto ao avaliar a associação entre qualidade de pintainhas e os metabólitos encontrados a acurácia, sensibilidade e especificidade foi menor do que a classificação de pintainhas de boa qualidade pela idade das matrizes. Uma das hipóteses para isso já foi levantada anteriormente que é uma classificação geral de pintainhas de qualidade ruim sem estratificar pela causa dessa qualidade e/ou um maior número de variáveis que interferem na classificação das pintainhas. Isso pode ser reforçado pela análise da PLS-DA que mostra um melhor agrupamento das pintainhas de boa qualidade em relação às de qualidade ruim para as idades (jovem e média). Interessantemente a acurácia e a sensibilidade caem para classificar pintainhas boas e ruins de acordo com os metabólitos para a idade velha mostrando que nessa fase também há outras variáveis que vão interferir a qualidade da pintainha. Outro ponto a se considerar é a própria amostra escolhida. O mecônio é uma amostra interessante pela facilidade da coleta, mas amostras de soro e sangue poderia explicar melhor a qualidade da pintainha e devem ser testadas em trabalhos futuros.

7 CONCLUSÕES

É possível notar diferenças no perfil metabólito de mecônio de pintainha poedeira de acordo com a categoria da idade da matriz que a originou e a classificação de qualidade da pintainha. De modo que, sensibilidade e especificidade em classificar pintinhas boas entre as idades da matriz é maior do que pintinhas ruins. Além disso, a idade mais velha da matriz contribui para uma menor acurácia e sensibilidade em classificar pintinhas boas ou ruins.

Nosso trabalho traz diferentes metabólitos como potenciais biomarcadores abrindo portas para futuros trabalhos com destaque para OXO, DI, OS, NST, CR, 7M para distinguir qualidade de pintainhas oriundas de matrizes jovens, NN, AP, AF, HC2, PTN, HV para classificar qualidade pintainhas oriundas de matrizes de idade média e OAM para classificar pintainhas oriundas de matrizes velhas.

Além disso, esse trabalho exhibe potenciais metabólitos que podem ser estudados a fim de mitigar os efeitos da idade da matriz sobre os dados de eclosão com destaque para os

metabólitos SB, CR, D3T e TRH.

REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual da ABPA 2023**. Disponível em: <https://abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/>

ABUZENADAH, ADEL M. et al. Identification of potential poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors derived from Rauwolfia serpentina: possible implication in cancer therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3787162>

AGBEHADZI, R. K. et al. Economic contribution of local hatchery performance in the poultry value chain in Ghana. **Poultry science**, v. 98, n. 6, p. 2399-2404, 2019. <https://doi.org/10.3382/ps/pez020>

AKBAR, Shahid; AKBAR, Shahid. Lepidium sativum L.(Brassicaceae) (Syns.: L. hortense Forssk.; L. spinescens DC.; Cardamon sativum (L.) Fourr.; Arabis chinensis Rottler ex Wight). **Handbook of 200 Medicinal Plants: A Comprehensive Review of Their Traditional Medical Uses and Scientific Justifications**, p. 1095-1100, 2020.

ALBALAWI, MARZOUGH AZIZ et al. The medicinal activity of lyophilized aqueous seed extract of Lepidium sativum L. in an androgenic alopecia model. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 7676, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33988-1>

ARAUJO ICS, LEANDRO NSM, MESQUITA MA, CAFE MA, MELLO HHC e GONZALES E. Water vapor conductance: a technique using eggshell fragments and relations with other parameters of eggshell. **Revista Brasileira de Zootecnia** 46(12): 896-902, 2017. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017001200004>

BARTNIK, M.; FACEY, P. Glycosides. In: Pharmacognosy. **Academic Press**, 2023.

