BRUNO ROGÉRIO RUI

Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte

São Paulo

2018

BRUNO ROGÉRIO RUI

Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO
035061

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3663
FMVZ

Rui, Bruno Rogério
Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte. / Bruno Rogério Rui. – 2018.
67 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira.

1. Reversão sexual. 2. Inibidor de aromatase. 3. Aromatase P450. 4. Ganho de peso. 5. Frango de corte. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte ", protocolada sob o CEUA nº 8475301115, sob a responsabilidade de **Ricardo José Garcia Pereira** *e equipe; Bruno Rogério Rui* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/07/2017.

We certify that the proposal "Application effect of aromatase inhibitors on sex reversal and growth performance of broiler chickens", utilizing 100 Birds (males and females), protocol number CEUA 8475301115, under the responsibility of **Ricardo José Garcia Pereira** *and team; Bruno Rogério Rui* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/03/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 02/2016 a 02/2017 Área: Reprodução de Aves

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Aves	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 42 dias	N:	100
Linhagem:	Lohmann			Peso:	37 a 3000 g		

Resumo: Os ovos serão incubados e a aplicação dos inibidores de aromatase ocorrerá no terceiro dia de incubação. Após a eclosão as aves serão mantidos em baias com cama de maravalha com ração e água ''ad libitum''. As aves serão pesadas semanalmente e com 42 dias serão eutanasiadas. À necrópsia serão colhidos o fígado para realização do PCR para a sexagem e os testículos/ovários para a realização da histologia.

Local do experimento: Departamento de reprodução animal (VRA/FMVZ/USP)

São Paulo, 13 de julho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUI, Bruno Rogério

Título: Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Dedico este trabalho ao meus pais e a minha vó Teresa (*in memorian*).

´´Know your head is spinning
Broken hearts will mend
This is our beginning
Coming to an end´´

(Foo Fighters – Wheels)

AGRADECIMENTOS

Durante o meu doutorado umas das principais convicções que obtive foi que não se faz ciência sozinho. O apoio e auxilio de muitos amigos foram essenciais para a realização deste trabalho. E por isso tenho que agradecer muitas pessoas. O grande legado deste doutorado, além do conteúdo científico, foram os grandes amigos que fiz ao longo desta jornada que a tornou muito mais leve e principalmente divertida.

Agradeço primeiramente meus pais que nunca mediram esforços para que eu estudasse. Meu pai sempre foi meu maior exemplo de honestidade, trabalho e principalmente dedicação à família. Já minha mãe sempre me apoiou incondicionalmente me mostrando o caminho correto a seguir. Ambos me ensinaram que não existe sucesso sem dedicação e trabalho.

Agradeço imensamente ao meu orientador Professor Ricardo por toda dedicação, confiança e respeito dedicados a mim. Além de todo o aprendizado recebido levo essa amizade para a vida.

Agradeço também a todos os amigos do GEMA que foram fundamentais para a realização do projeto. Agradeço ao Marcel, Gabriel, Mayra, Victor e Brian.

Agradeço ao Professor Marcílio pela grande amizade, e por ter aberto as portas do VRA para mim e principalmente do laboratório de andrologia. Além dos ensinamentos sobre estatística e delineamento experimental agradeço pelas divertidas noites de poker e os banquetes preparados por você na sua casa.

Agradeço a Tis e o Mide pois além da irmandade de mais de 12 anos me deram o privilégio de ser padrinho do Gabriel, meu grande presente nestes últimos 4 anos. Também a agradeço a Tia Lili, Tati, Vó Leila e Julinha por me fazerem parte da família de vocês.

Agradeço ao Daniel e Diego por toda parceria e irmandade de todos esses anos. Vocês definitivamente fizeram toda a diferença. Agradeço também aos amigos do VRA: Luana, Andressa, Bobbie, Giulia e Bárbara.

Agradeço aos funcionários do VRA em especial a Harumi, Roberta, Thais, Loide, Camilla, Claúdia, Sandra, Ira e Belau.

Agradeço a todos os professores do VRA em especial aos Professores Pietro, Camila e Mayra.

Agradeço também ao médico veterinário Felipe Kroetz que foi fundamental para realização dos experimentos no incubatório industrial. Também agradeço aos funcionários do incubatório, Beatriz, Jane, Cristina, André, Fábio e Vinicius.

Agradeço à banca examinadora composta pelos professores Pietro, Fábio, Irene e Jorge pela grande contribuição e ensinamentos passados.

Por fim agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

PER ASPERA AD ASTRA! O caminho é longo mas atingiremos os astros.

RESUMO

RUI, B. R. **Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte** [Effect of the application of aromatase inhibitors on sex reversal and zootechnical performance of broiler chickens]. 2018. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Na avicultura industrial, diferenças no desempenho zootécnico de machos e fêmeas de linhagens pesadas forçam o setor a alojar separadamente os sexos com o propósito de facilitar manejo, uniformizar lotes, reduzir custos e otimizar a produção. Desse modo, meios que reduzam ou eliminem a disparidade entre sexos no âmbito zootécnico podem resultar em ganhos gerenciais e econômicos no mercado avícola. A masculinização de fêmeas objetivando aproximar sua performance àquela manifestada por machos pode ser considerado um recurso interessante. Sendo assim a aplicação de inibidores ou bloqueadores da aromatase P450 durante o desenvolvimento embrionário pode induzir graus variados de masculinização das fêmeas sem a utilização de protocolos hormonais, em um fenômeno chamado reversão sexual. Assim, os objetivos desse projeto foram: (1) comparar a ação de inibidores de aromatase de terceira geração (Droga B e droga C) em relação ao fadrozole (fármaco amplamente citado em literatura) sobre a taxa e o grau de reversão sexual em frangas de corte; e (2) estimar o impacto desses tratamentos sobre parâmetros de incubação (mortalidade embrionária e eclodibilidade) e índices zootécnicos (peso ao nascer, ganho de peso, conversão alimentar e peso final aos 42 dias). Os resultados, deste estudo, mostraram que o inibidor de aromatase droga B obteve maior proporção machos quando comparado aos outros IAs testados. Contudo, quando avaliamos as aves tratadas por este fármaco, em relação aos índices zootécnicos, estas apresentaram resultados similares ao grupo misto e inferior quando comparadas aos machos genéticos. Na sexagem morfológica aos 42 dias de idade foi observado que no grupo tratado com a droga B, 58% das aves apresentavam ovário ou *ovostestis* ao invés de testículos o que impactou negativamente no ganho de peso deste grupo.

Palavras-chave: Reversão sexual, Inibidor de aromatase, Aromatase P450, ganho de peso, frangos de corte

ABSTRACT

RUI, B. R. Effect of the application of aromatase inhibitors on sex reversal and zootechnical performance of broiler chickens [**Efeito da aplicação de inibidores de aromatase na reversão sexual e desempenho zootécnico de frangos de corte]**. 2018. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Performance diferences between male and female broilers compel the poultry industry to rear sexes separately in order to favor management, uniform flocks, reduce costs and optimize production. Notwithstanding, this practice has logistical implications that create additional expenses, and in some cases, broiler companies encounter producer preferences for a particular sex due to its productive traits. Thus, methods that reduce or eliminate gender disparity in meat production efficiency can result in operational and economical benefits to poultry market. Masculinization of females aiming to bring performance closer to those expressed by males may be viewed as an interesting alternative. Therefore, the application of aromatase inhibitors or blockers during embryonic development can induce varying degrees of female masculinization without the use of hormonal protocols, in a process called sex reversal. Therefore, our objectives herein were: (1) to compare the action of third generation aromatase inhibitors (Drug B and Drug D) in relation to fadrozole (a drug widely used in literature) on the rate and degree of sexual reversal in broiler pullets; and (2) to estimate the impact of these treatments on incubation (embryonic mortality and hatchability) and performance parameters (birth weight, weight gain, feed conversion and final weight at 42 days). The results, from this study, showed that the aromatase inhibitor drug B obtained a higher rate of sexual reversion when compared to the other AIs tested. However, when we evaluated the birds treated by this drug, in relation to the zootechnical indexes, these presented similar results to the mixed and inferior group when compared to the genetic males. In the morphological sexing at 42 days of age, it was observed that in the group treated with AI, 58% of the birds presented ovary or ovostestis instead of testicles, which impacted the weight gain of this group.

Key-words: Sexual reversal, aromatase inhibitors, P450 aromatase, weight gain, broilers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático do processo de diferenciação sexual em aves.....19

Figura 2 – Modelo esquemático da janela de diferenciação sexual gonadal em embriões de galinha.....20

Figura 3 – Esquema do delineamento experimental do estudo em laboratório e a campo.....

Figura 4 – Taxas de eclodibilidade das injeções *in ovo* da Droga B efetuadas pelas vias lateral, média e superficial (Experimento 1/n= 70 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....36

Figura 5 – **(A)** Taxas de fertilidade e eclodibilidade e **(B)** porcentagens de machos e fêmeas nascidos após injeções *in ovo* usando um inibidor de aromatase de primeira geração (fadrozole), droga B e droga C (Experimento 2/n = 105 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....37

Figura 6 – **(A)** Taxas de fertilidade e eclodibilidade e **(B)** porcentagens de machos e fêmeas nascidos após injeções *in ovo* usando o inibidor de aromatase droga B nas doses de 0.1mg/ovo, 0.04mg/ovo e 0.02mg/ovo (Experimento 3/n = 104 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (NaCl) (P < 0.05).....38

Figura 7 – **(A)** Taxas de fertilidade e eclodibilidade e **(B)** porcentagens de machos, fêmeas nascidos após injeções *in ovo* usando o inibidor de aromatase droga D nas doses de 0.1mg, 0.04mg e 0.02mg. (Experimento 4/n = 104 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05)...39

Figura 8 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagens de machos, fêmeas e *ovotestis* e **(D)** peso ao nascer. Os fármacos fadrozole (A), droga B (B), droga D (C) e NaCl (VE) foram administrados, na dose de 0.1mg/0.1ml/ovo, sem incubação prévia 0h e com 72 horas de incubação (72h) (Experimento 5/n = 1790 ovos).....40

Figura 9 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagens de machos, fêmeas e *ovotestis* e **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos controle incubadora (C.I.), fadrozole 0.1mg (A), droga B 0.1mg (B), droga B 0.05mg (C), droga B 0.025mg (D) e NaCl (VE) (Experimento 6/n = 1512 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....42

Figura 10 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagens de machos, fêmeas e *ovotestis* e **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos foram controle incubadora (CON droga B 0.025mg vedado com parafina no volume de 50μl, droga B 0.025mg vedado com cola no volume de

50μl, droga B 0.025mg vedado com parafina no volume de 100μl, droga B 0.025mg vedado com cola no volume de 100μl, NaCl vedado com parafina no volume de 50μl, NaCl vedado com cola no volume de 50μl, vedado com parafina, vedado com cola, sem vedação (Experimento 7/n = 2184).....44

Figura 11 – **(A)** Peso aos 42 dias, **(B)** conversão alimentar dos tratamentos controle incubadora e droga B 0.025mg (Experimento 8/n = 1596 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....44

Figura 12 – **(A)** Proporção de machos, fêmeas e *ovotestis,* e **(B)** peso com 42 dias idade da droga B. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05)..... 45

Figura 13 – **(A)** Peso vivo e rendimento de carcaça **(B)** rendimento de cortes de aves abatidas com 43 dias dos grupos macho, fêmea, misto e droga B. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....46

Figura 14 – Resultados de embriodiagnóstico de ovos injetados apenas com veículo (NaCl) após 72 horas de incubação via vacinadora automática (OvoJector) dentro de um incubatório industrial (Experimento 9/n = 150 ovos). Mortalidade inicial (entre 0 e 7 dias de incubação), mortalidade intermediária (entre 8 e 14 dias de incubação) e mortalidade final (entre 15 e 21 dias de incubação).....47

Figura 15 – Imagem da avaliação do sexo morfológico por meio de necropsia em aves com 42 dias de idade tratadas com IAs. **(A)** ave com testículos, **(B)** ave com ovário e **(C)** ave com *ovotestis*.....61

Figura 16 – Imagem da avaliação do sexo morfológico por meio de necropsia em aves com um dia de idade tratadas com IAs. **(A)** ave com testículos, **(B)** ave com ovário e **(C)** ave com *ovotestis*.....62

Figura 17 – **(A)** Peso aos 7 dias, **(B)** 14, **(C)** 21, **(D)** 28 e **(E)** 35 dias dos tratamentos controle incubadora e droga B 0.025mg (Experimento 8/n = 1408 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso corporal para idade (PC), ganho médio de peso (GMP) e conversão alimentar acumulada (CAA) de dois genótipos comerciais de frangos de corte (Cobb 500 e Ross 308), machos e fêmeas no período de 1 a 42 dias de idade.....18

Tabela 2 – Quadro resumo de todos os experimentos realizados durante o Estudo em laboratório.....28

Tabela 3 – Quadro resumo de todos os experimentos realizados durante o Estudo a campo.....31

Tabela 4 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagem de machos **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos controle incubadora, droga B (Experimento 8/n = 1596 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).....45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....17
3. HIPÓTESE.....24
4. OBJETIVOS..... 25
5. MATERIAL E MÉTODOS.....26
5.1. Estudo em laboratório.....26
5.1.1. Delineamento Experimental.....26
5.1.2. Ovos embrionados.....27
5.2.3. Preparo das soluções.....28
5.1.3. Injeções *in ovo* dos IAs e incubação dos ovos em condições experimentais.....29
5.1.4. Avaliação da fertilidade, eclodibilidade e embriodiagnóstico.....29
5.1.5. Sexagem morfológica 30
5.2. Estudo a campo 30
5.2.1. Delineamento experimental 32
5.2.2. Ovos embrionados.....32
5.2.3. Sexagem cloacal e morfológica 32
5.2.4. Avaliação da fertilidade, eclodibilidade e embriodiagnóstico.....32
5.2.5. Injeções *in ovo* dos IAs em 0H e 72H e incubação dos ovos em incubatórios industriais (experimento 4) 33
5.2.6. Injeções *in ovo* da Droga B em diferentes doses em 0H e incubação dos ovos em incubatório industrial (experimento 5)..... 33
5.2.7. Injeções *in ovo* da Droga B em diferentes volumes com selagens distintas e incubação dos ovos em incubatório industrial (experimento 6).....33
5.2.8. Avaliação dos índices zootécnicos de aves revertidas com a Droga B em aviário experimental (experimento 7).....34
5.2.9. Injeções *in ovo* administrados por vacinadora incubação dos ovos em incubatório industrial (experimento 8).....35
5.2.10. Análise estatística 35
6. RESULTADOS 36
7. DISCUSSÃO.....50
8. CONCUSÃO.....60

9. REFERÊNCIAS..... 61
Apêndice A 64
Apêndice B.....65
Apêndice C.....66

1. INTRODUÇÃO

A contribuição da indústria avícola para a economia do Brasil é inquestionável. Em 2016, a produção brasileira de carne de frango atingiu 12,9 milhões de toneladas para atender um consumo per capita de 41,1 quilos/habitante, enquanto que as exportações totalizaram 4,38 milhões de toneladas gerando uma receita anual de U$6,84 bilhões (ABPA, 2017). Tais índices colocam o Brasil no posto de segundo maior produtor e primeiro exportador mundial de carne de frango (ABPA, 2017), condição alcançada graças a constantes melhorias nas mais variadas áreas da avicultura como manejo, nutrição, bem-estar, reprouçõo, sanidade, entre outras.

