




## Glicosaminoglicanos e vitamina C *in ovo* e na alimentação de frangos de corte influencia a histologia óssea e cartilaginosa


Glycosaminoglycans and vitamin C *in ovo* and the feeding of broiler chickens influence bone and cartilaginous histology

Arthur Zuanetti Curti<sup>1</sup> , Elaine Talita Santos<sup>2</sup> , Lizandra Amoroso<sup>2</sup> , Jolyana Machado da Silva Martins<sup>3</sup> , Jean Kaique Valentim<sup>\*4</sup> , Sarah Sgavioli<sup>5</sup> 

1 Universidade Brasil, Descalvado,, São Paulo, Brasil 

2 Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil 

3 Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Ituiutaba, Minas Gerais Brasil 

4 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil 

5 Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil 

\*autor correspondente: kaique.tim@hotmail.com

Recebido: 12 de setembro de 2024. Aceito: 15 de abril de 2025. Publicado: 23 de maio de 2025. Editor: Rondineli P. Barbero

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da nutrição *in ovo* e da suplementação dietética com glicosaminoglicanos (GAGs) e vitamina C na histologia óssea e cartilaginosa de frangos de corte. Utilizou-se um delineamento fatorial inteiramente casualizado (2 x 2), com dois tratamentos durante a incubação (ovos não injetados e ovos injetados com 4 µg de aditivo/100 µL de água no quarto dia de incubação) e dois tratamentos durante a criação (dieta sem aditivo e dieta com 0,74 g de aditivo/100 kg de ração). Cada 100 g de aditivo *in ovo* continha 30 g de sulfato de condroitina, 30 g de sulfato de glucosamina e 5 g de vitamina C, enquanto cada 100 kg de ração continha 30 g de sulfato de glucosamina, 24 g de sulfato de condroitina e 20 g de vitamina C. Aos 43 dias de criação, foram avaliados o número de condrócitos na cartilagem, o número de osteócitos e osteoblastos periosteais na diáfise da tíbia e a espessura da diáfise tibial. Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre os fatores avaliados. As maiores espessuras de diáfise e número de osteoblastos foram observadas nos frangos alimentados com 0,74 g de aditivo/kg de ração e sem aditivo *in ovo*, assim como naqueles que receberam 4 µg de aditivo *in ovo* e não receberam aditivo na dieta. Por outro lado, o uso do aditivo *in ovo* e na dieta resultou em uma redução do número de osteócitos. Conclui-se que a nutrição *in ovo* ou a suplementação dietética com vitamina C e sulfatos de condroitina e glucosamina durante a criação de frangos de corte favorece o desenvolvimento ósseo e cartilaginoso.

**Palavras-chave:** ácido ascórbico; condroitina; alimentação com aditivos; glucosamina.

**Abstract:** The objective of this study is to evaluate the effect of *in ovo* feeding and dietary supplementation with glycosaminoglycans (GAGs) and vitamin C, on the bone and cartilage histology of broiler chickens. A completely randomized factorial design (2 x 2) was used, with two treatments during incubation (non-injected eggs and eggs injected with 4 µg of additive/100 µL of water on the fourth day of incubation), and two treatments during rearing (diet without additive and diet with 0.74 g of additive/100 kg of feed). Each 100 g of *in ovo* additive contained 30 g of chondroitin sulfate, 30 g of glucosamine sulfate, and 5 g of vitamin C, while each 100 kg of feed contained 30 g of glucosamine sulfate, 24 g of chondroitin sulfate,



and 20 g of vitamin C. On day 43 of rearing, the number of chondrocytes in the cartilage, osteocytes, and periosteal osteoblasts in the tibial diaphysis, and tibial diaphysis thickness were evaluated. An interaction ( $P < 0.05$ ) between the factors was observed. Greater diaphysis thickness and osteoblast numbers were observed in broilers fed with 0.74 g of additive/kg without *in ovo* injection, as well as in those that received 4 µg of additive in-ovo, and no additive in the diet. On the other hand, the use of the *in ovo* and dietary additive resulted in a reduction in the number of osteocytes. It was concluded that *in ovo* feeding or dietary supplementation with vitamin C and chondroitin and glucosamine sulfates during broiler rearing benefited bone and cartilage development.