BECK, Iwona et al. Effect of silver nanoparticles and hydroxyproline, administered in ovo, on the development of blood vessels and cartilage collagen structure in chicken embryos. **Archives of animal nutrition**, v. 69, n. 1, p. 57-68, 2015. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.992179>

BRUGGEMAN, VEERLE et al. Acid–base balance in chicken embryos (Gallus domesticus) incubated under high CO₂ concentrations during the first 10 days of incubation. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 159, n. 2, p. 147-154, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.04.013>

CAJKA, T., & FIEHN, O. Toward merging untargeted and targeted methods in mass spectrometry-based metabolomics and lipidomics. **Analytical Chemistry**, 88(1), 524-545. 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04491>

CHAUDHARY, CR et al. NMR-based metabolomics as a significant tool for human nutritional research and health applications. **Food Bioscience**, p. 102538, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102538>

CHEBI **Chemical Entities of Biological Interest**. 2022 disponível em:

<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:27300> 2021

CHEBI **Chemical Entities of Biological Interest**. 2022. Disponível em:

<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:27300>

CHELNOKOVA, M. I., SULEIMANOV, F. I., & CHELNOKOV, A. A. Synergistic Effect of Variable Temperature and Red LED Lighting During Incubation on the Growth and Metabolism of Chicken Embryos and the Quality of Day-Old Egg-Cross Chickens. **Russian Agricultural Sciences**, 49(1), 75-81. 2023. <https://doi.org/10.3103/S1068367423010068>

CHEN, M. J. et al. Methionine improves feather follicle development in chick embryos by activating Wnt/ β -catenin signaling. **Poultry science**, v. 99, n. 9, p. 4479-4487, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.047>

CHEN, T.; FU, F.; CHEN, Z.; LI, D.; ZHANG, L.; CHEN, G. Study on the photodegradation and microbiological degradation of pirimicarb insecticide by using liquid chromatography coupled with ion-trap mass spectrometry. **J. Chromatogr. A** 2009, 1216, 3217–3222. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.022>

CHRISTENSEN V L, WINELAND M J, ORT D T & MANN K M. Eggshell conductance and incubator ventilation as factors in embryo survival and poultry quality. **International Journal of Poultry Science** 4(11): 818-826, 2005. 10.3923/IJPS.2005.818.826

CHRISTENSEN, V. L. et al. Accelerating embryonic growth during incubation following prolonged egg storage. 2. Embryonic growth and metabolism. **Poultry Science**, v. 82, n. 12, p. 1869-1878, 2003.

<https://doi.org/10.1093/ps/82.12.1863>

CHRISTENSEN, V. L. et al. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue

glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, n. 12, p. 1729-1735, 2001.

<https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1729>

COWAN, E et al. Treatment of lean and diet-induced obesity (DIO) mice with a novel stable obestatin analogue alters plasma metabolite levels as detected by untargeted LC–MS metabolomics. **Metabolomics**, v. 12, p. 1-14, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1063-0>

CRUICKSHANK-QUINN, C et al. Determining the presence of asthma-related molecules and salivary contamination in exhaled breath condensate. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, p. 1-22, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0538-5>

DA CUNHA, P A. et al. Metabolomic Analysis of Plasma from Breast Cancer Patients Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry: An Untargeted Study. **Metabolites**, v. 12, n. 5, p. 447, 2022. <https://doi.org/10.3390/metabo12050447>

DA HORA, N R S. Avaliação metabolômica e atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de extratos do estigma de zea mays l. **Dissertação mestrado, UFBA, Salvador**. 2021.

DAYAN, J., MELKMAN-ZEHAVI, T., REICHER, N., BRAUN, U., INHUBER, V., MABJEESH, S J, e UNI, Z. Supply and demand of creatine and glycogen in broiler chicken embryos. **Frontiers in Physiology**, 14, 72. 2023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1079638>

DE OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 4, p. 488-499, 2008. <https://doi.org/10.1017/S0043933908000160>

DEAN, J. M., & LODHI, I. J. Structural and functional roles of ether lipids. **Protein & cell**. 9(2), 196-206. 2018. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0423-5>

DECUYPERE, E. Effect of incubation temperature patterns on morphological, physiological and reproduction criteria in Rhode Island Red birds. **Agricultura** 27:216–230. 1979

DECUYPERE, E. e BRUGGEMAN, V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 1037-1042, 2007. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1037>

DEEMING, C.; APPLEBY, J. Measuring performance. Green with envy?. **The Health Service Journal**, v. 110, n. 5734, p. 22-25, 2000.

DEFOSSEZ, E. et al. Eight key rules for successful data-dependent acquisition in mass spectrometry-based metabolomics. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 42, n. 1, p. 131-143, 2023.

<https://doi.org/10.1002/mas.21715>

DU PREEZ, J. H. The effect of different incubation temperatures on chick quality. **Tese de Doutorado. University of Stellenbosch. Stellenbosch.** 2007

ELGEMEIE, G H. MOHAMED-EZZAT, R A. New Strategies Targeting Cancer Metabolism: Anticancer Drugs, Synthetic Analogues and Antitumor Agents. **Elsevier**, 2022.