Todavia, a despeito desses avanços tecnológicos, a criação intensiva de aves domésticas tanto para a produção de carne quanto de ovos é alvo frequente de pressões, não só pela maximização de resultados zootécnicos mas também pela adequação dos sistemas produtivos as expectativas dos consumidores (bem-estar animal, a otimização no uso dos recursos naturais, etc.). Um exemplo disso é a conscientização pública sobre o abate de pintinhos machos entre as linhagens de poedeiras, processo que segundo Klein et al. (2003) acarreta na morte de 300 milhões de animais/ano apenas na Comunidade Econômica Europeia. Este impasse levou a intensificação dos estudos relacionados a sexagem de pintinhos *in ovo* e a manipulação da proporção de sexos via incubação dos ovos, a fim de contornar os problemas éticos relacionados ao abate em larga escala na avicultura industrial (STEINER et al., 2011; COLLINS et al. 2013; WEISSMANN et al., 2013). Porém, até o momento, nenhuma destas linhas de pesquisa apresentou resultados consistentes e adaptáveis à rotina dos incubatórios e, por essa razão, continuam a ser investigadas quanto a sua futura aplicabilidade.

Neste contexto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na determinação e diferenciação sexual em aves domésticas (e de possíveis métodos de controle destes fenômenos) pode também trazer incrementos econômicos para linhagens de pesadas. Por exemplo, diferenças sexuais no desempenho zootécnico levam muitas vezes à preferência de produtores por machos, em virtude de seus melhores resultados quanto ao ganho de peso, peso ao abate e conversão alimentar. Além disso, tais discrepâncias ligadas ao

sexo resultam no alojamento separado de machos e fêmeas com o propósito de oferecer manejo e nutrição diferenciados, fato que onera tanto indústria quanto produtores. Assim, o desenvolvimento de ferramentas que mitiguem as diferenças na performance de fêmeas pode gerar em um impacto financeiro considerável no setor avícola (MOHAMMADREZAEI et al., 2014). Uma maneira de atenuar algumas características produtivas indesejáveis de frangas (p.e. maior acúmulo de gordura corporal e menor conversão alimentar) é induzir a masculinização destas, mas o uso de hormônios com esse propósito, além de ilegal, é extremamente oneroso tornando esse método impraticável sob o ponto de visto ético e econômico (SCHEUERMANN et al., 2012). Alternativamente, graus variados de masculinização em fêmeas de aves podem ser alcançados pela ação de inibidores de aromatase durante a fase embrionária, em um processo chamado reversão sexual (RASHEDI et al., 1983). No entanto, grande parte das publicações disponíveis nesse tema utilizam o mesmo inibidor de aromatase (fadrozole) e seus impactos produtivos além de terem sido superficialmente explorados, mostram-se muitas vezes contraditórios.

Desse modo, o presente projeto visa avaliar inibidores de aromatase de terceira geração em relação ao fármaco usualmente empregado na reversão sexual de aves (fadrozole), considerando não apenas a eficácia desses tratamentos na reversão sexual, mas também o impacto desses princípios sobre a eclodibilidade dos ovos tratados, performance das frangas e custos de produção. Dados preliminares sugerem que, quando bem-sucedida, a reversão sexual com fadrozole resulta em galinhas maiores e mais pesadas (VAILLANT et al., 2001; VAILLANT et al., 2003), porém com taxas de crescimento e conversão alimentar aquém das apresentadas por machos da mesma linhagem (BURKE; HENRY, 1999). Logo, acreditamos que os resultados deste estudo contribuíram para o estabelecimento de protocolos mais eficientes para reversão de pintainhas de linhagens pesadas e que induzam fenótipos com características de desempenho mais próximos àqueles manifestados pelos machos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O dinamismo e a competitividade da indústria avícola nas últimas décadas têm motivado o setor a intensificar os programas de melhoria genética afim de selecionar cruzamentos que produzam aves superiores e que atendam as crescentes demandas do mercado consumidor. Tais ações resultaram no desenvolvimento das mais variadas linhagens de frango de corte que apresentam diferentes performances e rendimentos de carcaça (STRINGHINI et al. 2003). Entretanto, um ponto comum a maioria das linhagens comerciais é o efeito do sexo sobre diversas características produtivas, com machos frequentemente apresentando maior ganho de peso e peso ao abate (Tab. 1), além de melhor conversão alimentar e rendimento de carcaça (STRINGHINI et al. 2003; SHIM et al., 2012; API 2014). Algumas destas diferenças entre sexos são frequentemente exploradas pela avicultura, com machos sendo muitas vezes encaminhados para a indústria de cortes e processados, enquanto as fêmeas (abatidas mais precocemente) são conduzidas para o mercado de frango inteiro (BEG et al., 2016).

Paralelamente, cada sexo possui necessidades nutricionais e ambientais diferentes, fatores que influenciam na uniformidade dos animais e custos de produção quando os lotes são mantidos mistos ou separados por sexo (ALBUQUERQUE et al., 2006). Por exemplo, fêmeas podem ser criadas em maior densidade por metro quadrado, são menos exigentes em nutrientes (tendo um custo de alimentação mais baixo) e completam seu desenvolvimento em um tempo menor (podendo ser abatidas antes dos machos) (BUTERI, 2003; RONDELLI et al., 2003). Juntas, essas informações ressaltam os benefícios infraestruturais e econômicos da criação de lotes sexados, ao mesmo tempo que esclarecem porque a sexagem foi integrada a rotina de praticamente todos os incubatórios industriais no Brasil.

Por outro lado, a separação dos sexos em linhagens pesadas também ocasiona desdobramentos logísticos e financeiros que levam cada vez mais empresas brasileiras a considerar a criação de lotes mistos em seus plantéis (AVISITE, 2010). Isto porque o sistema de lotes separados acarreta em custos adicionais que vão desde da aquisição equipamentos e mão-de-obra nos incubatórios, à alimentação diferencial nas granjas e regulagens específicas

das máquinas em abatedouros. Esta questão evidencia as possíveis vantagens que a uniformização de performance entre machos e fêmeas oferecerem para a avicultura industrial. Porém, os custos, o conflito ético e a repercussão pública que tratamentos hormonais visando a masculinização de fêmeas trariam a cadeia avícola excederiam quaisquer ganhos obtidos com essa ferramenta (SCHEUERMANN et al., 2012). Além disso, dados prévios contestam a crença geral de que o uso de hormônios exógenos (sejam eles esteróides, hormônio de crescimento ou hormônios tireoideanos) promovam reais incrementos em parâmetros produtivos como ganho de peso e/ou conversão alimentar (SCHEUERMANN et al., 2012). Neste sentido, um provável caminho para atenuar o impacto do sexo sobre características zootécnicas é induzir fenótipos masculinos em fêmeas genéticas pela manipulação do processo de diferenciação sexual. Este processo poderia atenuar a diferença de ganho peso e conversão alimentar entre machos e fêmeas. Caso as fêmeas obtivessem o mesmo peso e conversão alimentar que os machos isto resultaria em um incremento de R$ 3 bilhões para o setor avícola.

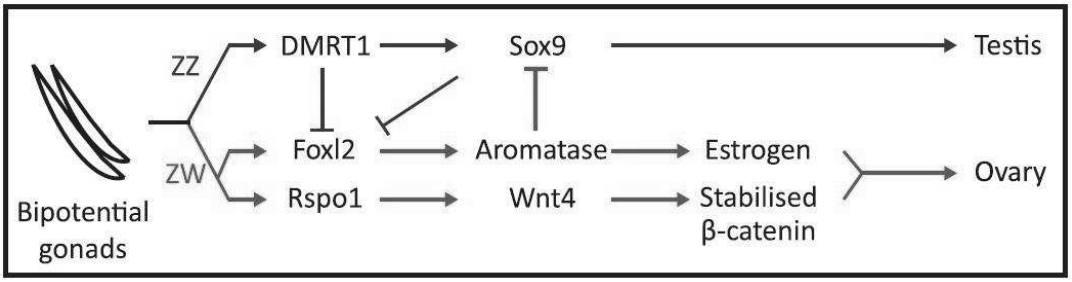
Tabela 1 – Peso corporal para idade (PC), ganho médio de peso (GMP) e conversão alimentar acumulada (CAA) de dois genótipos comerciais de frangos de corte (Cobb 500 e Ross 308), machos e fêmeas no período de 1 a 42 dias de idade.

Linhagem	Cobb 500*						Ross 308*					
Sexo	Machos			Fêmeas			Machos			Fêmeas		
Idade	PC (g)	GMP (g)	CAA (g/g)	PC (g)	GMP (g)	CAA (g/g)	PC (g)	GMP (g)	CAA (g/g)	PC (g)	GMP (g)	CAA (g/g)
0	41	—	—	41	—	—	42	—	—	42	—	—
7	170	24,3	0,836	158	22,6	0,876	186	29	0,871	185	28	0,915
14	449	32,1	1047	411	29,4	1,071	481	53	1,132	466	49	1,140
21	885	42,1	1243	801	38,1	1,280	945	76	1,289	886	67	1,293
28	1478	52,8	1417	1316	47,0	1,475	1553	94	1,429	1406	79	1,440
35	2155	61,6	1569	1879	53,7	1,653	2250	103	1,546	1977	83	1,587
42	2896	67,6	1700	2412	57,4	1,820	2979	104	1,703	2557	82	1,734

*Informações obtidas a partir dos manuais de performance oferecidas pelas empresas Cobb e Aviagen.

Após a determinação genética do sexo, dada pelos cromossomos Z e W, a diferenciação gonadal nas aves é controlada pela expressão de certos genes (DMRT1, Foxl2, Rspo1, Sox9, etc.), que juntos regulam a atividade do hormônio anti-Mülleriano (AMH) e da aromatase P450 (Fig. 1) (SMITH, 2007; Chue; SMITH, 2011). Em embriões femininos (genótipo ZW) essa modulação genética culmina na ativação da aromatase P450, a qual inibe a expressão do fator de transcrição masculino Sox9 e converte andrógenos em estrógenos, levando a transformação das gônadas indiferenciadas em ovários e, por conseguinte, a expressão de características sexuais femininas (SMITH, 2007; CHUE; SMITH, 2011).

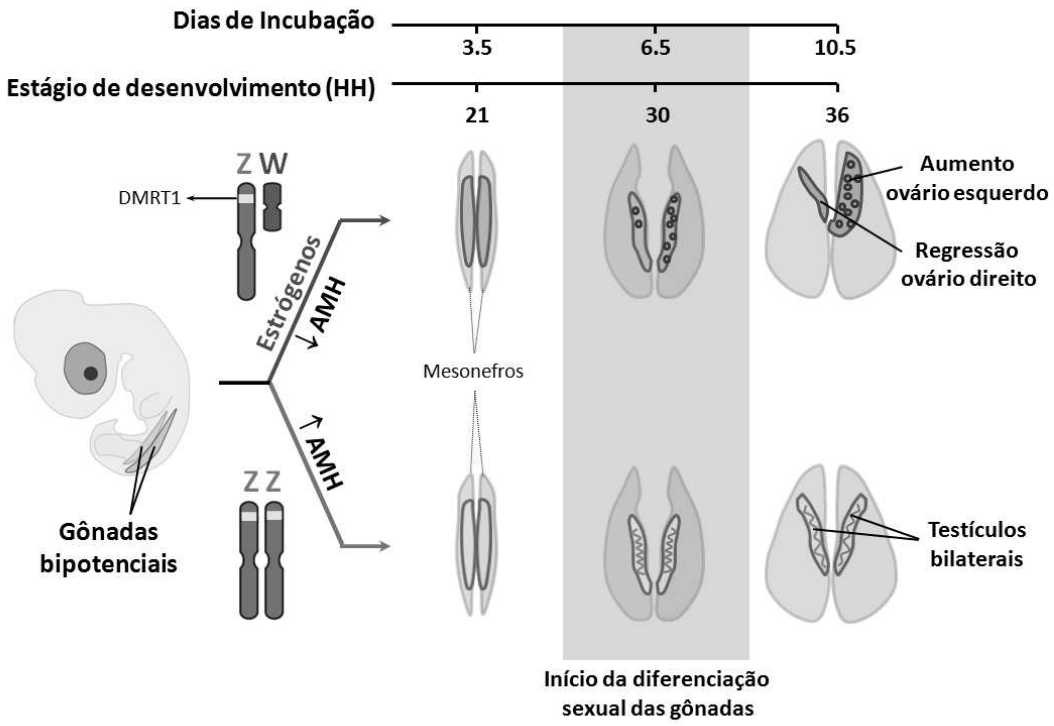
Figura 1 – Modelo esquemático do processo de diferenciação sexual em aves.



Adaptado de Chue; Smith (2011)

Segundo Nomura et al. (1999) a janela de diferenciação sexual em aves se inicia no terceiro dia de desenvolvimento embrionário sendo completada no décimo dia. Baseado no sexo genotípico, os machos apresentarão testículos bilaterais enquanto as fêmeas possuem apenas ovário e oviduto esquerdo desenvolvidos, já o direito sofre um processo de regressão culminando com sua atrofia (Fig. 2).

Figura 2 – Modelo esquemático da janela de diferenciação sexual gonadal em embriões de galinha.



Adaptado de Pereira (2014)

Com base nestes conhecimentos, diversos estudos confirmaram ser possível induzir um fenótipo masculino em fêmeas geneticamente comprovadas via aplicação de fármacos que inibem ou inativem a aromatase P450 durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (RASHEDI et al., 1983; ELBRECHT et al., 1992; ABINAWANTO et al., 1998; VAILLANT et al., 2001; VAILLANT et al., 2003). Entretanto, até o momento, grande parte dos protocolos testados utilizaram apenas um princípio ativo (fadrozole) e demonstraram uma elevada diversidade nos graus de reversão sexual, variando da manutenção do ovário esquerdo até a formação de dois testículos produtores de espermatozoides (ABINAWANTO et al., 1998; BURKE; HENRY, 1999; VALLIANT et al., 2001; VAILLANT et al., 2003; YANG et al., 2013).

A enzima P450 aromatase é responsável pela conversão de androtestosterona e testosterona em estrógeno, essencial na diferenciação sexual das fêmeas em aves (CHUE; SMITH, 2011). Os inibidores de aromatase (IA) são definidos como bloqueadores da enzima aromatase P450, e este

bloqueio pode ser classificado como reversível ou irreversível (CHEUNG et al. 2001). As drogas categorizadas quimicamente como inibidores propriamente ditos são não-esteróides ligam-se à aromatase P450 de modo reversível, ao passo que os fármacos inativadores são esteróides que se ligam irreversivelmente a mesma enzima. Os inativadores unem-se ao sítio ativo da aromatase resultando em uma hidroxilação, a qual origina uma ligação covalente permanente e irreversível. Já os inibidores se prendem de maneira reversível à subunidade citocromo P450 da enzima, através da ligação do átomo de ferro do grupo heme com o anel azólico dos IAs (BUZDAR, et al. 2002; BUZDAR, 2005).

Os IAs foram usados primeiramente na década de 70 no tratamento de cânceres de mama positivos para receptores de estrógeno. Os primeiros princípios a serem utilizados foram classificados cronologicamente como inibidores aromatase de primeira geração, como por exemplo a aminoglutetimida (BUZDAR, et al. 2002). O fadrozole foi classificado como inibidor de segunda geração, enquanto os fármacos mais recentes são denominados inibidores de terceira geração. O exemestano também é classificado como de terceira geração, no entanto é um inativador, portanto esteroidal (BUZDAR; 2005).