**Key-words:** ascorbic acid; chondroitin; feed additives; glucosamine.

---

## 1. Introdução

O rápido crescimento e a alta taxa de deposição de carne em frangos de corte estão associados a diversos distúrbios metabólicos, que frequentemente resultam em problemas locomotores, como fraqueza nas pernas, problemas articulares e deformidades relacionadas à locomoção <sup>(1,2)</sup>.

Os distúrbios locomotores afetam muitos frangos de corte, particularmente na fase final de crescimento <sup>(3)</sup> e nas linhagens de rápido crescimento <sup>(4)</sup>. Esses distúrbios estão associados a taxas mais altas de mortalidade, menor peso de abate e aumento nas condenações de carcaças, resultando em perdas econômicas significativas <sup>(5,6)</sup>. Além disso, as deformidades locomotoras reduzem o bem-estar dos frangos de corte, aumentando o desconforto durante a caminhada e limitando sua capacidade de exibir comportamentos normais <sup>(3,4,5)</sup>.

Alguns nutracêuticos podem prevenir e/ou reduzir a progressão das mudanças patológicas nas estruturas locomotoras. Entre esses produtos, os glicosaminoglicanos polissulfatados (GAGs), a condroitina e os sulfatos de glucosamina mostraram benefícios no desenvolvimento das estruturas ósseas e articulares em frangos de corte <sup>(7, 8, 9, 10)</sup>, levando a uma consequente redução nos problemas locomotores <sup>(11)</sup> e melhora no desempenho, como evidenciado pelo aumento do ganho de peso <sup>(12)</sup> e redução da conversão alimentar <sup>(7)</sup>.

Os glicosaminoglicanos, como a condroitina e os sulfatos de glucosamina, estimulam os processos anabólicos da cartilagem, como a síntese de proteoglicanos e colágeno <sup>(13)</sup>, proliferação de condrócitos <sup>(7, 10)</sup>, biossíntese da matriz óssea <sup>(10)</sup> e redução da reabsorção óssea <sup>(13)</sup>. Além disso, previnem a degeneração da cartilagem por meio de mecanismos anti-inflamatórios e inibitórios <sup>(14)</sup>.

Por meio de mecanismos epigenéticos, ocorre um aumento na expressão de genes inibitórios do tecido e uma consequente redução na expressão das enzimas metaloproteinases de matriz <sup>(10)</sup>. Por outro lado, a vitamina C, ou ácido ascórbico, é um nutriente importante no desenvolvimento ósseo e cartilaginoso. Embora seja sintetizada endogenamente, a suplementação dietética ainda pode ser benéfica. Isso pode ser devido à disponibilidade insuficiente de vitamina C plasmática, causada pela redução da capacidade de síntese sob estresse térmico <sup>(15)</sup>.

Esse achado sugere que manter um equilíbrio entre a demanda e a disponibilidade de vitamina C durante o estresse térmico pode ter efeitos benéficos. Barrio *et al.* <sup>(16)</sup> concluíram que a suplementação com vitamina C melhorou o desempenho de crescimento em frangos de corte sob estresse térmico. Além disso, para melhorar o desempenho, especialmente em condições de estresse térmico, a vitamina C ajuda a fortalecer o sistema imunológico quando adicionada à dieta dos frangos de corte.

A capacidade de transferência de elétrons da vitamina C confere-lhe qualidades antioxidantes excepcionais, ajudando a manter a integridade de várias células <sup>(17)</sup>. Finalmente, a vitamina C desempenha um papel crucial no desenvolvimento tanto do osso <sup>(8,9)</sup> quanto da cartilagem <sup>(9)</sup> em frangos de corte.