EPA **Dichloroethyl ether (BIS(2-Chloroethyl)Ether)**. 2000. Disponível em:

<https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/dichloroethyl-ether.pdf> 2002

FARIAS, T M et al. Effect of in ovo injection of DL-methionine on hatchability, embryo mortality, hatching weight, blood biochemical parameters and gastrointestinal tract development of breeder chicks. **Animal Biotechnology**, p. 1-10, 2023. <https://doi.org/10.1080/10495398.2023.2199501>

FATHI, M A et al. Disruption of cytochrome P450 enzymes in the liver and small intestine in chicken embryos in ovo exposed to glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 16865-16875, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08269-3>

FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. **Plant molecular biology**, v. 48, p. 155-171, 2002. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0448-0_11

FIRMAN, C A B., INHUBER, V., CADOGAN, D. J., VAN WETTERE, W. H., & FORDER, R. E. Effect of in ovo creatine monohydrate on hatchability, post-hatch performance, breast muscle yield and fiber size in chicks from young breeder flocks. **Poultry Science**, 102(3), 102447. 2023
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102447>

FIUME, M.M., HELDRETH, B., BERGFELD, W.F., BELSITO, D.V., Hill, R.A., KLAASSEN, C.D., LIEBLER, D., MARKS, J.J., SHANK, R.C., SLAGA, T.J., SNYDER, P.W., ANDERSEN, F.A. Safety assessment of triethanolamine and triethanolamine-containing ingredients as used in cosmetics. **Int J. Toxicol.** 32, 59S–83S. 2013.

FREYSZ, L., HORROCKS, L. A., & MANDEL, P. Activities of Enzymes Synthesizing Diacyl, Alkylacyl, and Alkenylacyl Glycerophosphoethanolamine and Glycerophosphocholine During

Development of Chicken Brain. **Journal of Neurochemistry**, 34(4), 963–969. 1980 doi:10.1111/j.1471-4159.1980.tb09672.x

FU, C et al. Maternal conjugated linoleic acid alters hepatic lipid metabolism via the AMPK signaling pathway in chick embryos. **Poultry science**, v. 99, n. 1, p. 224-234, 2020.
<https://doi.org/10.3382/ps/pez462>

GIVISIEZ, P E N et al. Chicken embryo development: Metabolic and morphological basis for in ovo feeding technology. **Poultry Science**, v. 99, n. 12, p. 6774-6782, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.074>

GOOSSENS, E et al. Omics technologies in poultry health and productivity—part 2: future applications in the poultry industry. **Avian Pathology**, v. 51, n. 5, p. 418-423, 2022.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2022.2085545>

GU, X. Method Development of Chemical Isotope Labeling of Cellular Extract and Biofluids on Metabolomics Profiling and Its Application for Disease Biomarker Discovery. **Dissertação de mestrado**. 2019. <https://doi.org/10.7939/r3-7mah-k592>

HJELM, C. Identifying factors of importance for chick quality and traits that may predict chick quality. **Tese de doutorado**. 2018.

HMDB. **The Human Metabolome Database**. 2021. Disponível em:
<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0011166>

HU, L et al. Predicting biological functions of compounds based on chemical-chemical interactions. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e29491, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029491>

İPEK, A. SÖZCÜ, A. Broiler chick quality and scoring methods. **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 27, 131-137, 2013. <http://hdl.handle.net/11452/5351>

KARCHER, D. M.; MCMURTRY, J. P.; APPELEGATE, T. J. Developmental changes in amniotic and allantoic fluid insulin-like growth factor (IGF)-I and-II concentrations of avian embryos. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: **Molecular & Integrative Physiology**, v. 142, n. 4, p. 404-409, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.08.027>

KEEG, **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**. Disponível em:

<https://www.genome.jp/entry/C17229>. 2023

KETELAERE, B. De et al. Measuring the eggshell strength of 6 different genetic strains of laying hens: techniques and comparisons. **British poultry science**, v. 43, n. 2, p. 238-244, 2002.

<https://doi.org/10.1080/00071660120121454>

KETELS, P. Controlling chick quality. **Tese de Doutorado. Van Hall Larenstein. Leeuwarden**. 2011.