Estudos prévios demonstram que a reversão sexual de grande parte de fêmeas geneticamente sexadas é obtida com a aplicação do fadrozole entre os dias 0 e 3 de incubação em doses que variam de 0,1 a 1,3mg por ovo (RASHEDI et al., 1983; ELBRECHT et al., 1992; ABINAWANTO et al., 1998; BURKE; HENRY, 1999; VAILLANT et al., 2001; VAILLANT et al., 2003; YANG et al. 2013). No entanto, todos esses trabalhos mensuraram o sucesso do fadrozole como agente reversor levando apenas em conta a taxa e o grau de masculinização das fêmeas, sem considerar índices importantes na rotina dos incubatórios industriais, como mortalidade embrionária e eclodibilidade. Esse viés impossibilita a projeção dessa metodologia em condições de campo, inviabilizando quaisquer conclusões sobre sua aplicabilidade futura no setor avícola.

Ademais, poucos trabalhos avaliaram detalhadamente o impacto da masculinização sobre aspectos produtivos, e aqueles que o fizeram apresentam dados extremamente variáveis devido às diferenças no

delineamento experimental (p.e. linhagens de aves, doses, dia de aplicação, etc.), tornando difíceis quaisquer conclusões sobre a aplicabilidade da reversão no contexto produtivo (BURKE; HENRY, 1999; YANG et al. 2013; MOHAMMADREZAEI, et al., 2014). Por exemplo, Burke e Henry (1999) observaram que fêmeas oriundas de ovos tratados com fadrozole mantiveram desempenhos inferiores aos machos, enquanto que Mohammadrezaei et al. (2014) não apenas registraram uma uniformidade de peso entre machos e fêmeas como também comprovaram um sinergismo na aplicação *in ovo* do fadrozole com IGF-I.

É possível que essas discrepâncias tenham ocorrido devido ao dia de inoculação do fadrozole (0 e 3 dias, respectivamente), uma vez que o tempo de ação desse inibidor é extremamente curto. Paralelamente, Yang et al. (2013) relatam que diferentes concentrações de fadrozole não afetaram o crescimento pós-natal das fêmeas revertidas, mas é importante ressaltar esses autores utilizaram uma linhagem de postura, ou seja aves que não são possuem grande potencial para ganho de peso. Além disso, como mencionado anteriormente, Burke e Henry (1999) e Yang et al. (2013) não fazem menção à influência do fadrozole sobre a eclodibilidade dos ovos. Juntos, esses fatos evidenciam a fragilidade dos dados existentes e reforçam a necessidade de pesquisas adicionais compreendendo aspectos zootécnicos, inclusive com o emprego de inibidores de aromatase mais avançados. Dewil et al. (1998) descrevem que a aplicação de um inibidor de terceira geração no dia 6 de incubação reduziu significativamente a gordura abdominal das fêmeas masculinizadas. Porém, novamente, esses autores falham em relatar os efeitos desse fármaco sobre índices importantes como mortalidade embrionária, eclodibilidade e conversão alimentar.

Essa baixa regularidade de resultados revela a necessidade de pesquisas que aprimorem vários fatores relacionados a metodologia da reversão sexual tais como princípio ativo, dose, idade embrionária para o tratamento, método de aplicação, entre outros. Além disso, o número reduzido e a precariedade dos trabalhos contemplando as repercussões zootécnicas da reversão sexual em frangas e peruas (BURKE; HENRY, 1999; YANG et al. 2013), torna esse campo de investigação extremamente relevante no que tange o impacto dessa abordagem sobre parâmetros produtivos das fêmeas

masculinizadas (p.e. eclodibilidade, peso ao nascer, ganho de peso, conversão alimentar, desempenho de carcaça, etc.). Assim, este projeto propõe ampliar nosso conhecimento sobre o uso de inibidores de aromatase de terceira geração na masculinização de frangas de corte e, por conseguinte, avaliar os efeitos desses tratamentos *in ovo* sobre os mais variados índices produtivos.

3. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a aplicação *in ovo* de inibidores de aromatase de terceira geração (ao invés do fadrozole) promova taxas superiores de reversão sexual em embriões de galinha, além de resultar em frangas de corte com índices zootécnicos similares àqueles apresentados pelos machos. Isto porque, IAs de terceira geração, são considerados fármacos mais potentes e seletivos que o fadrozole (REQUENA et al., 2008), fato que teoricamente propicia uma inibição mais acentuada e persistente da aromatase P450 e, por conseguinte, níveis estrogênicos mais baixos e durante períodos mais prolongados do desenvolvimento embrionário.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a aplicação de inibidores de aromatase (IA) de terceira geração melhora a taxa e o grau de reversão sexual de frangas de corte quando comparados ao fadrozole. Paralelamente, temos como objetivos específicos:

- avaliar o local de aplicação (via lateral, média e superficial) da injeção no ovo
- avaliar o momento de incubação (0 e 72 horas) adequado para a aplicação dos fármacos
- avaliar a eficácia dos inibidores de aromatase de terceira geração na masculinização das fêmeas e momento de aplicação destes fármacos.
- avaliar três diferentes doses (0.025, 0.05 e 0.1mg/ovo) dos inibidores de aromatase de terceira geração na masculinização das fêmeas
- avaliar a influência de dois volumes injetados (50 e 100µl) nos ovos na eclodibilidade
- avaliar a influência de dois métodos de selagem (parafina e cola) dos ovos na eclodibilidade
- avaliar ganho de peso, conversão alimentar e rendimento de carcaça de aves tratadas com inibidor de aromatase.

5. MATERIAL E MÉTODOS

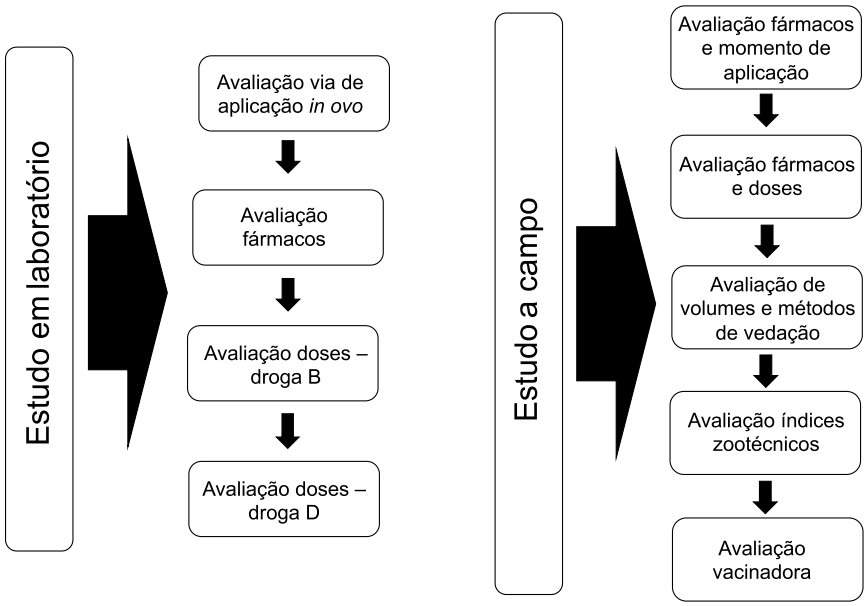
5.1. Delineamento Experimental

O projeto foi dividido em duas etapas distintas denominadas de estudo em laboratório e a campo. Todos os protocolos descritos neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ – USP. A figura 3 sumariza os experimentos realizados em ambos os estudos.

O primeiro estudo teve como escopo a determinação do local e dose mais adequados para aplicação *in ovo* dos diferentes inibidores de aromatase para reversão sexual das fêmeas genéticas. Esse primeiro ensaio foi subdivido em diversos experimentos (Tab. 2) que foram realizados no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VRA/FMVZ/USP).

O estudo a campo foi inteiramente realizado em um incubatório industrial com objetivo de maximizar o número de ovos testados e avaliar a aplicabilidade do projeto em escala industrial. Após o nascimento foi avaliado, em todos os grupos testados, a porcentagem de eclodibilidade, fertilidade, mortalidade embrionária, peso ao nascer, sexagem morfológica (fenotípica) através de sexagem cloacal e também através da necropsia. Para controle da influência dos IAs, do processo de injeção e selagem, na eclosão, foram coletados dados de eclodibilidade dos ovos que estavam na mesma incubadora que os tratados.

Figura 3 – Esquema do delineamento experimental do estudo em laboratório e a campo.



5.2. Estudo em laboratório

5.1.2. Ovos embrionados

Os ovos embrionados utilizados no estudo no laboratório foram produzidos por galinhas da linhagem Lohmann LSL inseminadas artificialmente (BURROWS; QUINN, 1937) mantidas no Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP. Neste primeiro estudo foram utilizadas apenas linhagens leves para diminuir custos de manutenção dos animais, e porque o objetivo era otimizar local e dose de dos IAs de terceira geração (ou seja, não houve interesse em avaliar índices produtivos) .

Tabela 2 – Quadro resumo de todos os experimentos realizados durante o estudo em laboratório.

Experimento	Objetivo	Fármaco	Número ovos	Parâmetros analisados	Página Resultados
1	Avaliação local de aplicação[1]	Droga B NaCl	70	Eclobibilidade Sexagem morfológica	36
2	Avaliação fármacos	Fadrozole Droga B Droga C Droga D NaCl	105	Fertilidade Eclodibilidade, Sexagem morfológica	37
3	Avaliação doses[3]	Fadrozole Droga B NaCl	105	Fertilidade Eclodibilidade, Sexagem morfológica	38
4	Avaliação doses[4]	Fadrozole Droga D NaCl	104	Fertilidade Eclodibilidade, Sexagem morfológica	39

[1]Sítio de aplicação dos IAs e NaCl no ovo.
[2]Aplicação dos IAs utilizando protocolo padrão descrito em literatura (0,1mg fármaco/ovo injetado com 72 horas de incubação) (Abinawanto et al., 1998; Vaillant et al., 2001; Vaillant et al., 2003).
[3]Análise realizada apenas com as drogas B e D nas concentrações de 0.02, 0.04 e 0.1mg/ovo (uma vez que o fadrozole foi apenas utilizado nesse projeto como fármaco de controle dado seu amplo emprego em literatura).

5.1.3. Preparo das soluções

À exceção do inibidor de aromatase fadrozole, não foram revelados os fármacos utilizados neste projeto pois solicitaremos a análise para pedido de patente através da Agência USP de Inovação. Todos os princípios ativos empregados nesse projeto (fadrozole, droga B, C e D) foram diluídos em solução fisiológica (NaCl 0.9%), e todas as soluções foram agitadas em vortex segundos antes de cada aplicação. Nos experimentos 1 e 2, todas as drogas foram diluídas até a concentração de 1mg/mL (resultando em 0,1mg/100μL/ovo). Posteriormente, no experimento 3 e 4, os fármacos B e D foram também diluídos em três concentrações: 0.1 mg/mL/ovo, 0.04mg/mL/ovo e 0.02 mg/mL/ovo com o objetivo de testar sua eficácia em doses menores.

5.1.4. Injeções *in ovo* dos IAs e incubação dos ovos em condições experimentais

No experimento 1, cujo objetivo foi determinar o melhor local de aplicação *in ovo* dos IAs, tanto o veículo (NaCl) quanto a droga B foram injetados em três sítios diferentes: (1) via lateral (agulha introduzida lateralmente a câmara de ar); (2) via média (agulha introduzida no albume logo abaixo da câmara de ar); e (3) via superficial (agulha introduzida no interior da câmara de ar entre as membranas interna e externa da casca). Com base nos resultados do experimento 1, todas as injeções *in ovo* subsequentes foram realizadas pela via superficial, e tiveram como base o protocolo descrito por Mohammadrezaei et al. (2013). Após 72 horas da incubação, todos os ovos foram posicionados verticalmente e um pequenos orifícios foram feitos na extremidade larga dos ovos (agulha 18G 1 ½). Em seguida, um total de 100µL da solução contendo IAs foi injetado entre as membranas interna e externa da casca na altura da câmara de ar (concentrações/ovo variáveis em função do experimento). Os orifícios foram posteriormente selados com parafina, e os ovos foram incubados verticalmente (Chocadeiras Brinsea Ova-Easy Advance 190 EX, Inglaterra) a 37.8ºC, 50-60% de umidade relativa e viragem de 90º (uma vez por hora) até o 18º dia de incubação. Os ovos foram então transferidos para um nascedouro e mantidos sob as mesmas condições de temperatura e umidade até o momento da eclosão. Para controle tanto do processo de incubação quanto do processo de injeção, todos os lotes de ovos incubados também contaram com um grupo sem nenhuma injeção (grupo controle) e um grupo injetado apenas com o veículo (grupo NaCl).

5.1.5. Avaliação da fertilidade, eclodibilidade e embriodiagnóstico.

Após 21 dias de incubação eram avaliadas as taxas de fertilidade e eclodibilidade (ovos eclodidos/ovos férteis). Após este período, os ovos não eclodidos, eram quebrados para realização do embriodiagnóstico visando estabelecer se eram férteis ou em qual momento da incubação ocorreu a morte embrionária. Deste modo, morte embrionária entre 1 e 7 dias foi considerada como mortalidade inicial, de 8 a 14 mortalidade média e de 15 a 21 dias final

(Aviagen, 2012)

5.1.6. Sexagem morfológica

Todos os pintinhos recém-eclodidos foram eutanasiados através da técnica de deslocamento cervical. Durante a necropsia suas gônadas foram classificadas macroscopicamente nas seguintes categorias: ovário, *ovotestis* ou testículo (Fig. 15).

5.2. Estudo a campo

A tabela 3 sumariza os experimentos realizados no estudo a campo.

Tabela 3 - Quadro resumo de todos os experimentos realizados durante o estudo a campo.

Experimento	Objetivo	Fármaco	Momento de incubação[1]	Número ovos	Parâmetros analisados	Página resultados
5	Avaliação fármacos e momento de aplicação [1]	Fadrozole Droga B Droga D NaCl	0 e 72 horas	1790	Fertilidade Eclodibilidade, Sexagem morfológica Peso	40
6	Avaliação de fármacos e doses[2]	Fadrozole Droga B NaCl	0 hora	1512	Fertilidade Eclodibilidade, Sexagem morfológica Peso	42
7	Avaliação de volume e método de vedação[3]	Fadrozole Droga B NaCl	0 hora	2184	Fertilidade Eclodibilidade, Sexagem morfológica Peso	44
8	Avaliação de ganho de peso e conversão alimentar[4]	Droga B Controle	0 hora	1596	Fertilidade Eclodibilidade Ganho de peso Conversão alimentar Rendimento de carcaça	46
9	Avaliação vacinadora[5]	NaCl	72 horas	150	Fertilidade Eclodibilidade	49

[1]Horas que os ovos foram incubados previamente a aplicação de fadrozole, droga B e D.
[2]Avaliação do efeito de fadrozole (0.1mg) e droga B em diferentes concentrações (0.1mg, 0.05mg e 0.025mg) administrados sem incubação prévia.
[3]Avaliação do volume de veículo (50 e 100µl) administrados nos ovos, sem incubação prévia, e dos métodos de selagem com parafina e cola.
[4]Avaliação dos índices zootécnicos das aves revertidas e dos grupos controle criadas em aviário experimental.
[5]Análise realizada dentro de um incubatório industrial empregando uma vacinadora de ovos (simulando condições de campo).