Estudos mostraram que a nutrição *in ovo* com aditivos pode melhorar as condições de eclosão, refletindo na qualidade dos pintos <sup>(18, 19)</sup>. Assim, pode melhorar as etapas fisiológicas e bioquímicas do desenvolvimento embrionário, proporcionando benefícios para a indústria avícola <sup>(19)</sup>. Considerando as pesquisas existentes sobre os benefícios da suplementação de vitamina C e/ou sulfato de condroitina e glucosamina em frangos de corte <sup>(7,8,9,10,11,12,18)</sup>, e a falta de estudos sobre os efeitos desses aditivos no desenvolvimento ósseo e cartilaginoso, particularmente *in ovo*, este estudo tem como objetivo avaliar o impacto da administração de GAGs e vitamina C, tanto *in ovo* quanto por meio da ração, na histologia óssea e cartilaginosa de frangos de corte.

## 2. Material e métodos

Este estudo foi realizado seguindo os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com os procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética Local para o Uso de Animais, sob o protocolo nº 011424/13, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, localizada a 21° 14' 05" S de latitude e 48° 17' 09" W de longitude, a uma altitude média de 615 metros.

Foi utilizado um delineamento fatorial completamente casualizado 2 × 2, com dois tratamentos durante a fase de incubação (ovos não injetados e ovos injetados com 4 µg de aditivo/100 µL de água no quarto dia de incubação) e dois tratamentos durante a fase de criação/crescimento (dieta sem inclusão de aditivo e com 0,74 g de aditivo/100 kg de ração). 2.016 ovos férteis de matrizes Cobb® 500 de 50 semanas de idade, com peso médio de 67±1,16 g, foram distribuídos em sete bandejas (repetições), com 72 ovos por tratamento por bandeja (504 ovos por tratamento).

Os ovos foram incubados em incubadoras (CASP®, IHM Line e-V A 06, Amparo, São Paulo, Brasil) equipadas com controle automático de temperatura, umidade e viragem dos ovos. As temperaturas iniciais e finais e a umidade foram de 37,8°C e 36,9°C e 85,7% e 84,0%, respectivamente, após 504 horas de incubação.

De acordo com Shim & Pesti <sup>(20)</sup>, no embrião de frango de corte, o sistema ósseo começa a se desenvolver no 4º dia de incubação; por esse motivo, essa data foi escolhida. Cada 100 g do aditivo utilizado para a nutrição *in ovo* continha 30 g de sulfato de condroitina, 30 g de glucosamina e 5 g de vitamina C (Synth, 99% de pureza; Diadema, Brasil) ou veículo (100 g). O sulfato de condroitina ((C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>14</sub>S)n, Infiniti Nutraceuticals, Inc.) teve pureza de 91,35%, e o sulfato de glucosamina potássico ((C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>5</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> × 2KCl, Zheijiang Freeman, Inc.) teve um conteúdo de sulfato de 15,7%.

A formulação do aditivo injetado *in ovo* foi baseada no produto veterinário Condrodoton 500 µg (Vetnil®, Louveira, São Paulo, Brasil), recomendado para cães. As quantidades fornecidas de sulfato de condroitina, sulfato de glucosamina e vitamina C (em microgramas) foram ajustadas com base no peso

do cão em quilogramas e, em seguida, convertidas para doses equivalentes em microgramas apropriadas para o peso dos frangos de corte em quilogramas. Os resultados dos estudos sobre nutrição de frangos de corte <sup>(21, 7)</sup> também foram usados para ajustar as doses de glucosamina, condroitina e vitamina C no aditivo injetado.