KIM, Eunsoo et al. Pollutants enhance IgE sensitization in the gut via local alteration of vitamin D-metabolizing enzymes. **Mucosal Immunology**, v. 15, n. 1, p. 143-153, 2022.

<https://doi.org/10.1038/s41385-021-00440-4>

KIM, Minji et al. 10-oxo-12 (Z)-octadecenoic acid, a linoleic acid metabolite produced by gut lactic acid bacteria, enhances energy metabolism by activation of TRPV1. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 11, p. 5036-5048, 2017.

<https://doi.org/10.1096/fj.201700151R>

KITA, K et al. Effect of in ovo administration of branched-chain amino acids on embryo growth and hatching time of chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 52, n. 1, p. 34-36,

2015. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0130208>

KITA, K; MAKINO, R. Influence of valine analogues on protein synthesis of chicken embryo myoblasts. **The Journal of Poultry Science**, v. 51, n. 2, p. 191-194, 2014. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0130162>

KUMAR, N et al. Chemical and biological aspects of iridoid bearing plants of temperate region. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 32, p. 247-302, 2005. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80058-4](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80058-4)

LI, C. et al. Expression analysis of global gene response to chronic heat exposure in broiler chickens (*Gallus gallus*) reveals new reactive genes. **Poultry science**, v. 90, n. 5, p. 1028-1036, 2011.

<https://doi.org/10.3382/ps.2010-01144>

LINGG, ROBERT D. et al. Comparative metabolism of 1, 2, 4-trichlorobenzene in the rat and rhesus monkey. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 10, n. 2, p. 134-141, 1982.

LIU, H., DING, P., TONG, Y., HE, X., YIN, Y., ZHANG, H., & SONG, Z. Metabolomic analysis of the egg yolk during the embryonic development of broilers. **Poultry science**, 100(4), 101014. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.01.036>

LIU, Liguao et al. Identification of potential biomarkers for diagnosis of syphilis from the cerebrospinal

fluid based on untargeted metabolomic analysis. **Molecular Omics**, 2023.

<https://doi.org/10.1039/D3MO00026E>

LOURENS, A. et al. Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. **Poultry science**, v. 84, n. 6, p. 914-920, 2005.

<https://doi.org/10.1093/ps/84.6.914>

LU, J.W., MCMURTRY, J.P. e COON, C.N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry Science** 86: 673-683. 2007. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.673>

MACHADO, P. et al. Effects of breeder age on embryonic development, hatching results, chick quality, and growing performance of the slow-growing genotype. **Poultry science**, v. 99, n. 12, p. 6697-6704, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.008>

MANJULA, B.; GOWDA, K. P. Metabolomics-An Exciting New Field within the “OMICS” Sciences. **Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics**, v. 2, n. 6, p. 363-369, 2010.

MCLOUGHLIN, L.; GOUS, R. M. The effect of egg size on pre-and post-natal growth of broiler chickens. **Poultry Bulletin**.1999.

MOLENAAR, R; REIJRINK, I. **Chick length and organ development**. Netherlands, 2011. Disponível em: <https://hatchtech.com/article/chick-length-and-organ-development/#:~:text=Inge%20Reijrink%20M.Sc.,potential%20than%20a%20shorter%20chick.>

MORAN, E T. Moran Nutrition of the developing embryo and hatchling. **Poultry. Science.**, 86, pp. 1043-1049, 2007. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1043>

MORTOLA, J P.; COONEY, E. Cost of growth and maintenance in chicken embryos during normoxic or hypoxic conditions. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 162, n. 3, p. 223-229, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.07.015>

MUELLER, C A.; BURGGREN, W W.; TAZAWA, H. The physiology of the avian embryo. In: Sturkie's avian physiology. **Academic Press**. p. 1015-1046. 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819770-7.00030-X>

NANGSUAY, A. et al. Energy utilization and heat production of embryos from eggs originating from young and old broiler breeder flocks. **Poultry Science**, v. 92, n. 2, p. 474-482, 2013.