5.2.2. Ovos embrionados

Os ovos utilizados, em todos os experimentos que compõem o estudo a campo (tabela 3), eram oriundos de granjas de avós pesadas da linhagem Ross308ap (Aviagen LTDA). Em cada experimento, que compõem o estudo a campo[a] campo, também foi analisada uma amostragem de 672 ovos que não foram tratados. Estes ovos eram oriundos do mesmo lote dos grupos tratados e foram incubados na mesma incubadora, este grupo foi denominado controle da incubadora (CON).

5.2.3. Sexagem cloacal e morfológica

A sexagem cloacal foi realizada nas aves com 1 dia de idade, por técnicos do incubatório, contudo por ser um procedimento protegido por segredo industrial o seu protocolo não foi fornecido. Já a sexagem morfológica foi realizada como no estudo em laboratório, e aconteceu logo após a sexagem cloacal (Anexo A). Apenas no experimento 4 a sexagem morfológica foi realizada com 42 dias (Anexo B), já que as aves foram criadas para avalição dos índices zootécnicos.

5.2.4. Avaliação da fertilidade, eclodibilidade e embriodiagnóstico

Em todos os experimentos, do estudo a campo, após 21 dias de incubação eram avaliadas as taxas de fertilidade e eclodibilidade (ovos férteis/ovos totais incubados). Os ovos não eclodidos eram quebrados para realização do embriodiagnóstico visando estabelecer se eram férteis e em qual momento da incubação ocorreu a morte embrionária. Os padrões de avaliação da mortalidade embrionária foi o mesmo utilizado no estudo laboratório.

5.2.5. Injeções *in ovo* dos IAs em 0H e 72H e incubação dos ovos em incubatórios industriais (experimento 5)

O escopo deste experimento foi avaliar o momento mais adequado, (0H – sem incubação prévia e 72H – com 72 horas de incubação), para a administração dos IAs e também determinar a eficiência quanto à reversão

sexual e influência na eclodibilidadede, de três IAs. Os ovos utilizados em 0H e 72H eram provenientes das mesmas granjas e lotes, e foram incubados juntos na mesma incubadora. Contudo, os ovos do 72H foram retirados da incubadora para a aplicação dos fármacos e novamente incubados.

Nos ovos foram administrados os seguintes tratamentos: fadrozole (n = 115), Droga B (n = 336), Droga D (n =336), além do veículo (NaCl, n = 336) através de método descrito anteriormente no estudo em laboratório, no 0H e 72H de incubação. Os fármacos (fadrozole, Droga B e D) foram administrados na dose 0.1mg/ovo e volume de 100µl/ovo. Após as inoculações, todos os orifícios feitos nos ovos foram selados com parafina e os ovos foram incubados seguindo o protocolo padrão da empresa. Para reduzir possíveis variações na eclodibilidade, decorrentes das condições de incubação, os ovos provenientes dos quatros grupos foram distribuídos igualmente nas mesmas bandejas. Para controle das condições de incubação, os dados referentes a fertilidade e eclodibilidade de todo o lote de ovos da incubadora foram registrados.

5.2.6. Injeções *in ovo* da Droga B em diferentes doses em 0H e incubação dos ovos em incubatório industrial (experimento 6)

Com base nos resultados do experimento anterior foi escolhido o 0H como momento de aplicação e foi testada a Droga B em três concentrações (0.1mg, 0.05mg e 0.025mg por ovo), além do fadrozole (0.1mg/ovo) com 168 ovos por grupo. Os procedimentos de aplicação dos fármacos, selagem dos ovos e incubação foram realizados da mesma forma que no experimento anterior, assim como as avaliações após o nascimento das aves.

5.2.7. Injeções *in ovo* da Droga B em diferentes volumes com selagens distintas e incubação dos ovos em incubatório industrial (experimento 7)

Após a definição da dose da Droga B (0.025mg/ovo) a ser utilizada, foi testado dois métodos de selagem (parafina ou cola) dos ovos após a aplicação da injeção. Além disso, também foi avaliado o volume de veículo administrado (50µl ou 100µl) por ovo. Desta forma, os grupos foram divididos da seguinte maneira: Droga B administrado em 50µl e selagem com parafina, Droga B administrado em 100µl e selagem com cola, Droga B administrado em 100µl e

selagem com parafina; Droga B administrado em 100μl e selagem com cola; Droga B administrado em 100μl selagem com parafina; NaCl administrado em 50ul e selagem com parafina; NaCl administrado em 50μl e selagem com cola; apenas selagem com cola e orifício do ovo sem selagem. Foram utilizados 168 ovos por grupo.

5.2.8. Avaliação dos índices zootécnicos de aves revertidas com a Droga B em aviário experimental (experimento 8)

A droga B foi administrada em 672 ovos, no volume de 100μl por ovo e selagem por cola. Após os 21 dias de incubação foi realizada a sexagem cloacal das aves para confirmar que todos eram machos fenotípicos. Para análise de ganho de peso e conversão alimentar foram utilizados quatro grupos: Grupo machos genéticos (n=352), grupo fêmeas genéticas (n=352), grupo misto composto por machos genéticos (n=176) e fêmeas genéticas (n=176) e grupo tratado, composto das aves com fenótipo macho anteriormente sexadas pela cloaca (n= 352). Os pintinhos utilizados nos quatro grupos foram incubados juntos na mesma incubadora.

As aves foram alojadas em um aviário experimental em condições similares à criação e manejo à campo. Cada grupo era composto por 8 repetições sendo que cada repetição foi alojada em um *box*, contendo 44 aves, com fornecimento de água e ração *ad libitum.* As aves foram pesadas no aviário com 1, 7, 14, 28, 35 35 e 42 dias assim como ração fornecida para estas, com o intuito de calcularmos a conversão alimentar de cada grupo, já que este parâmetro é obtido através da divisão da quantidade ração consumida pelo peso vivo da ave. Aos 43 dias de idade uma amostragem de 48 aves por grupo foi transferida para um abatedouro comercial e antes da eutanásia todas as aves foram pesadas individualmente para mensuração do peso vivo. Após a eutanásia as aves passaram pelos processos de depenagem e evisceração e foram novamente pesadas individualmente para avaliação do peso da carcaça, que consiste no peso da ave sem penas e vísceras. Cada carcaça foi subdividida em asa, peito, perna e pé e cada corte foi pesado individualmente.

5.2.9. Injeções *in ovo* administrados por vacinadora incubação dos ovos em incubatório industrial (experimento 9)

Para o teste de automatização da aplicação do IA em larga escala foi administrado NaCl com corante em 150 ovos empregando um equipamento de vacinação *in ovo* (*OvoJector*, Merial) (n=150). O corante foi utlizado com objetivo de determinar em qual área do ovo o NaCl foi injetado. Não houve nenhuma modificação, na vacinadora, na profundidade da entrada da agulha nos ovos.

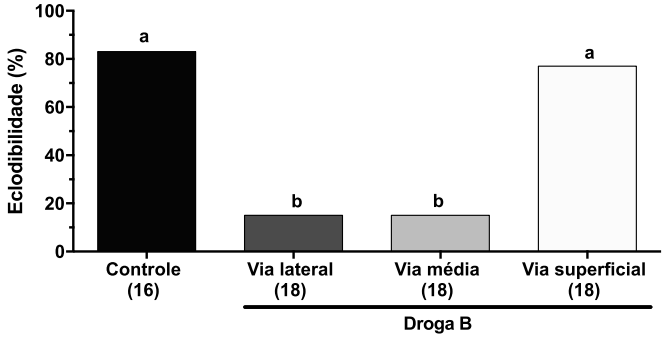
5.2.10. Análise estatística

Os dados referentes as taxas de reversão sexual, fertilidade e eclodibilidade nas diferentes concentrações de cada um dos inibidores de aromatase foram avaliados através do teste Qui-quadrado com o nível de significância para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%. Já os dados relativos ao peso ao nascer, ganho de peso, conversão alimentar, peso ao abate, peso da carcaça e peso dos cortes (asa, peito, perna e pé) nos diferentes tratamentos foram analisados usando ANOVA e teste de Tukey. As análises foram conduzidas utilizando-se o procedimento GLM do SAS (SAS Institute, Cary). O nível de significância para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%.

6. RESULTADOS

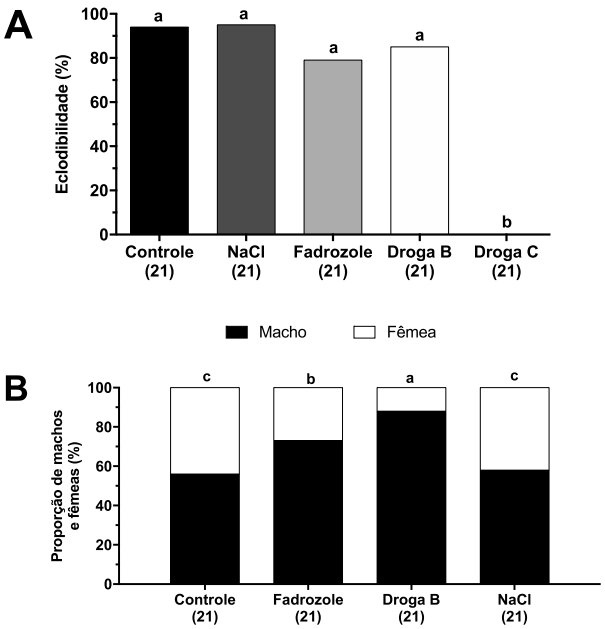
Todos os resultados que compõem o estudo em laboratório tinham o escopo de determinar o local, dose e momento mais adequados para aplicação *in ovo* dos diferentes inibidores de aromatase para a reversão sexual de fêmeas genéticas. Neste sentido, o teste referente a avaliação dos diferentes locais de aplicação *in ovo* (Experimento 1) demonstrou que a via superficial resultou em uma taxa superior de eclodibilidade em relação as demais vias de inoculação (mesmo com a adição de um princípio ativo), não diferindo estatisticamente do grupo controle (ou seja, ovos intactos) (Fig. 4, $p < 0,05$). Consequentemente, a via superficial foi empregada em todos os experimentos subsequentes.

Figura 4 – Taxas de eclodibilidade das injeções *in ovo* da Droga B efetuadas pelas vias lateral, média e superficial (Experimento 1/n= 70 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($P < 0.05$).



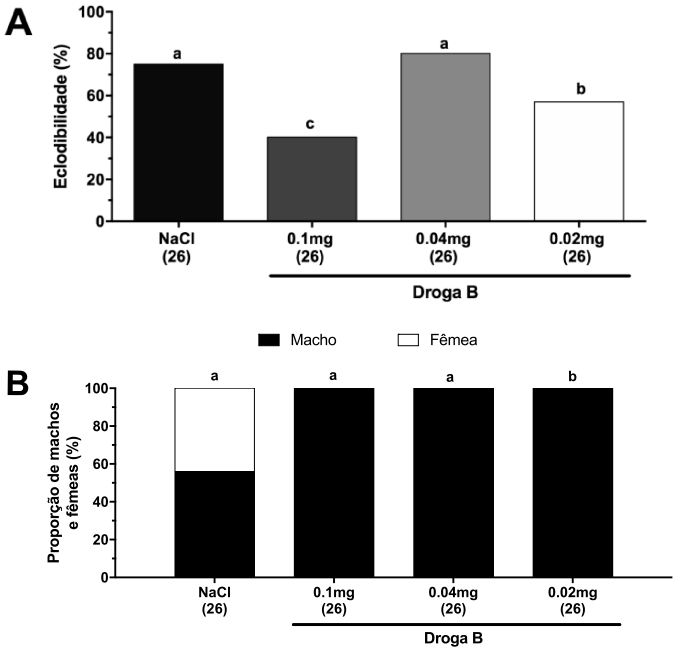
A análise inicial de todos os fármacos de interesse utilizou como base a dose de fadrozole descrita em literatura (0.1mg/100μl/ovo), e os resultados deste teste tanto sobre a eclodibilidade quanto na proporção de machos e fêmeas encontram-se detalhados na Figura 5. A fertilidade foi de 98, 100, 83, 85 e 90 para o controle, NaCl, fadrozole, droga B e droga C. À exceção da droga C, que causou a mortalidade em todos os embriões (por volta do 10° dia de desenvolvimento embrionário), os inibidores fadrozole e droga B não demonstraram diferenças na eclodibilidade. Já a droga B apresentou porcentagem superior de machos inclusive comparado ao fadrozole. ($P < 0.05$).

Figura 5 – **(A)** Taxas de fertilidade e eclodibilidade e **(B)** porcentagens de machos e fêmeas nascidos após injeções *in ovo* usando um inibidor de aromatase de primeira geração (fadrozole), droga B e droga C (Experimento 2/n = 105 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).



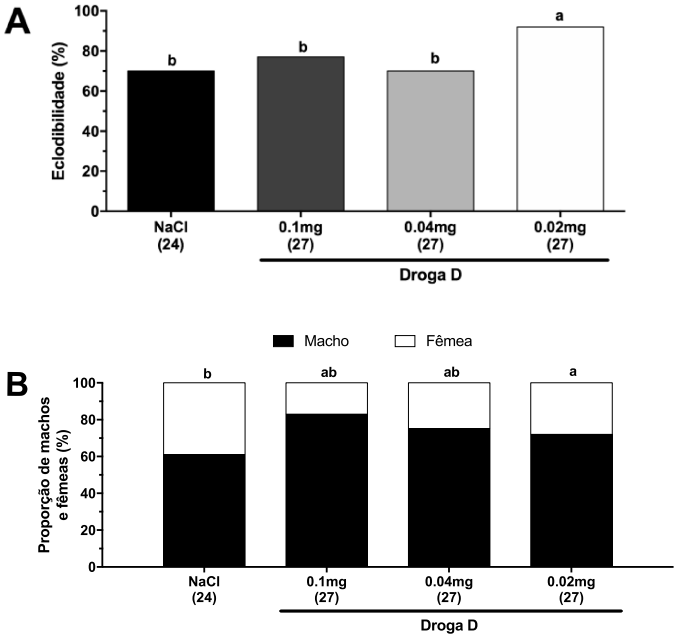
No experimento 3 (estudo em laboratório), durante os testes com as diferentes doses da droga B, observou-se que o percentual de eclodibilidade foi superior na dose de 0.04mg/ovo e NaCl. Porém foi inferior no grupo que recebeu a droga B na concentração de 0.1mg/ovo (inclusive sendo menor que a eclobilibidade obtida com o mesmo fármaco no Experimento 2) (Fig. 6). Por outro lado, mesmo em diferentes concentrações, em todas as aves tratadas com a droga B observou-se, na necropsia, testículos e nenhum *ovotestis* ou ovário. A fertilidade nos grupos droga B 0.1mg, droga B 0.04mg, droga B 0.02mg e NaCl foi de 39, 56, 35 e 81 respectivamente.

Figura 6 – **(A)** Taxas de fertilidade e eclodibilidade e **(B)** porcentagens de machos e fêmeas nascidos após injeções *in ovo* usando o inibidor de aromatase, droga B, nas doses de 0.1mg/ovo, 0.04mg/ovo e 0.02mg/ovo (Experimento 3/n = 104 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (NaCl) (P < 0.05).



Em relação à droga D (experimento 4 em laboratório), as taxas de eclodibilidade não foram afetadas pelas diferentes doses injetadas *in ovo*, visto que seus resultados foram similares àqueles de ovos injetados apenas com o veículo (Fig. 7A). Todavia, em relação à porcentagem de machos, comprovamos que esse inibidor de aromatase se mostrou menos eficiente quando comparado a droga B (Fig. 7B). A fertilidade foi de 90, 90, 83 e 100% para os grupos droga D 0.1mg, droga D 0.04mg, droga D 0.002mg e NaCl respectivamente.