Para a injeção do aditivo, os ovos foram mantidos horizontalmente e, após a limpeza com etanol 70%, a casca foi perfurada próximo à extremidade mais fina (o lado oposto à célula de ar) com uma agulha estéril [Injex, 13 × 0,38 (27,5 G1/2")], por meio da qual 100 µL da solução aquosa do aditivo foi injetada no albúmen, aproximadamente 6 mm abaixo da membrana. A solução foi preparada com água ultrapura autoclaveada no escuro devido à sua fotossensibilidade <sup>(22)</sup>. Cada ovo inoculado recebeu os seguintes constituintes para o tratamento com 4 µg do aditivo: 1,2 µg de sulfato de condroitina + 1,2 µg de sulfato de glucosamina + 0,2 µg de vitamina C. Após a injeção, o poço foi selado com uma etiqueta identificando o tratamento e a repetição.

Após a eclosão, os machos com pintos de um dia foram alojados em 40 baias com 19 aves cada, resultando em 10 repetições por tratamento, totalizando 760 aves. Os pintos foram criados até 42 dias de idade. Receberam ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental e foram criados seguindo as recomendações de iluminação, temperatura, umidade e manejo do Manual de Gestão da Cobb-Vantress <sup>(23)</sup>. Foram vacinados na incubatória contra a doença de Marek, doença de Gumboro (IBD) e varíola aviária.

O seguinte programa de vacinação foi concluído durante o período experimental: IBD (cepa fraca) no 7º dia com colírio; doença de Newcastle e IBD (cepa quente) pela água de bebida; e o uso de leite em pó como transportador (2 g L-1) no 14º dia. Os frangos de corte foram criados sobre cama de serragem, com 1,2 kg de substrato seco por ave. O regime de luz utilizado foi 24 L:0 D (luz:escuro).

A temperatura e a umidade relativa foram registradas diariamente por meio de dois termohigrômetros digitais (Instrutemp, ITH-2250, escala de temperatura de -50 °C a 70 °C, precisão: ±1°C, São Paulo, Brasil), que foram colocados na altura das aves em dois pontos equidistantes. As temperaturas médias e máximas absolutas foram 30 °C e 34,1 °C, respectivamente, enquanto as temperaturas médias e mínimas absolutas foram, respectivamente, 18,6 °C e 13,4 °C. As umidades relativas médias e máximas absolutas foram 73,36% e 36,18%, respectivamente, e as umidades relativas médias e mínimas absolutas foram, respectivamente, 27,82% e 15,00%.

As dietas foram baseadas em milho e farelo de soja (Tabela 1) e formuladas em duas fases: inicial (1-21 dias de idade) e crescimento (22-42 dias de idade), conforme recomendado por Rostagno *et al.* <sup>(24)</sup>. Para cada 100 kg de ração, foram utilizados 30 g de sulfato de glucosamina, 24 g de sulfato de condroitina e 20 g de vitamina C, totalizando 0,74 g, incluído *on top*.

**Tabela 1.** Ingredientes e composição nutricional das dietas para a fase inicial (1-21 dias de idade) e fase de crescimento e terminação (22-42 dias de idade).

Ingredientes (%)	Inicial	Crescimento/Terminação
	1-21 dias	22-42 dias
Milho	51,97	59,72
Farelo de soja 45%	39,13	31,19
Óleo de soja	4,82	5,63
Fosfato bicálcico	1,95	1,29
Partícula de calcário	0,79	0,87
Sal (NaCl)	0,50	0,50
Suplementos vitamínicos e minerais	0,40	0,40
DL-Metionina 99%	0,32	0,28
L-Lisina HCl 78,5%	0,13	0,12
Total	100	100
Composição nutricional		
Energia metabolizável (kcal/kg)	3,050	3,200
Proteína bruta (%)	22,0	19,0
Cálcio (%)	0,90	0,75
Fósforo disponível (%)	0,47	0,34
Sódio (%)	0,21	0,21
Metionina + cisteína digestíveis (%)	0,90	0,80
Metionina digestível (%)	0,59	0,53
Lisina digestível (%)	1,20	1,00