<https://doi.org/10.3382/ps.2012-02643>

NAPPER, S. et al. Induction of tissue-and stressor-specific kinomic responses in chickens exposed to hot and cold stresses. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1333-1345, 2015. <https://doi.org/10.3382/ps/pev046>

NARINÇ, D.; AYDEMİR, E. Chick quality: an overview of measurement techniques and influencing factors. **World's Poultry Science Journal**, v. 77, n. 2, p. 313-329, 2021.
<https://doi.org/10.1080/00439339.2021.1892469>

NASRI, Hedia et al. Interactions between egg storage duration and breeder age on selected egg quality, hatching results, and chicken quality. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1719, 2020.
<https://doi.org/10.3390/ani10101719>

NAYAK, N et al. Effect of in ovo feeding of arginine and/or tryptophan on hatchability and small intestinal morphology in broiler chicken. **Indian Journal of Poultry Science**, v. 50, n. 1, p. 18-23, 2015.

NAYAK, N et al. Effect of in ovo feeding of tryptophan on post-hatch production performance and immune response in commercial broilers. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v. 18, n. 3, p. 355-366, 2018. DOI: 10.5958/0974.181X.2018.00033.1

NIH PUBCHE. National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 36383, HC Blue no. 2**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/HC-Blue-no.-2>. Accessed Dec. 12, 2023.

OGUNMOYO, O. A.; ODUNSI, A. A. Incidence of abnormalities in hatched day-old chicks of a commercial hatchery in Ogbomoso, Oyo-State, Southwest Nigeria. **Nigerian Journal of Animal Science**, v. 20, n. 3, p. 156-161, 2018.

OHASHI M, JAN DE VRIES K, FRANK R, SNOEK G, BANKAITIS V, WIRTZ K, HUTTNER WB. A role for phosphatidylinositol transfer protein in secretory vesicle formation. **Nature** 377(6549):544–547, 1995. <https://doi.org/10.1038/377544a0>

OHSHIMA H, FRIESEN M, BARTSCH H. Identification in rats of N-nitrosonipecotic acid as a major urinary metabolite of the areca-nut alkaloid-derived nitrosamines, N-nitrosoguvacoline and N-nitrosoguvacine. **Cancer Lett.**;44(3):211-216. DOI:10.1016/0304-3835(89)90063-3, 1989.

ONUH, J O. et al. A metabolomics approach for investigating urinary and plasma changes in

spontaneously hypertensive rats (SHR) fed with chicken skin protein hydrolysates diets. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 20-33, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.010>

OUATTARA, D A et al. An integrated transcriptomics and metabolomics study of the immune response of newly hatched chicks to the cytosine-phosphate-guanine oligonucleotide stimulation. **Poultry science**, v. 99, n. 9, p. 4360-4372, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.017>

PALOU, M et al. Metabolomic approach in milk from calorie-restricted rats during lactation: A potential link to the programming of a healthy phenotype in offspring. **European journal of nutrition**, v. 59, p. 1191-1204, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01979-6>

PAN, Daodong et al. The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 13, p. 3898-3904, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.033>

PARRY, R; NISHINO, S; SPAIN, J. Naturally-occurring nitro compounds. **Natural product reports**, v. 28, n. 1, p. 152-167, 2011. DOI: [10.1039/C0NP00024H](https://doi.org/10.1039/C0NP00024H)

PENG, M. L. et al. Metabolomics reveals the mechanism of (–)-hydroxycitric acid promotion of protein synthesis and inhibition of fatty acid synthesis in broiler chickens. **Animal**, v. 12, n. 4, p. 774-783, 2018. <https://doi.org/10.1017/S175173111700221X>

PETEK, M et al. Physical chick parameters and effects on growth performance in broiler. **Archives Animal Breeding**, v. 53, n. 1, p. 108-115, 2010. <https://doi.org/10.5194/aab-53-108-2010>

PULIKANTI, R. et al. Pipping muscle and liver metabolic profile changes and relationships in broiler embryos on days 15 and 19 of incubation. **Poultry science**, v. 89, n. 5, p. 860-865, 2010. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00531>

QIN, J et al. Gas chromatography-mass spectrometry-based untargeted metabolomics analysis reveals circulating biomarkers related to wooden breast myopathy in broilers: a preliminary study. **Poultry Science**, v. 102, n. 7, p. 102718, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102718>

RADUAN, Siti Zaleha et al. Antioxidant capabilities of Litsea garciae bark extracts and their relation to the phytochemical compositions. **Malaysian Applied Biology**, v. 51, n. 1, p. 99-118, 2022. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v51i1.2038>

RAMIREZ H, S. Advancing The Applications of In vitro Metabolomics in Toxicology. **Tese de Doutorado. Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau**. 2023.