Figura 7 – (A) Taxas de fertilidade e eclodibilidade e **(B)** porcentagens de machos, fêmeas nascidos após injeções *in ovo* usando o inibidor de aromatase droga D nas doses de 0.1mg, 0.04mg e 0.1mg. (Experimento 4/n = 104 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).

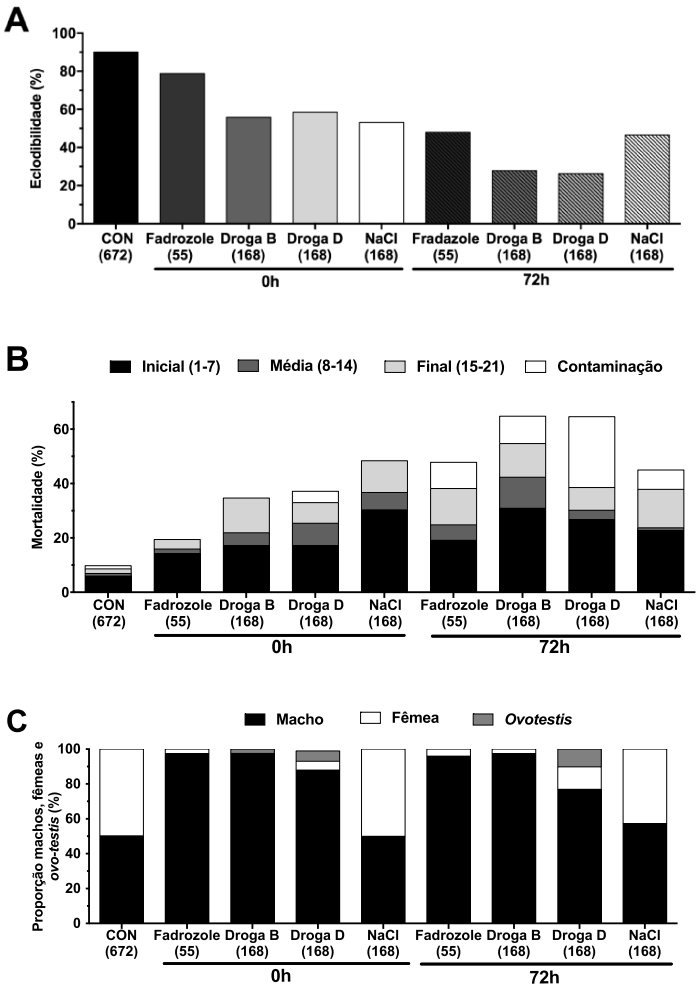


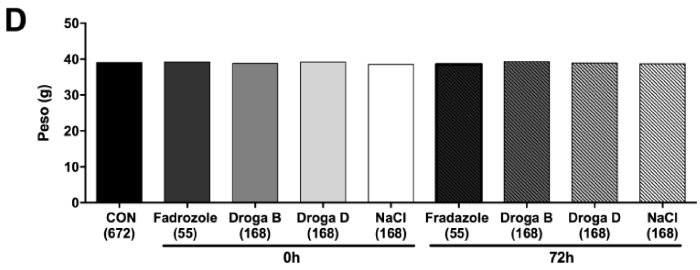
Os resultados obtidos nos experimentos do estudo em laboratório não foram conclusivos devido ao baixo número de ovos testados. Desta forma, no estudo a campo as avaliações foram realizadas em um incubatório industrial o que possibilitou maximizar o número de ovos, além da exposição dos ovos tratados às condições de incubação industrial. Ademais, foram usados ovos provenientes de linhagens pesadas (corte) já que objetivo final era avaliar ganho de peso e conversão alimentar.

Em relação a avaliação do melhor momento para aplicação dos IAs, foi testado em ovos sem incubação prévia (0h) e ovos com 72 horas de incubação (72h). Em todos os grupos testados 0H obteve taxas mais altas de eclobilidade quando comparado com 72h (Fig. 8A). Já a mortalidade embrionária foi maior nos grupos em que o fármaco foi administrado em 72h com exceção do grupo NaCl (Fig. 8B). A mortalidade inicial foi mais alta em 0h que mortalidade média e final e em 72h houve um aumento na incidência de ovos contaminados. Em relação a porcentagem de machos (Fig. 8C), esta foi superior ao controle da incubadora, independente do momento de aplicação da droga. Entretanto a droga D apresentou um número maior de fêmeas e *ovotestis* quando

comparado as outras duas drogas. Já o peso dos pintinhos ao nascer foi similar em todos os grupos tanto em 0h quanto em 72h (8D). Os dados de fertilidade em 0h para fadrozole, droga B, droga D e NaCl foram de 92,8, 91.5, 86.5% e 86.1 respectivamente. Enquanto que em 72h foi de 86.5, 85.7, 90.4 e 85.7% para fadrozole, droga B, droga D e NaCl respectivamente. A fertilidade do controle da incubadora foi de 90%.

Figura 8 – (A) Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagens de machos, fêmeas e *ovotestis* e **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos fadrozole, droga B, droga D e NaCl foram administrados, na dose de 0.1mg/0.1ml/ovo, sem incubação prévia (0h) e com 72 horas de incubação (72h) (Experimento 5/n = 1790 ovos).



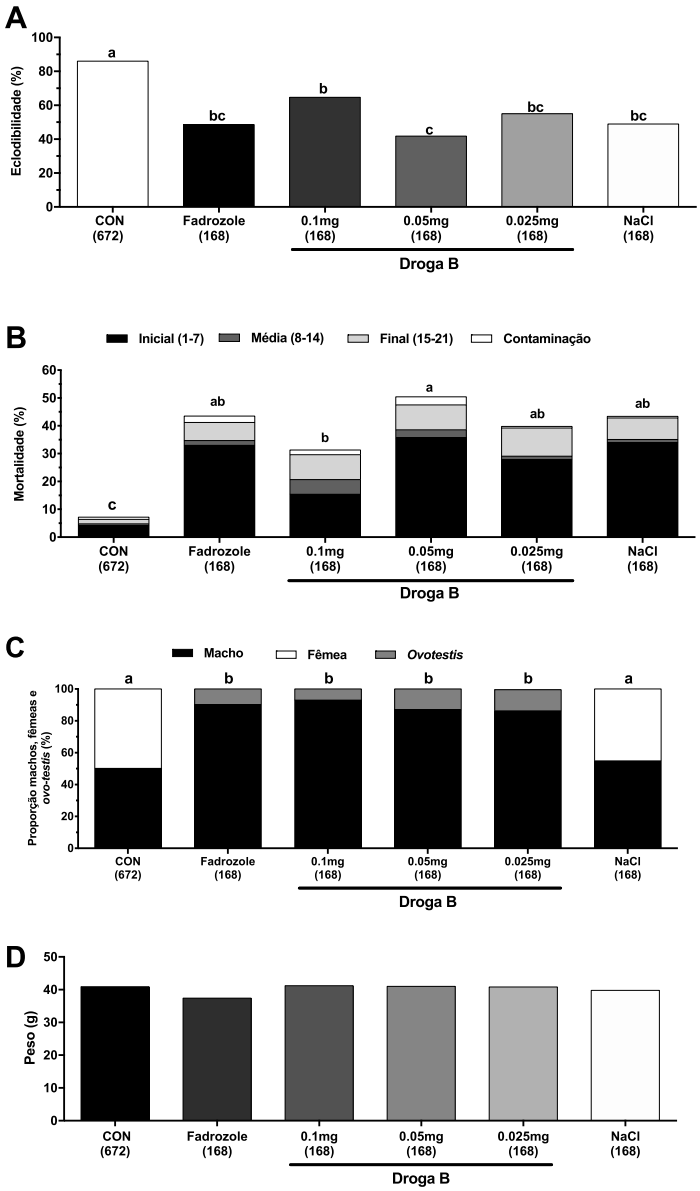


Baseado nos achados do experimento anterior que mostrou que a droga B obteve maior porcentagem de machos quando comparado com a droga D, aquela foi escolhida para os próximos experimentos. Testamos três diferentes dosagens de droga B (0.1, 0.05, 0.025mg/ovo). O fadrozole continuou sendo usado pois é a droga mais utilizada na literatura para reversão de aves. Também foi escolhido 0h devido sua melhor porcentagem de eclodibilidade frente à 72h.

Sendo assim, o quinto experimento (estudo a campo) mensurou o efeito na reversão sexual do fadrozole (0.1mg), e droga B em três concentrações distintas (0.1mg, 0.05mg e 0.025mg). A eclodibilidade do controle incubadora foi superior a todos os outros tratamentos. Já a eclobilidade do grupo da droga B na dose de 0.1mg foi superior ao grupo que recebeu o mesmo na fármaco na dose de 0.05mg (Fig. 9A). Este tratamento (droga B 0.01mg) também obteve uma mortalidade embrionária inferior quando comparada a todos os outros tratamentos com exceção do controle incubadora que, por sua vez, foi inferior a todos os outros grupos (Fig. 9B). A fertilidade foi de 90, 88, 91, 88, 89.9 e 86.7% para controle incubadora, fadrozole, droga B (0.1mg), droga B (0.05mg), droga B (0.025mg) e NaCl respectivamente.

Todos os inibidores de aromatase foram superiores na porcentagem de machos quando comparados aos grupos controle da incubadora e NaCl (Fig. 9C). Entretanto, nas três doses observou-se aves com *ovotestis.* Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso (9D).

Figura 9 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagens de machos, fêmeas e *ovotestis* e **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos controle incubadora fadrozole 0.1mg, droga B 0.1mg, droga B 0.05mg, droga B 0.025mg e NaCl (Experimento 6/n = 1512 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).

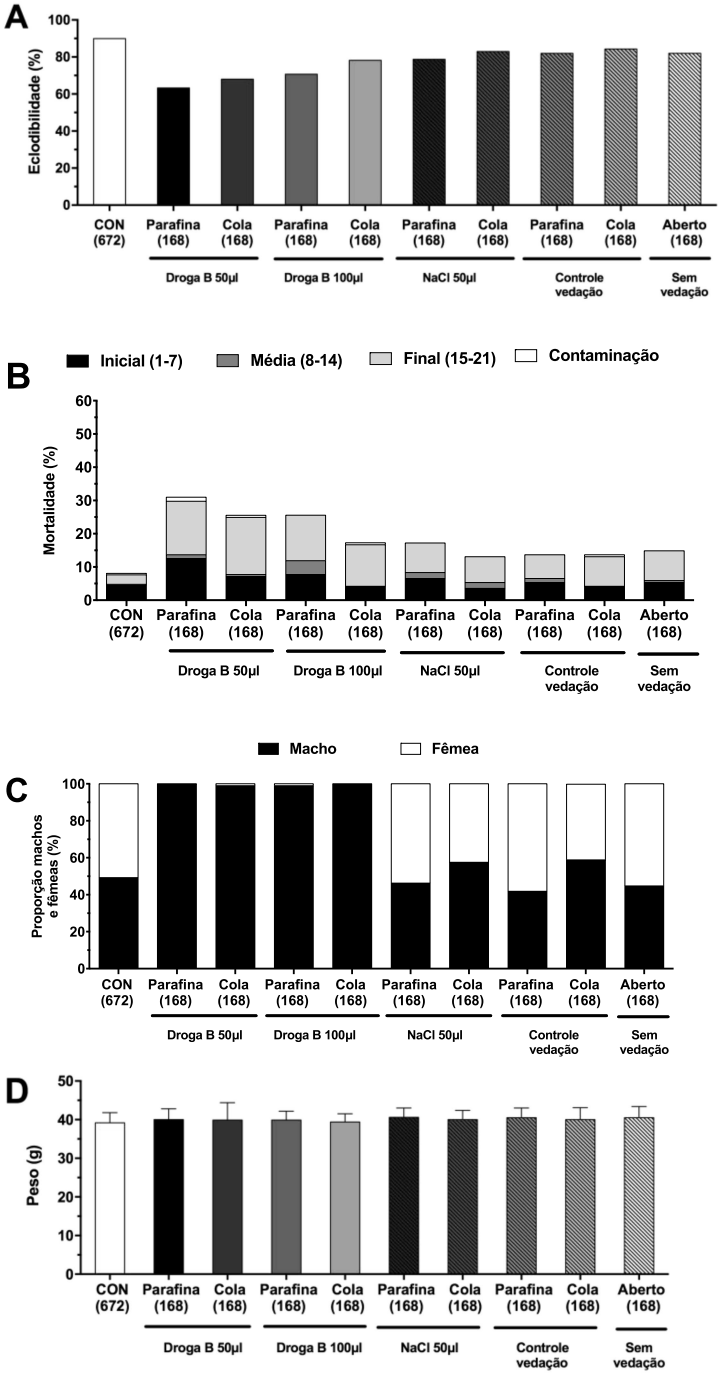


Como o experimento anterior mostrou que a dose da droga B de 0.025mg/ovo foi eficiente, ou seja produziu mais de 90% de machos fenotípicos, esta foi definida como dose padrão para os próximos experimentos. Sendo assim, o sexto experimento (estudo a campo) avaliou o volume de veículo injetado (50μl ou 100μl) nos tratamentos. Além disso, também testamos o tipo de vedação (parafina ou cola) dos orifícios feitos nos

ovos para aplicação dos IAs. A eclodibilidade entre os grupos que receberam a droga B foi maior no tratamento com vedação com cola e no volume 100μl. A taxa de eclodibilidade foi similar entre os grupos que receberam apenas NaCl no volume de 50μl tanto para vedação com cola quanto para parafina. O mesmo resultado ocorreu nos grupos em que foi testado apenas a vedação com cola, parafina e sem vedação (Fig. 10A). A mortalidade embrionária foi maior no grupo droga B 0.025mg no volume de 50μl vedado com cola. Esta taxa foi similar entre os tratamentos que receberam apenas NaCl e também nos que foram apenas vedados e sem vedação (Fig. 10B). A maior eclodibilidade e consequentemente menor mortalidade embrionária foi observada no controle da incubadora.

O número de machos, de todos os grupos que receberam a droga B, foi próxima a 100% (Fig. 10C). Os pesos de nascimento foram similares para todos os grupos (Fig. 10D). A fertilidade observada nos grupos controle incubadora (CON), droga B 0.025mg vedado com parafina no volume de 50μl, droga B 0.025mg vedado com cola no volume de 50μl, droga B 0.025mg vedado com parafina no volume de 100μl, droga B 0.025mg vedado com cola no volume de 100μl, NaCl vedado com parafina no volume de 50μl, NaCl vedado com cola no volume de 50μl, vedado com parafina, vedado com cola, sem vedação foi de 89.9, 83.1, 80, 87.5, 82,1, 81.5, 81.9, 76.2, 86.5 e 83.9% respectivamente.

Figura 10 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagens de machos, fêmeas e *ovotestis* e **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos foram controle incubadora (CON droga B 0.025mg vedado com parafina no volume de 50μl, droga B 0.025mg vedado com cola no volume de 50μl, droga B 0.025mg vedado com parafina no volume de 100μl, droga B 0.025mg vedado com cola no volume de 100μl, NaCl vedado com parafina no volume de 50μl, NaCl vedado com cola no volume de 50μl, vedado com parafina, vedado com cola, sem vedação (Experimento 7/n = 2184).