\*Nutrientes por quilograma de ração: de 1 a 21 dias de idade - Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 (1,78 mg), Vit. B2 (9,6 mg), Vit. B6 (3,5 mg), Vit. B12 (10 µg), ácido fólico (0,57 mg), biotina (0,16 mg), niacina (34,5 mg), pantotenato de cálcio (9,8 mg), cobre (0,12 g), cobalto (0,02 mg), iodo (1,3 mg), ferro (0,05 g), manganês (0,07 g), zinco (0,09 mg), zinco orgânico (6,75 mg), selênio (0,27 mg), colina (0,4 g), promotor de crescimento (bacitracina de zinco) (30 mg), narazina + nicarsina (0,1 g), e metionina (1,68 g). De 21 a 42 dias de idade, Vit. A 7.000 U.I., Vit. D3 3.000 U.I., Vit. E 25 U.I., Vit. K 0,98 mg, Vit. B1 (1,78 mg), Vit. B2 (9,6 mg), Vit. B6 (3,5 mg), Vit. B12 (10 µg), ácido fólico (0,57 mg), biotina (0,16 mg), niacina (34,5 mg), pantotenato de cálcio (9,8 mg), cobre (0,12 g), cobalto (0,02 mg), iodo (1,3 mg), ferro (0,05 g), manganês (0,07 g), zinco (0,09 mg), zinco orgânico (6,75 mg), selênio (0,27 mg), colina (0,6 g), promotor de crescimento (avilamicina) (7,5 mg), (monensina sódica) (0,1 g), e metionina (1,4 g).

No 43º dia de crescimento, 32 aves (com pesos corporais médios próximos ao peso médio da unidade experimental (±5%)) foram selecionadas e identificadas com anilhas numerados nas patas. As aves selecionadas passaram por jejum de oito horas e, em seguida, abatidas por deslocamento cervical, sangradas, depenadas e evisceradas. A tíbia direita e a cartilagem da articulação da epífise proximal de cada ave foram removidas e marcadas.

Para a avaliação histológica da cartilagem articular e do osso foi coletado um centímetro da cartilagem da epífise proximal e da diáfise óssea da tíbia direita. O número de condrócitos na cartilagem, o número de osteócitos na diáfise tibial, o número de osteoblastos periosteais na diáfise tibial e a espessura da diáfise tibial foram medidos. Para a espessura foi considerada a cortical óssea (camada rígida externa que cobre o osso esponjoso).

A cartilagem articular e os ossos foram fixados em solução de formol (10%) por 24 horas, decalcificados em solução de ácido fórmico (5%) por 14 dias à temperatura ambiente, lavados em água destilada e processados de acordo com os métodos usuais para microscopia de luz. As amostras foram desidratadas em uma série de concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Em

seguida, foram diafanizadas em solução de etanol-xileno (1:1), seguida de xileno (100%, 3x), e embebidas em uma mistura de xileno-parafina (1:1), seguida de parafina, o que durou aproximadamente 45 minutos em cada solução. As amostras histológicas, cortes semi-seriados de cartilagem e osso com 6 µm de espessura, foram coradas com hematoxilina-eosina.

Foram feitas 48 lâminas, com doze repetições/tratamentos. Quatro cortes semi-seriados foram colocados em cada lâmina. As imagens foram obtidas por meio de um sistema de registro e análise de imagens (Olympus BX50; CellSens, Tóquio, Japão). A espessura da diáfise tibial foi medida 60 vezes/tratamento/repetição, com lente objetiva ×4. Para o número de osteócitos e osteoblastos foram usadas áreas de 15,05 mm<sup>2</sup> e 562,91 µm<sup>2</sup>, respectivamente, e para o número de condrócitos foi utilizada uma área de 869 mm<sup>2(7)</sup>, com lentes objetivas ×60, 60 e 10, respectivamente. Dez imagens por corte foram obtidas, totalizando 40 imagens por tratamento/repetição.