RANGHOLIA, N., LEISNER, T. M., & HOLLY, S. P. Bioactive ether lipids: primordial modulators of cellular signaling. **Metabolites**, 11(1), 41. 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11010041>

REBOLLEDO, O. F. P. et al. Effect of the Line and Age of Female Broiler Breeder on Hatchability Performance of Eggs. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 25, 2023. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2022-1639>

REICHER, N., EPSTEIN, T., GRAVITZ, D., CAHANER, A., RADEMACHER, M., BRAUN, U., & UNI, Z. From broiler breeder hen feed to the egg and embryo: The molecular effects of guanidinoacetate supplementation on creatine transport and synthesis. **Poultry science**, 99(7), 3574-3582. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.052>

RIBBENSTEDT, A., ZIARRUSTA, H., & BENSKIN, J. P. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. **PLoS One**, 13(11), e0207082. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>

ROBERTS, L. D., SOUZA, A. L., GERSZTEN, R. E., CLISH, C. B. Targeted metabolomics. Current Protocols In **Molecular Biology**, 98(1), 30.2.1-30.2.24, 2012. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>

ROMANOFF, A.L. **The avian embryo; structural and functional development** (New York, 1960. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19600101721>

SCHLEGEL R A, WILLIAMSON P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death Differ** 8(6):551–563. 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400817>

SCHLIMME, E; OTT, F G; KIESNER, C. Reaction kinetics of the heat-induced formation of N6-methyladenosine in milk. **International Dairy Journal**, v. 4, n. 7, p. 617-627, 1994. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)90037-X)

SHAPIR, N et al. Purification, substrate range, and metal center of AtzC: the N-isopropylammelide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5376-5384, 2002. <https://doi.org/10.1128/jb.184.19.5376-5384.2002>

SHI, H et al. Growth performance, digestibility, and plasma metabolomic profiles of Saanen goats

- exposed to different doses of aflatoxin B1. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 12, p. 9552-9563, 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22129>
- SIDDIQUI, S; HAIDER, S. I; AHMAD, S. S. A New Alkaloid from the Roots of Rauwolfia serpentina. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 238-240, 1987. <https://doi.org/10.1021/np50050a022>
- SISKEN, B F.; ROBERTS, E; GOETZ, I. Triethanolamine, tris, hepes, and cytosine arabinoside show neuritogenic activity in cultured chick embryo ganglia. **Experimental neurology**, v. 88, n. 1, p. 27-43, 1985. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(85\)90111-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(85)90111-6)
- SPEAKE, B. K., NOBLE, R. C., & MURRAY, A. M. B. The utilization of yolk lipids by the chick embryo. **World's Poultry Science Journal**, 54(04), 319–334.1998. doi:10.1079/wps19980022
- SUN, L et al. Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, p. 939-950, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0621-0>
- SUNDQVIST, K et al. Cytotoxic and genotoxic effects of areca nut-related compounds in cultured human buccal epithelial cells. **Cancer research**, v. 49, n. 19, p. 5294-5298, 1989.
- TOMONAGA, Shozo et al. Effects of high ambient temperature on plasma metabolomic profiles in chicks. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 2, p. 448-455, 2018. <https://doi.org/10.1111/asj.12951>
- TONA, Kokou et al. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight, and chick posthatch growth to forty-two days. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, n. 1, p. 10-18, 2004. <https://doi.org/10.1093/japr/13.1.10>
- TONA, K et al. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. **Poultry science**, v. 82, n. 5, p. 736-741, 2003. <https://doi.org/10.1093/ps/82.5.736>
- TRIFONOVA, O P. et al. Current State and Future Perspectives on Personalized Metabolomics. **Metabolites**, v. 13, n. 1, p. 67, 2023. <https://doi.org/10.3390/metabo13010067>
- UDDIN, Z; HAMIDU, J. A. Prolong egg storage affects broiler breeder embryonic metabolism and chick quality. **Journal of Animal Advances**, v. 4, p. 973-977, 2014. [10.5455/jasa.20140713053547](https://doi.org/10.5455/jasa.20140713053547)
- ULMER-FRANCO, A. M. et al. Hatching egg and newly hatched chick yolk sac total IgY content at 3 broiler breeder flock ages. **Poultry science**, v. 91, n. 3, p. 758-764, 2012. 10.3382/ps.2011-01757