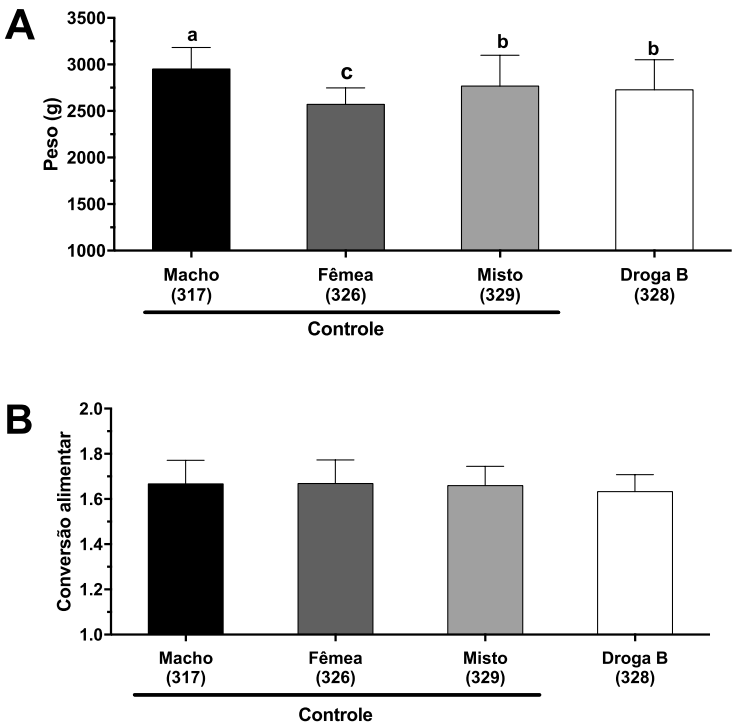
O experimento 8 (estudo a campo) foi realizado com intuito de fornecer as aves tratadas e os controles para a criação das aves em aviário experimental. Deste modo, foi utilizada a droga B na dose de 0.025mg aplicada em um volume de 100μl vedado com cola. Não houve diferença estatística sobre eclodibilidade do grupo controle da incubadora e droga B, apesar deste ser numericamente menor (tabela 4). As taxas de mortalidade e peso em ambos os grupos também não diferiram entre os grupos (Tab. 4). Já proporção de machos foi superior no grupo droga B (Tab. 4). A fertilidade foi de 90.9 e 90.5% para controle da incubadora e droga B respectivamente.

Tabela 4 – **(A)** Taxas de eclodibilidade, **(B)** mortalidade embrionária, **(C)** porcentagem de machos **(D)** peso ao nascer. Os tratamentos controle incubadora, droga B (Experimento 8/n = 1596 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).

Parâmetro	Controle (1176)	Droga B (420)	Valor de p
Eclodibilidade	80.8	74.0	0.31338
Mortalidade	10.8	16.8	0.22144
Machos	50.0 [a]	99.3 [b]	0.00001
Peso	43.2	42.4	0.89888

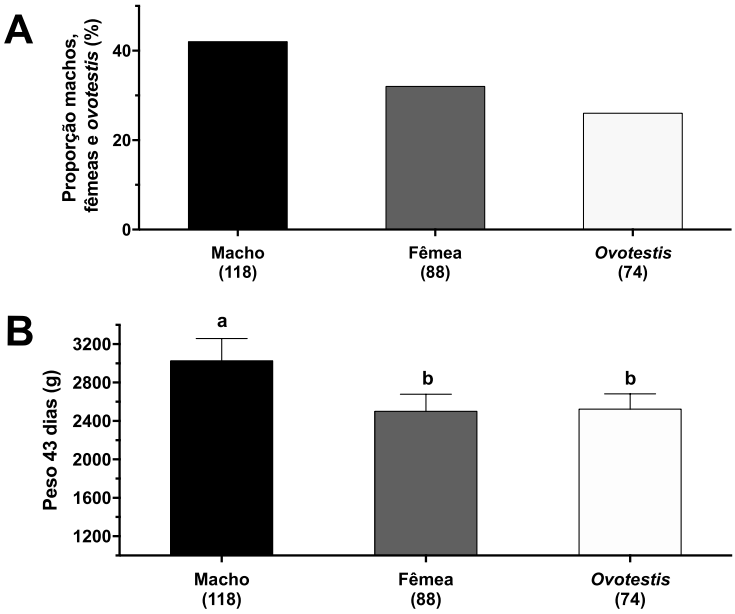
As aves do grupo tratado com droga B e as do controle foram divididas em grupos de machos, misto (machos e fêmeas) e fêmeas e alojadas em um aviário industrial para a mensuração do ganho de peso, conversão alimentar e rendimento de carcaça. O grupo de machos genéticos teve peso superior ao de a todos os outros grupos testados. O grupo misto e droga B não diferiram entre si, entretanto foram superiores às fêmeas genéticas (Fig. 11A). Não houve diferença na conversão alimentar entre os grupos, embora o grupo droga B apresentou uma conversão alimentar numericamente menor (Fig. 11B).

Figura 11 – **(A)** Peso aos 42 dias, **(B)** conversão alimentar dos tratamentos controle incubadora e droga B 0.025mg (Experimento 8/n = 1596 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).



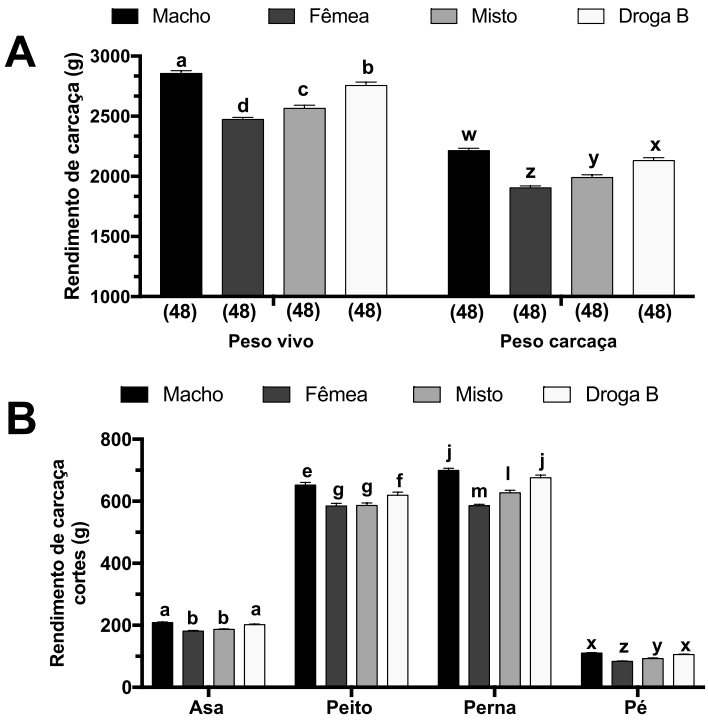
Embora a porcentagem de machos, nas aves tratadas com a droga B, foi próxima a 100% durante a sexagem cloacal com 1 dia de idade, na necropsia aos 42 dias foi observado que 58% das aves apresentavam ovários ou *ovotestis* (Fig. 12A). Por isso, após a necropsia, separamos as aves em machos, fêmeas e revertidos e as pesamos novamente. O peso dos machos foi superior ao das fêmeas e *ovotestis* (Fig. 12B). A mortalidade durante o experimento foi 35 (9,9%), 26 (7,3%), 23 (6,5%) e 24 (6.8%) aves para os grupos macho, fêmea, misto e droga B respectivamente.

Figura 12 – **(A)** Proporção de machos, fêmeas e *ovotestis,* e **(B)** peso com 42 dias idade da droga B. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Experimento 8/n= 352) (P < 0.05).



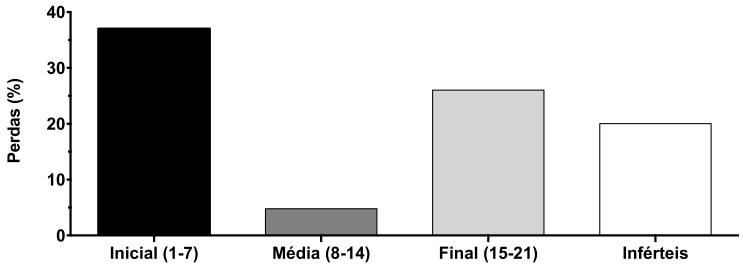
Contrariamente ao que foi observado na pesagem das aves com 42 dias, o peso da amostragem (n= 48/grupo), enviada ao abatedouro com 43 dias de idade, a droga B foi superior ao grupo misto e isso também ocorreu para o peso da carcaça (13A e 13B). Esta diferença também foi observada em relação ao peso do peito e perna. No peso de asa e pé não houve diferença entre droga B e macho, e ambos foram superiores ao grupo misto e fêmea.

Figura 13 – **(A)** Peso vivo e rendimento de carcaça **(B)** rendimento de cortes de aves abatidas com 43 dias dos grupos macho, fêmea, misto e droga B. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (Experimento 8/n= 192) (P < 0.05)



No experimento 9 (estudo a campo), aproveitando uma circunstância dentro de um incubatório industrial, realizamos um piloto para avaliar o efeito da injeção apenas do veículo (NaCl acrescido de corante) utilizando uma vacinadora automática *in ovo* (sem quaisquer alterações quanto a profundidade da injeção). Sem essas adequações foi observado que o conteúdo foi entregue em grande parte dos casos no albúmen espesso, sendo em alguns ovos injetado muito próximo ao disco germinativo ou até mesmo dentro da gema. Isto reduziu a taxa de eclobidilidade a 11% com a maioria dos embriões morrendo entre 0 e 7 dias de incubação (Fig. 14).

Figura 14 – Resultados de embriodiagnóstico de ovos injetados apenas com veículo (NaCl) após 72 horas de incubação via vacinadora automática (*OvoJector*) dentro de um incubatório industrial (Experimento 9/n=150 ovos). Mortalidade inicial (entre 0 e 7 dias de incubação), mortalidade intermediária (entre 8 e 14 dias de incubação) e mortalidade final (entre 15 e 21 dias de incubação).



7. DISCUSSÃO

Embora a indústria avícola nacional seja muito produtiva caracterizando o Brasil como um dos principais produtores mundiais de carne de frango, ainda há espaço para muitas mudanças que podem elevar ainda mais esta produtividade. Uma destas, é diminuir a diferença de ganho de peso entre os sexos. Frangos machos ganham peso mais rapidamente que as fêmeas causando uma diferença, dependendo da genética da ave, de mais de 100g de peso para aves de igual idade manejadas de maneira semelhante no mesmo aviário (ALBUQUERQUE et al. 2005; API et al. 2017). Por isso, tanto para produtores quanto para integradoras e frigoríficos é mais vantajoso economicamente a produção de machos.

Sabendo desta disparidade no desempenho produtivo entre os sexos nosso estudo teve como objetivo diminuir esta diferença, fazendo com que a fêmea atingisse um peso semelhante ao do macho através do processo de reversão sexual pelo uso de IAs antes da diferenciação sexual. Entretanto, são escassos na literatura estudos com a administração de IAs avaliando índices zootécnicos. Além disso, na maioria dos estudos com IAs o fármaco utilizado é o fadrozole (ELBRECHT; SMITH; 1992; BURKE; HENRY, 1999; VAILLANT, et al. 2001). Apesar de eficiente esta droga tem alto custo, portanto sua utilização em larga escala é economicamente proibitiva. Deste modo, foi necessário avaliar outros IAs testando a dose ideal além da via de aplicação.

Sendo assim, iniciamos avaliando as diferentes vias de aplicação. A eclodibilidade referente as diferentes vias de administração testadas (experimento 1), mostrou que a via superficial obteve uma maior percentagem de eclodibilidade quando comparada as demais vias. Este resultado serviu como base para a escolha desta via de administração nos demais experimentos. A maior taxa de eclodibilidade da via superficial, deve se o ao fato que esta via apresenta uma profundidade de entrada da agulha no ovo menor quando comparada as outras vias. Uma profundidade maior pode atingir o embrião causando sua morte.

No segundo experimento o fármaco fadrozole apresentou uma alta porcentagem de machos porém foi superior ao grupo controle. Diversos estudos (ELBRECHT; SMITH; 1992; BURKE; HENRY, 1999; VAILLANT, et al. 2001)

usando o fadrozole na mesma concentração do nosso estudo (0.1mg/ovo), obtiveram uma taxa de reversão de 100%.

Apesar da droga da droga C não ser um inibidor de aromatase (mas sim um inativador esteroidal), esta foi testada para avaliar sua eficiência na reversão sexual de aves. Contudo o fármaco resultou em morte embrionária de todas as aves. No embriodiagnóstico foi possível observar que os embriões morreram no 10° dia de incubação provavelmente devido a toxicidade do fármaco, entretanto não há estudos na literatura com uso desta droga em aves.

A eclodibilidade do grupo tratado com a droga B foi semelhante ao grupo controle negativo, portanto é possível inferir que o fármaco, nesta concentração, não é tóxico para o embrião pois não houve queda na taxa de nascimento. Este fator é essencial para nosso experimento, visto que o objetivo principal do projeto é a aplicação do inibidor de aromatase em escala industrial. Caso houvesse uma queda na eclodibilidade, a droga não poderia ser aplicada na indústria avícola mesmo apresentando uma alta taxa de reversão. O peso de nascimento dos pintinhos também é um fator muito importante para a aplicação da técnica em escala industrial. Neste experimento a média de peso das aves que receberam droga B foi similar aos grupos controle negativo e NaCl. Portanto a droga B não reduziu o peso de nascimento, este é um fator importante para a sua aplicabilidade em larga escala. Pintos com peso de nascimento menor ganham menos peso durante o período de criação comparados às aves que nascem mais pesadas. (STRINGHINI et al. 2003; LARA et al. 2005)

Com base nos resultados obtidos no experimento com a droga B, decidimos diminuir a concentração da droga, com intuito de minimizar os custos do tratamento já que o objetivo final é utilizar o fármaco em escala industrial dentro da indústria avícola. Como era esperado o grupo tratado na concentração de 0.1mg/ovo apresentou uma alta taxa de aves machos (100%). Nos grupos tratados com 0.04mg e 0.02mg/ovo de droga B o número de machos também foi próxima de 100%, entretanto devido ao número amostral de ovos ser muito baixo não foi possível comprovar a eficiência do fármaco. Neste experimento observamos uma queda na fertilidade e eclodibilidade, o que pode estar relacionado com a idade avançada das matrizes (80 semanas).

Com relação à droga D a porcentagem de machos foi menor que o esperado. Como não há na literatura nenhum registro de aplicação da droga D

em aves com o objetivo de causar reversão sexual, são necessários novos experimentos utilizando dosagens maiores que estas utilizadas (0.1mg, 0.04mg e 0.02mg/ovo) com o escopo de alcançar a reversão sexual nas fêmeas genéticas. O custo da droga D é menor quando comparado a droga B, e por isso era importante encontrar uma dose que apresentasse uma porcentagem de machos maior que 80% e não diminuísse a eclodibilidade dos ovos submetidos ao tratamento com este inibidor.

Os experimentos realizados no estudo em laboratório não foram conclusivos para determinar as doses e os fármacos a serem utilizados, devido ao reduzido número de ovos já que o estudo foi realizado no departamento de reprodução animal (VRA/FMVZ/USP). Desta forma, o estudo a campo foi inteiramente realizado em um incubatório industrial o que além de maximizar o número de ovos testados possibilitou testar a eclodibilidade dos tratamentos em incubadora industrial.