Os efeitos dos tratamentos de incubação (sem e com 4 µg de aditivo na nutrição *in ovo* (IO)) e dos tratamentos de criação (sem e com 0,74 g/kg de aditivo na dieta (DI)) e suas interações (IO×DI) nas variáveis estudadas foram analisados de acordo com o modelo experimental:  $Y_{ijk} = \mu + (IO)_i + (DI)_j + (IO \times DI)_{ij} + e_{ijk}$ . Os dados foram verificados quanto à presença de outliers e atenderam às suposições de normalidade dos erros observacionais e homogeneidade das variâncias. Após a identificação de que não havia questões que comprometiam essas suposições, os dados foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento de modelo linear geral (GLM) do SAS<sup>®</sup> (25). As médias foram testadas de acordo com o teste F a 5% de probabilidade.

### 3. Resultados

Houve um efeito de interação entre os tratamentos na espessura da diáfise tibial ( $P = 0,0267$ ) e no número de osteócitos na diáfise tibial ( $P = 0,0484$ ) (Tabela 2). A maior espessura da diáfise tibial foi observada em frangos alimentados com 0,74 g de aditivo/kg e sem aditivo *in ovo* ( $P = 0,034$ ), e em frangos que receberam 4 µg de aditivo *in ovo* e sem aditivo na dieta ( $P = 0,0023$ ) (Tabela 2).

Na alimentação *in ovo* a inclusão de 4 µg do aditivo e 0,74 g de aditivo/kg de ração na dieta dos frangos durante a criação reduziu o número de osteócitos na diáfise tibial ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,0108$ , respectivamente) (Tabela 2).

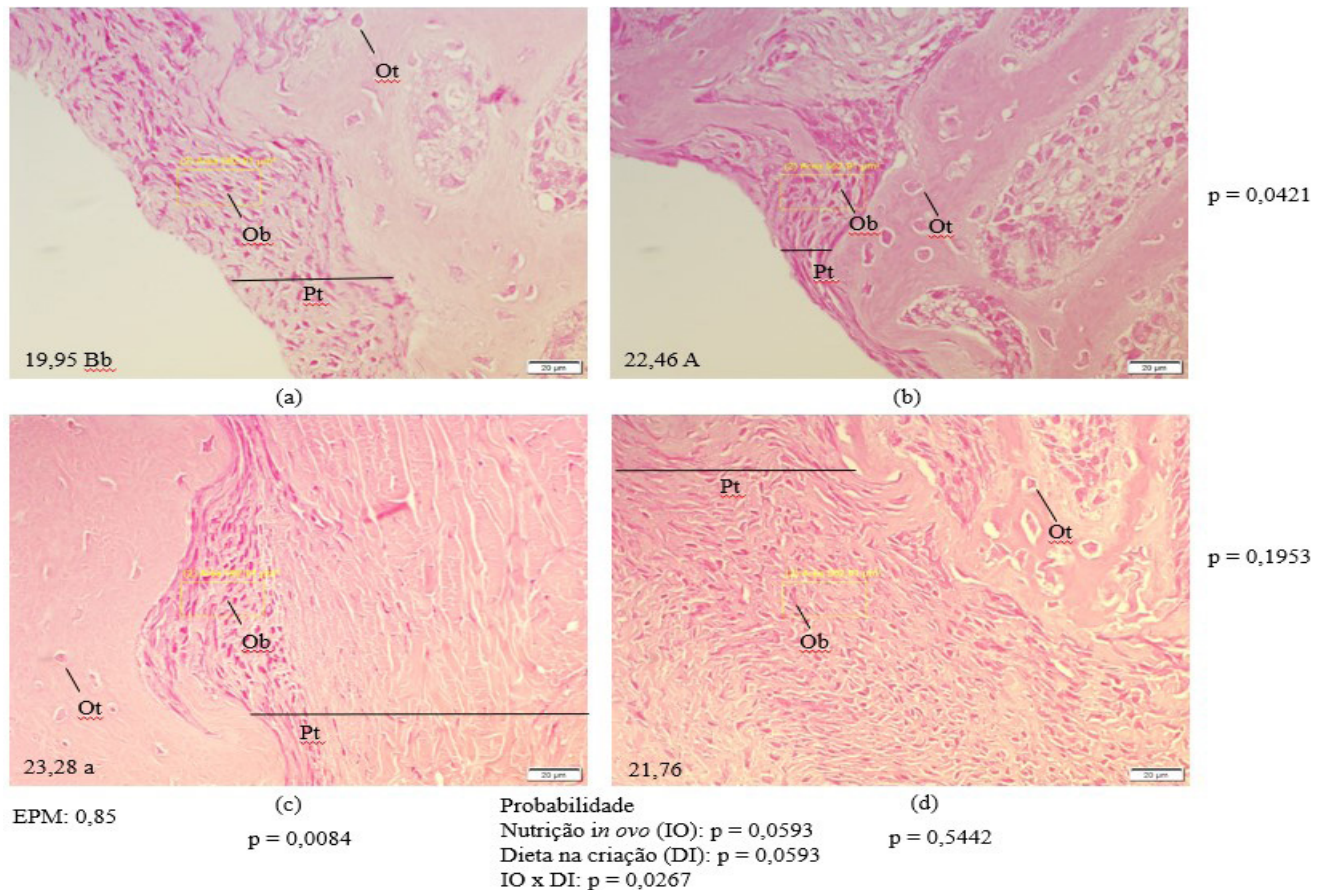
A adição de sulfatos de glucosamina condroitina e vitamina C não afetou o número de condrócitos na cartilagem ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2), nem o número de osteoblastos periosteais na diáfise tibial ( $P = 0,0203$ ) (Figura 1). O maior número de osteoblastos foi observado em frangos alimentados com 0,74 g de aditivo/kg de ração e sem aditivo *in ovo* ( $P = 0,0421$ ), assim como em frangos que receberam 4 µg de aditivo *in ovo* e sem aditivo na dieta ( $P < 0,0001$ ) (Figura 1).