UNI, Z. et al. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, n. 5, p. 764-770, 2005. 10.1093/ps/84.5.764 <https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764>

UNI, Z., TAKO, E., GAL-GARBER, O. and SKLAN, D. Morphological, molecular, and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. **Poultry Science** 82: 1747-1754, 2003. 10.1093/ps/82.11.1747

UNI, Z.; YADGARY, L.; YAIR, R. Nutritional limitations during poultry embryonic development. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 21, n. 1, p. 175-184, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.007>

VALENTINE, William J. et al. Biosynthetic enzymes of membrane glycerophospholipid diversity as therapeutic targets for drug development. **Druggable Lipid Signaling Pathways**, p. 5-27, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-50621-6_2

VAN DE VEN, L. J. F. et al. Significance of chick quality score in broiler production. **Animal**, v. 6, n. 10, p. 1677-1683, 2012. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000663>

VAN DER WAGT, I et al. A review on yolk sac utilization in poultry. **Poultry Science**, v. 99, n. 4, p. 2162-2175, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.041>

VUKO, E et al. A Plant Worthy of Further Study—Volatile and Non-Volatile Compounds of *Portenschlagiella ramosissima* (Port.) Tutin and Its Biological Activity. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 12, p. 1454, 2022. 10.3390/ph15121454

WALKER, James B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, v. 50, n. 177, p. 2, 1979. 10.1002/9780470122952.ch4

WANG, H et al. Serum metabonomics as a diagnostic approach for cancer related fatigue. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 23, n. 4, p. 1-9, 2022. 10.3892/etm.2022.11181

WANG, Z et al. Impact of interactions between whey protein isolate and different phospholipids on the properties of krill oil emulsions: A consideration for functional lipids efficient delivery. **Food Hydrocolloids**, v. 130, p. 107692, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107692>

WIJNEN, H. J. et al. Effects of late incubation temperature and moment of first post-hatch feed access on

neonatal broiler development, temperature preference, and stress response. **Poultry Science**, v. 101, n. 10, p. 102088, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102088>

WILLEMSSEN, Hilke et al. Critical assessment of chick quality measurements as an indicator of posthatch performance. **Poultry science**, v. 87, n. 11, p. 2358-2366, 2008. 10.3382/ps.2008-00095

WISHART, David S. et al. HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D622-D631, 2022. 10.1093/nar/gkab1062

WOLANSKI, N. J. et al. Relationships among egg characteristics, chick measurements, and early growth traits in ten broiler breeder strains. **Poultry Science**, v. 86, n. 8, p. 1784-1792, 2007. 10.1093/ps/86.8.1784

WOLFENDER, Jean-Luc et al. Metabolomics in ecology and bioactive natural products discovery: challenges and prospects for a comprehensive study of the specialised metabolome. **Chimia**, v. 76, n. 11, p. 954-963, 2022. 10.2533/chimia.2022.954

WU, Quan-Xiang; SHI, Yan-Ping; JIA, Zhong-Jian. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. **Natural product reports**, v. 23, n. 5, p. 699-734, 2006.

XAVIER, Janaína et al. Ayahuasca prevents oxidative stress in a rat model of depression elicited by unpredictable chronic mild stress. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 48, p. 90-98, 2021. <https://doi.org/10.15761/0101-608300000000286>

XIMENES, L; SOARES, K. **Agropecuária: Frango**. 2023. Disponível em: <https://g20mais20.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/1732>.

YAMAK, U S; CILAVDAROĞLU, E; ABACI, H S. Effects of age and eggshell thickness on the hatching results of stored broiler breeder eggs. **Tropical Animal Health and Production**, v. 55, n. 5, p. 337, 2023. 10.3382/ps.0731838

YEBOAH, P. P. et al. Comparative analysis of hatcheries contribution to poor development of day-old chicks based on biological and immunological performance. **Veterinary World**, v. 12, n. 11, p. 1849, 2019. 10.14202/vetworld.2019.1849-1857

YOSHIKAWA, M et al. Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmane-type sesquiterpenes, kikkanols A, B, and C, from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. **Chemical and**

ZHOU, Chen et al. Urinary metabolomics reveals the biological characteristics of early pregnancy in pigs. **Porcine Health Management**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2022. 10.1186/s40813-022-00256-z

ZHOU, H. et al. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. IV. Metabolic traits. **Poultry science**, v. 86, n. 2, p. 267-276, 2007. 10.1093/ps/85.10.1712