Primeiramente avaliamos o momento mais adequado para a aplicação dos IAs. Nos estudos com fadrozole (ELBRECHT; SMITH; 1992; BURKE; HENRY, 1999; VAILLANT, et al. 2001) a aplicação era realizada após 72 horas de incubação. Isto em escala industrial é um fator prejudicial pois demandaria um manejo mais laborioso dentro do incubatório já que seria necessário retirar os ovos de dentro da incubadora para aplicação dos IAs. Ademais, este procedimento poderia influenciar negativamente na eclodibilidade pois como os ovos seriam retirados da incubadora durante o período de aplicação da droga ficariam fora das condições de umidade, temperatura e viragem que são essenciais para a eclosão (YALSIN; SIEGEL, 2003). Neste sentido, avaliamos a aplicação dos IAs (fadrozole, droga B, droga D e NaCl) com 72 horas de incubação (72H) e sem incubação prévia (0H). À exceção de NaCl, em todos os outros tratamentos foi observado uma eclodibilidade maior em 0H em relação a 72H.

A eclodibilidade menor nos grupos tratados no 72H pode estar relacionada com a retirada dos ovos, para a aplicação dos IAs, das condições ideais de incubação (YALSIN; SIEGEL, 2003). Deste modo 0H foi escolhido como momento de aplicação para os posteriores experimentos deste estudo. Pois além de reduzir consideravelmente o manejo dos ovos no incubatório também minimiza o risco de quedas na esclodibilidade. A alta contaminação

nos ovos tratados com 72H também influenciou negativamente a eclodiblidade. Contudo foram tomados os mesmos procedimentos de desinfecção dos ovos (aplicação de álcool 70%) em 0H e 72H.

Em relação ao número de machos fadrozole e droga B apresentaram porcentagens maiores que a droga D. A dose de 0.1mg/ovo na droga D foi escolhida com base nos outros IAs utilizados, já que não há estudos sobre o uso da droga D em aves. Provavelmente seria necessário aumentar a dose de droga D para uma melhor quantidade do número de machos. Entretanto, tal procedimento encareceria o tratamento o que inviabilizaria economicamente o uso desta droga em escala industrial. Por esta, razão a droga B foi o fármaco de escolha para os próximos experimentos, assim como o fadrozole que apesar do seu alto custo foi usado com um controle positivo já que este IA é amplamente utilizado na reversão sexual de pintinhos, ao contrario da droga B. O peso de nascimento não foi diferente entre os tratamentos este fator é essencial para a continuidade dos experimentos com IAs. Pintinhos que nascem com peso menor terão consequentemente um ganho de peso menor, durante a fase de criação quando comparados a aves que nascem mais pesadas.

Além disso foi necessário adequarmos a aplicação dos inibidores antes da incubação, diminuindo assim o impacto do tratamento na rotina do incubatório. Não há estudos sobre a farmacodinâmica e farmacocinética dos inibidores de aromatase em aves, contudo as pesquisas sobre a farmacologia destes em humanos mostram que a meia-vida da droga D é de 41 horas enquanto da droga B gira em torno de 48 a 96 horas (BUZDAR, et al. 2014). A diferenciação sexual em aves ocorre entre o terceiro e o quarto dia de incubação (CHUE; SMITH; 2011). Sendo assim, é possível que a concentração da droga D no embrião esteja muito baixa devido a sua metabolização ocorrer anteriormente à diferenciação sexual (BUZDAR, et al. 2014). Isto, pode também ter influenciado na menor proporção de machos encontrada.

Como a droga B foi o fármaco escolhido devido sua melhor eficiência, esta foi avaliada em diferentes dosagens com objetivo de diminuir os custos do tratamento. Além disso, era importante avaliar se doses mais baixas deste fármaco resultaria em eclodibilidade mais alta, isto poderia estar relacionado a toxidade da droga B. Contudo, ovos tratados com a dose mais alta de droga B

(0.1mg/ovo) obtiveram uma eclodibildiade superior à dose média (0.05mg/ovo) e não diferiram da dosagem mais baixa (0.025mg/ovo). Sendo assim, foi descartado que a queda na eclodibilidade tinha relação com a toxicidade do fármaco, ao menos nestas concentrações testadas. Como futuramente o fármaco será aplicado em escala industrial a dose mais baixa (0.025mg/ovo) foi escolhida por uma questão de custo e facilidade na aplicação. A droga B tem difícil solubilidade em NaCl o que torna sua aplicação na dose 0.1mg/ovo dificultosa, ao que passo que a concentração menor da droga facilitou sua aplicação nos ovos.

Em relação ao número de machos todas as doses da droga B e fadrozole foram similares. A mortalidade inicial foi maior em todos os tratamentos o que pode ser indicativo do processo de injeção dos fármacos e/ou veículo nos ovos, pois neste experimento todos os ovos foram incubados previamente à incubação, portanto os embriões eram mais sensíveis quando comparados aos de 72 horas de incubação, devido a diferença no desenvolvimento embrionário ente os dois períodos. Enquanto um embrião com 72 horas de incubação possui coração, batimento cardíaco e formação dos principais vasos sanguíneos o que ainda não foi incubado, apresenta apenas por volta de 60 mil células e ainda não iniciou a gastrulação (HAMBUERGER; HAMILTON, 1951) sendo portanto muito mais sensíveis às manipulações. Neste experimento também não houve diferença no peso ao nascer em nenhum grupo testado. O método de selagem dos orifícios feitos para aplicação das injeções também pode ter influenciado na mortalidade dos embriões. Desde o primeiro estudo vedamos os furos nos ovos com parafina líquida, entretanto, esta poderia escorrer pelo orifício penetrando na gema e causando a morte do embrião. Além disso o volume aplicado (100µl) poderia ser outro fator que causaria aumento na mortalidade embrionária, pois seria um volume muito alto aplicado no ovo.

Desta maneira, decidimos comparar o método de vedação com parafina com uma solução contendo cola. Este método é menos laborioso e mais rápido para a vedação dos ovos. Também testamos dois volumes distintos 50µl e 100µl por ovo. Em todos os tratamentos ovos selados com cola obtiveram eclodibilidade maior aos selados com parafina, portanto este método de vedação foi o escolhido para os próximos experimentos, por sua facilidade de

execução. É possível presumir que a parafina líquida possa ter penetrado no interior dos ovos causando a morte do embrião e consequentemente diminuindo a eclodibilidade.

Contrariamente ao que esperávamos, no volume menor de aplicação (50µl) foi observada uma eclodibilidade menor que o volume de 100µl, portanto um volume maior de aplicação não foi prejudicial para o embrião. Exclusivamente neste experimento a mortalidade final (15-21 dias) foi maior, em todos os grupos. Isto poderia estar relacionado à alguma falha na incubadora, porém nenhuma anormalidade foi observada pelos técnicos do incubatório.

Testamos ovos sem nenhuma aplicação de veículo e/ou fármaco mas que foram perfurados com a agulha. Neste grupo esperávamos uma alta taxa de contaminação, visto que os ovos estavam com os ofícios abertos e isto poderia aumentar consideravelmente a entrada de microrganismos. Porém isto não ocorreu já que a taxa de contaminação foi muito baixa (menor que 1%) assim como nos outros grupos. A selagem dos orifícios ainda é um processo laborioso já que foi realizada de maneira manual, portanto deixar os ovos sem vedação poderia ser uma alternativa para este problema.

A proporção de machos foi similar para ambos os volumes e o processo de vedação também não influenciou na ação dos fármacos. Novamente não foi encontrada diferença entre os pesos de nascimentos de todos os grupos testados. Como foi observada que a droga B foi eficiente em produzir um alto número de machos, neste experimento e no posterior não utilizamos o fadrozole como controle positivo.

Após a escolha do IA, dose, volume e método de selagem dos ovos (cola) avaliamos a eficiência dos pintinhos tratados com a droga B comparados com machos e fêmeas genéticas além de um grupo com ambos em aviário experimental. Para este experimento os pintinhos dos quatro grupos eram provenientes do mesmo lote de ovos, portanto eram oriundos das mesmas matrizes e granjas, incubados juntos na mesma incubadora. A eclodibilidade foi menor na droga B quando comparada ao controle, mas a diferença foi menor que 7% entre os grupos. Como a aplicação das injeções eram manuais esta melhor eclodibilidade pode ser reflexo de um refinamento maior na técnica de aplicação após a realização de vários experimentos. O

número de machos do grupo droga B, como esperado, foi superior ao controle. O peso foi similar entre os grupos, esta condição é fundamental já que como estas aves foram encaminhadas para o teste de ganho de peso era fundamental que partissem de pesos iniciais similares.

A partir de 28 dias já foi possível notar dimorfismo sexual, e no grupo droga B as aves foram categorizadas como machos fenotípicos. Entretanto a partir de 35 dias algumas aves que anteriormente apresentavam fenótipo de machos foram caracterizadas com fêmeas fenotípicas, e partir desta pesagem ocorreu diferença no peso entre os grupos, isto não havia ocorrido nas pesagens de 7, 14, 1 e 28 dias (gráficos em anexo). Esta mudança refletiu no ganho de peso final pois com 42 dias, pois os machos controle apresentavam peso superior a todos os grupos. Aves do grupo droga B e misto não diferiram entre si mas tiveram peso superior às fêmeas.

Baseados nestes pesos realizamos a necropsia de todas as aves do grupo droga B e novamente as dividimos e pesamos com base na morfologia das gônadas (testículos, ovários e *ovotestis*). As aves que apresentavam testículos apresentaram peso superior às com ovário e *ovotestis*, comprovando a maior voracidade alimentar e ganho de peso do macho. Provavelmente devido a baixa dose da droga B as aves que até os 28 dias eram fenotipicamente machos desenvolveram novamente ovário ou *ovotestis* e isto influenciou negativamente no ganho de peso destas.

Em relação ao peso de abate os resultados encontrados diferiram dos obtidos no aviário. Enquanto no galpão não foi encontrada diferença estatística em relação ao peso aos 42 dias entre as aves da droga B e as do grupo misto, na pesagem aos 43 dias no abatedouro o grupo B foi superior ao misto. A pesagem no abatedouro e rendimento de carcaça foi realizada com uma amostragem de 48 aves por grupo ao passo que no aviário todas foram pesadas. Entretanto, no abatedouro, as aves foram pesadas individualmente e as balanças eram mais precisas que as utilizadas no aviário, isto pode explicar a discrepância encontrada entre as pesagens.

Houve diferença, entre misto e droga B, no peso vivo no abatedouro e isto também se repetiu no peso da carcaça, e a droga B novamente foi superior ao misto. Este resultado corrobora com nossa hipótese que o tratamento com IA nas fêmeas ocasionaria um peso maior que as fêmeas não tratadas. Como não

foi possível realizar a sexagem genotípica devido aos altos custos, não é possível quantificar machos genéticos e fêmeas revertidas no grupo tratado com a droga B. Porém é provável que dentro da amostragem selecionada haviam fêmeas revertidas já que o peso vivo e rendimento de carcaça foi inferior ao do grupo de machos controle. No rendimento dos cortes também foi observado um peso superior de peito, perna e pé para o grupo droga B comparado ao misto e fêmea. Em pés e asas o grupo tratado não diferiu dos machos e ambos foram superiores ao grupo misto e fêmeas.

No entanto, é necessário que as aves tratadas com IA alcancem um peso de abate maior e consequentemente maiores rendimentos de carcaça para que se justifique o investimento realizado com a aplicação da droga. Albuquerque et al. (2004) observaram um ganho de peso superior e conversão inferior dos machos genéticos comparados às fêmeas genéticas e misto (ambos os sexos). Api et al. (2017) também observaram os mesmos resultados. Entretanto não houve diferença, entre os sexos, acerca do rendimento de carcaça.

Sendo assim, será necessário aumentar a dose da droga B na tentativa de manter fenótipo masculino das fêmeas e assim esperamos que essas tenham pesos similares aos machos não tratados. São escassos na literatura estudos avaliando ganho de peso e conversão alimentar de fêmeas masculinizadas através de IAs. Burke e Henry (1999) analisaram o ganho de peso de frangos tratados com fadrozole (0.015mg e 0.045mg/ovo) e perus (0.02mg e 0.06mg/ovo). Não observaram diferença de peso entre as fêmeas não tratadas e as fêmeas revertidas em frangos. Em perus nas fêmeas revertidas foi observado um peso superior às fêmeas controle. Mohammadrezaei et al. (2014) encontraram uma taxa de reversão de 90% em ovos tratados com fadrozole (0.1mg/ovo). No grupo tratado com fadrozole (0.1mg/ovo) mais IGF-1 a taxa de reversão foi 100%. Neste experimento os autores compararam o ganho de peso das fêmeas revertidas com os machos, e observaram que no grupo que recebeu fadrozole o ganho de peso entre ambos os sexos foi similar, portanto a droga foi eficiente na reversão sexual das fêmeas além de reduzir a diferença de peso entre os sexos.

Essa grande variação no peso das fêmeas revertidas com uso de IAs, pode estar atrelada aos diferentes graus de reversão observados. Diversos

estudos com aplicação de fadrozole (ELBRECHT; SMITH; 1992; BURKE; HENRY, 1999; VAILLANT, et al. 2001) têm encontrado diferentes graus de reversão sexual, desde fêmeas que não responderam ao tratamento e apresentavam ovários, em outras foi observado *ovotestis* enquanto algumas possuíam testículo unilateral e bilateral. Abinawanto et al. (1998) utilizaram fadrozole (0.1mg/ovo) e mantiveram as fêmeas revertidas até o período de maturidade sexual. Algumas fêmeas masculinizadas produziram espermatozoides, inclusive com a produção espermatozoides W. Isto comprova que o grau de masculinização das fêmeas é muito variado.

Trukhina et al. (2014) testaram a eficiência de IAs na reversão sexual de pintinhos, utilizando a dose de 0.1mg/ovo. Os autores analisaram a reversão sexual com a aplicação dos IAs no 4° dia de incubação e no 4° e 11° dia. Porém, o escopo deste estudo se basearam apenas na avaliação histológica das gônadas. Deste modo, os autores não informaram a porcentagem de reversão sexual e também não houve cálculo de eclodibilidade já que a incubação foi interrompida no 19° dia, e a eclosão em frangos ocorre geralmente com 21 dias (504 horas) (HAMILTON; HAMBUERGUER, 1951).

Com relação a utilização dos IAs na indústria avícola, iniciamos os testes de aplicação através da máquina de vacinação em ovo. Em nossos testes prévios em incubatório, com a aplicação de NaCl 0.9% nos ovos através da máquina de vacinação houve alta mortalidade embrionária inicial. As vacinadoras aplicam as vacinas na altura albume, contudo isto ocorre no 18° dia de incubação durante a transferência dos ovos da incubadora para o nascedouro. Já a aplicação dos inibidores de aromatase foi definida no dia 0 de incubação, e a agulha deve ser inserida no interior da câmara de ar, baseado nos experimentos que realizamos. Como a profundidade da agulha da vacinadora não foi ajustada para ovos com desenvolvimento embrionário inicial, a agulha está penetrando no albume espesso e/ou na gema ocasionando a morte do embrião. Isto foi comprovado com a adição de um corante junto ao NaCl.

Para uma eclodibilidade superior será necessário diminuir a profundidade de penetração da agulha no ovo, penetrando preferencialmente apenas na câmara de ar. É fundamental aprimorar este procedimento pois a vacinadora é imprescindível para a aplicação dos fármacos em larga escala, já

que o IA será administrado em milhões de ovos. Por esta razão, também será necessário desenvolver um método automatizado para a selagem dos ovos.

Diante do exposto é possível afirmar que a droga B foi eficiente em aumentar o número de machos fenotípicos na eclosão. A dose mais baixa utilizada (0.025mg) apresentou quase 100% de machos fenotípicos no primeiro dia de vida. Entretanto, após os 42 dias de criação observou-se que 58%destas aves desenvolveram ovários ou *ovotestis* o que influenciou negativamente no ganho de peso. Desta maneira será necessário aumentar a dose da droga B e repetir o experimento de avalição de peso e observar, através da necropsia, as gônadas avaliando se as aves se manterão com testículos até o abate (42 dias de idade) e se este fator contribuirá com um maior ganho de peso das aves tratadas comparadas às fêmeas genéticas e lote misto.

Além disso, caso os resultados esperados sejam promissores, ou seja, as aves tratadas com a droga B tenham peso superior às fêmeas e ao grupo misto, será necessário automatizar a aplicação do IA através da vacinadora e também padronizar um método de selagem mais rápido, já que o fármaco será aplicado em milhões de ovos.

Após solucionados estes desafios acreditamos que a droga B possa ser empregada em escala industrial diminuindo a diferença de peso entre os sexos. Isto aumentará a lucratividade dos produtores e da indústria além de trazer melhorias no manejo das aves durante o período de criação.

8. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos foi possível afirmar que:

- a injeção por via superficial apresentou uma eclodibilidade maior que as vias lateral e média;
- o grupo de ovos no qual o fármaco foi aplicado sem incubação prévia (0h) apresentou uma maior eclodibilidade que o grupo em que o fármaco com 72 horas de incubação;
- a droga B apresentou uma maior proporção de machos quando comparada com fadrozole e droga D;
- não houve diferença no número de machos entre as três concentrações da droga B;
- não houve diferença em relação à eclodibilidade entre os volumes de aplicação de 50 e 100µl;
- o método de selagem dos ovos por cola apresentou uma eclobilidade maior que o método de selagem por parafina;
- as aves do grupo droga B obtiveram peso vivo, no aviário, igual ao grupo controle misto, superior ao grupo controle fêmea e inferior ao controle macho.;
- as aves do grupo droga B obtiveram peso vivo e de carcaça, no abatedouro, superior ao grupo misto e fêmea e inferior ao machos;
- as aves do grupo droga B obtiveram rendimento de cortes (asa, peito, perna e pé) superiores aos grupos misto e fêmeas.

9. REFERÊNCIAS

ABINAWANTO, C., ZHANG, C., SAITO, N., MATSUDA, Y., SHIMADA, K. Identification of sperm-bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chicken. **Journal of Experimental Zoology**. 280: 65-72. 1998.

ALBUQUERQUE, R., MARCHETTI, L.K., FAGUNDES, A.C.A., BITTENCOURT, L.C., TRINDADE NETO, M.A., LIMA, F.R.. Efeito de diferentes densidades populacionais e do sexo sobre o desempenho e uniformidade em frangos de corte. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. 43: 581-587. 2006

API, I., TAKAHASHI, S.E., MENDES, A.G., PAIXÃO, J., ROSANA REFATI, R., RESTELATTO R. Efeito da sexagem e de linhagens no desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**. v.18: 1-10. 2017.

Associação Brasileira de Proteína Animal. 2016. *Relatório Anual da ABPA 2017*. Disponível em <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso 15/10/2017.

BEG, M.A.H., SAIFUL ISLAM, K.B.M., AFTABUZZAMAN, M., MAHBUB, A.S.M. Effects of separate sex growing on performance and metabolic disorders of broilers. **International Journal of Animal Resources** 1: 19-26. 2016.

BURKE, W.H., HENRY, M.H. Gonadal development and growth of chickens and turkeys hatched from eggs injected with an aromatase inhibitor. **Poultry Science** 78: 1019-1033. 1999.

BURROWS, W., QUINN, J. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. **Poultry Science**. 16:19-24. 1937.

BUTERI, C.B. Efeitos de diferentes planos nutricionais sobre a composição e o desempenho produtivo e econômico de frangos de corte. 252p.Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2003.

BUZDAR, A.U. Robertson J.F, Eiermann W, Nabholtz JM. 2002. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozle, and exemestane. **Cancer**. 95:2006-16.

BUZDAR, A.U. Aromatase inhibitors: changing the face of endocrine therapy for breast cancer. **Breast disease.** 24:107-17. 2005.

CHUE, J., SMITH, C.A. Sex determination and sexual diferentiation in the avian model. **FEBS Journal**. 278: 1027-1034. 2011.

COLLINS, K. E., JORDAN, B. J., MCLENDON, B. L., NAVARA, K. J.,

BECKSTEAD, R. B., WILSON, J. L. No evidence of temperature-dependent sex determination or sex-biasedembryo mortality in the chicken. **Poultry Science** 92: 3096-3102. 2013.

DEWIL, E., BUYSE, J., VELDHUIS, J.D, MAST, J., DE COSTER, R., DECUYPERE, E. In ovo treatment with an aromatase inhibitor masculinizes postnatal hormones levels, abdominal fat fad contente, and GH pulsatility in broiler chickens. **Domestic Animal Endocrinology** 15: 115-127. 1998.

ELBRECHT, A., SMITH, R.G. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens**. Science.** 255(5043): 467-470. 1992.

LARA, L.J.C., BAIÃO, N.C., CANÇADO, S.V., TEIXEIRA, J.L., LÓPEZ, C.A.A. ., DUARTE, F.D., MICHALSKY, V.B. Influência do peso inicial sobre o desempenho e o rendimento de carcaça e cortes de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** 6: 799-804. 2005.

KLEIN, S., FLOCK, D., ELLENDORFF, F. Management of newly hatched male layer chicksd current knowledge on sex determination and sex diagnosis in chicken: potential solutions. **Worlds Poultry Science Journal**. 59: 62–4. 2003.

MOHAMMADREZAEI, M., TOGHYANI, M., GHEISARI, A., EGHBALSAIED, S. Synergistic effect of fadrozole and insulin-like growth factor-I on female-to-male sex reversal and body weight of broiler chicks. **PLoS One** 9: p.e103570. 2014.

NOMURA, O., NAKABAYASHI, O., NISHIMORI, K., YASUE, H., MIZUNO, S. Expression of five steroidogenic genes including aromatase gene at early developmental stages of chicken male and female embryos. **Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology.** 71, 103–109. 1999.

RASHEDI, M., MARAUD, R., STOLL, R. Development of the testes in female domestic fowls submitted to an experimental sex reversal during embryonic life. **Biology of Reproduction.** 29: 1221-1227. 1983.

REQUENA, A., JULIO HERRERO, J., LANDERAS, J., NAVARRO, E., NEYRO, J.L., SALVADOR, C., TUR, R., CALLEJO, J., CHECA, M.A., FARRÉ, M., ESPINÓS, J.J., FÁBREGUES, F., GRAÑA-BARCIA, M. Use of letrozole in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. **Human Reproduction Update.** 14: 571-582. 2008.

PEREIRA, R.J.G. Reprodução das aves. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária.** 2 ed. São Paulo: Roca: 2014, p. 2235-2269.

RONDELLI, S.I., MARTINEZ, O.I., GARCÍA, P.T. Sex effect on productive parameters, carcass and body fat composition of two commercial broilers lines. **Revista Brasileira Ciência Avicola.** 5: 169-173. 2003.

SCHEUERMANN, G.N., CUNHA JR, A., CARON, L. Non scientific restrictions to poultry production: main global myth and beliefs. Proc. XXIV **World's Poultry**

Congress. 1-11.

SHIM, M.Y, TAHIR, M., KARNUAH, A.B., MILLER, M., PRINGLE, T.D., AGGREY, S.E., PESTI, G.M. 2012. Strain and sex effects on growth performance and carcass traits of contemporary commercial broiler crosses. **Poultry Science** 91 :2942–2948. 2012.

SMITH, C. Molecular genetics of avian sex determination and gonadal differentiation. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.). Reproductive biology and phylogeny of birds vol. 6B, Science Publishers, Enfield. Pp. 479-506. 2007.

STEINER, G., BARTELS, T., STELLING, A., KRAUTWALD-JUNGHANNS. M.A., FUHRMANN, H., SABLINSKAS, V., KOCH, E. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. **Analytical. Bioanalytical Chemica**l. 400: 2775–2782. 2011.

STRINGHINI, J.H., LABOISSIÉRE, M., MURAMATSU, K., LEANDRO, N.S.M., CAFÉ, M.B. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de quatro linhagens de frango de corte criadas em Góias. **Revista Brasileira Zootecnia** 32: 183-190. 2003.

VAILLANT, S., DORIZZI, M., PIEAU, C., RICHARD-MERCIER, N. Sex reversal and aromatase in chicken. **Journal of Experimental Zoology**. 290: 727-740. 2001.

VAILLANT, S., GUEMENE, D., DORIZZI, M., PIEAU, C., RICHARD-MERCIER, N., BRILLARD, J.P. Degree of sex reversal as related to plasma steroid levels in genetic female chickens (Gallus domesticus) treated with Fadrozole. **Molecular Reproduction Development**. 65: 420-428. 2003.

WEISSMANN, A., REITEMEIER, S., HAHN, A., GOTTSCHALK, J., EINSPANIER, A. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. **Theriogenology** 08: 199-205. 2013.

YANG, X.-R., JIANG, H.-S., ZHENG, J.-X., QU, L.-J., CHEN, S.-R., LI, J.-Y., XU, G.-Y., YANG, N. Dosage Effects of Fadrozole on Growth and Development of Sex-Reversed Genetic Female Chickens. **Journal Integrat Agriculture.** 12: 1049-1053. 2013.

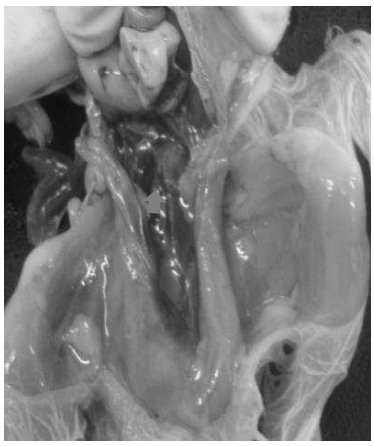
YALCIN, S., SIEGEL, P.B. Exposure to cold and heat during incubation on developmental stability of broiler embryos. **Poultry Science**. 82:1388–1392. 2003.

Apêndice A

Figura 15 – Imagem da avaliação do sexo morfológico por meio de necropsia em aves com um dia de idade tratadas com IAs. (A) ave com testículos, (B) ave com ovário e (C) ave com *ovotestis.*

A

B

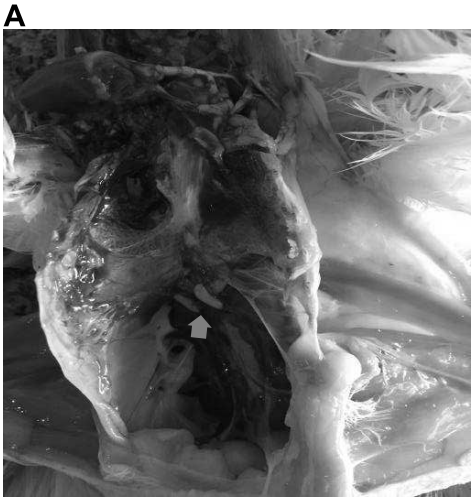


C

Apêndice B

Figura 16 – Imagem da avaliação do sexo morfológico por meio de necropsia em aves com 42 dias de idade tratadas com IAs. (A) ave com testículos, (B) ave com ovário e (C) ave com *ovotestis.*

A

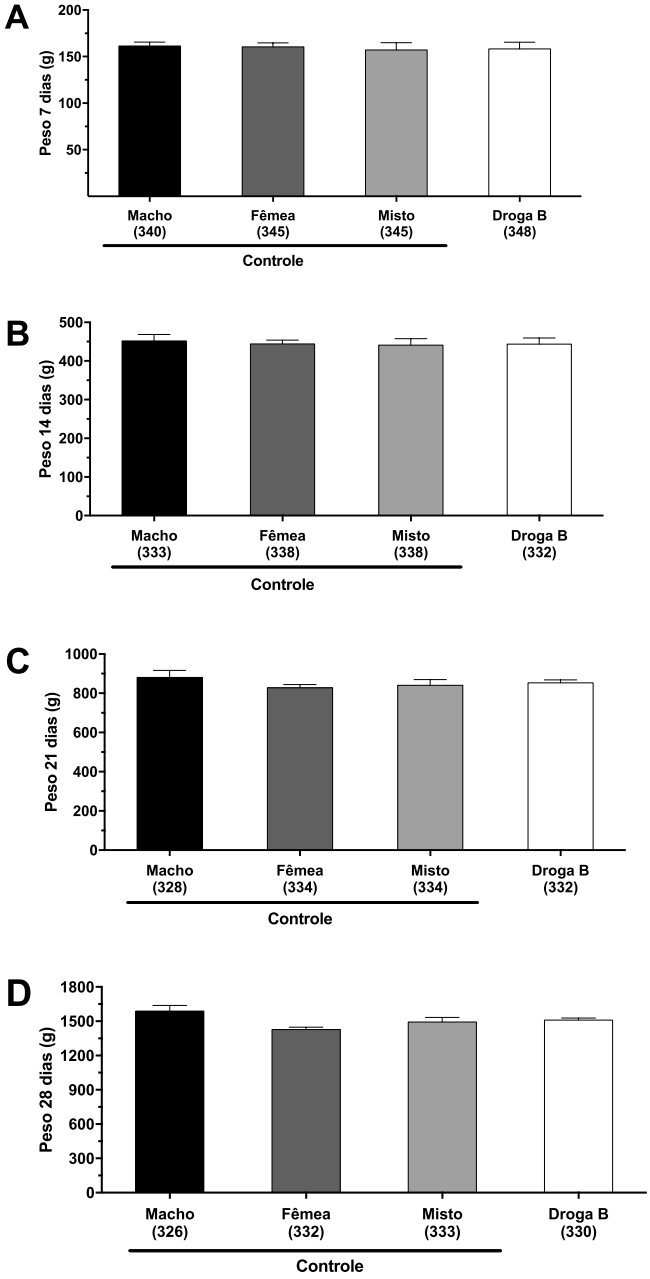


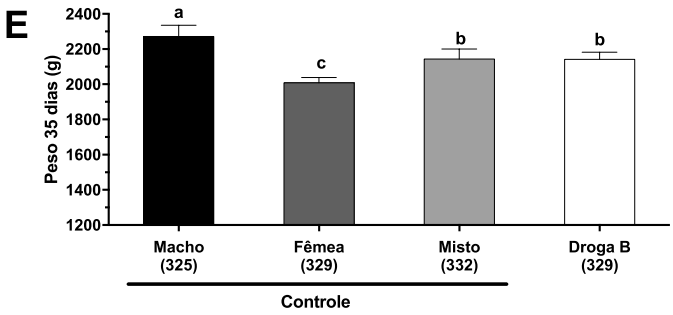
B

C

Apêndice C

Figura 17 - **(A)** Peso aos 7 dias, **(B)** 14, **(C)** 21, **(D)** 28 e **(E)** 35 dias dos tratamentos controle incubadora e droga B 0.025mg (n = 1408 ovos). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos (P < 0.05).




E
Peso 35 dias (g)
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
a
c
b
b
Macho
(325)
Fêmea
(329)
Misto
(332)
Droga B
(329)
Controle