ZHOU, Nan et al. Purification, characterization, and catalytic mechanism of N-Isopropylammelide isopropylaminohydrolase (AtzC) involved in the degradation of s-triazine herbicides. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115803, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115803>

MATERIAL SUPLEMENTAR

(Artigo a ser submetido para revi **Tabela suplementar 1:** Peso de cada metabólito dentro das diferentes componentes da PSL-DA de pintinhas classificadas pela idade (jovem, média e velha) das categorias boas

Metabólitos	PC1 bons
3R	0,39
NC	-0,43
PS	-0,64
GPL	-0,81064
SB	-0,86293
MG 18	0,59555
Pir	-0,85826
OAG	-0,67697
CR	0,742059
PI	-0,52683
NN	0,348771
TO	-0,28339
D3T	0,796814
TRH	0,86266
HCG	0,661844
MG16	0,731979

- não expressa. (3R): “3R, 7R)- 1, 3, 7 Octanetriol” (NC): “N-Cyclopropylammelide” (PS): “PS(O-16:0/15:0)”, (GPL): “Gly Pro Lys” (SB): “Semilepidinoside B” (MG18): “MG(18:0/0:0/0:0)[rac]” (PIR): “Pirimicarb” (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol” (CR): “creatine”, (PI): “PI(O-20:0/21:0)” (NN) “N – nitrosoguvacine” (TO): “Trolamine” (TRH): “Thyrotropin releasing hormone” (D3T): “1 α -hydroxy-23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradecahydro-24,25,26,27-tetranorvitamin D3 / 1 α -hydroxy-

23-[3-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-22,22,23,23-tetradehydro-24,25,26,27-tetranorcholecalciferol” (HCG):
 “Hexadecyl Acetyl Glycerol” (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol” (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”

Tabela suplementar 2: Peso de cada metabólito dentro das diferentes componentes da PSL-DA de pintinhas classificadas pela qualidade geral

Metabólito	
HV	-0,67
PI	-0,10
NN	-0,49
N6	0,73
7M	0,54

(HV): “Hydroxypropyl-L-Valine” (PI): “PI(O-20:0/21:0)” (NN) “N – nitrosoguvaccine” (N6): “N6-Carbamoyl-L-threonyladenine” (7M): “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid”

Tabela suplementar 3: Peso de cada metabólito dentro das diferentes componentes da PSL-DA de pintinhas classificadas pela qualidade de pintinhas oriundas de matrizes jovens

Compound	
PE	0,37
D3	0,51
BIS	0,69
OXO	0,68
DI	0,77
PS	0,62
NST	0,78
SB	0,40
OAG	0,06
CR	-0,62
LB	-0,39
7M	-0,66

(PE): “PE (21:0:0)” (D3): “1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epivitamin D3 / 1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-24a-homo-22-thia-20-epicholecalciferol” (BIS): “Bis(2-chloroethyl)ether” (OXO): “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid” (DI): “Dihydro Isorescinnamine” (PS): “PS(O-16:0/15:0)”, (NST): “N-stearoyl tryptophan” (SB): “Semilepidinoside B” (OAG): “1-(O-alpha-D-glucopyranosyl)-29-keto-(1,3R,31R)-dotriacontanetriol” (CR): “creatine”, (LB): “L-beta-aspartyl-L-leucine” (7M): “7-methyl-1-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid”

Tabela suplementar 4: Peso de cada metabólito dentro das diferentes componentes da PSL-DA de pintinhas classificadas pela qualidade de pintinhas oriundas de matrizes médias

Compound	WC0
HV	-0,52
KA	-0,55
NN	-0,79
N6	0,42
OXO	-0,67

AP	-0,63
HCG	-0,54
AF	-0,69
HC2	-0,73
PTN	-0,66
MG16	-0,56

(HV): “Hydroxypropyl-Valine” (KA): “Kikkanol A”, (NN) “N – nitrosoguvaccine” (N6): “N6-Carbamoyl-L-threonyl-adenosine” (OXO): “Z12-oxo-10Z-octadecenoic acid” (AP): “Asn Phe” (HCG): “Hexadecyl Acetyl Glycerol” (AF): “AFMK” (HC2): “HC Blue No.2”
 (PTN): Pentahomomethionine” (MG16): “MG(0:0/16:0/0:0)”