**Tabela 2.** Efeitos da nutrição *in ovo* e na dieta, com sulfatos de condroitina e glucosamina e vitamina C na espessura da diáfise tibial, no número de osteócitos na diáfise tibial e no número de condrócitos na cartilagem de frangos de corte aos 43 dias de idade.

		Efeito <i>in ovo</i> (IO)		Efeito dieta (DI)		Probabilidade (P)			
		0 g/kg	0,74 <sup>2</sup> g/kg	P	Média	EPM <sup>3</sup>	IO	DI	IO x DI
Espessura da diáfise (µm)	Ovo não injetado	1.710,46	1.737,55a	0,8072	1.726,72	306,09	0,0593	0,0593	0,0267
	4 µg de aditivo <sup>1</sup>			0,0027	1.589,17				
	P	0,8034	0,0034						
	Média	1.727,39	1.580,93						
Número de osteócitos (15.05 mm <sup>2</sup> )	Ovo não injetado	4,86	4,73a	0,6047	4,79	0,23	<,0001	0,0108	0,0484
	4 µg de aditivo <sup>1</sup>	4,41A	3,58Bb	0,0023	4,02				
	P	0,0863	<0,0001						
	Média	4,62	4,19						
Número de condrócitos (869 mm <sup>2</sup> )	Ovo não injetado	663,91	667,91	0,7944	665,91	9,84	0,7980	0,9348	0,7605
	4 µg de aditivo <sup>1</sup>	669,71	667,40	0,8678	668,56				
	P	0,6919	0,9724						
	Média	667,10	667,63						

A-B; a-b: As médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas linhas ou letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente (P<0,05). 1 4 µg do aditivo: 1,2 µg de sulfato de condroitina, 1,2 µg de sulfato de glucosamina e 0,2 µg de vitamina C. 2 Para cada 100 kg de ração foram usados 30 g de sulfato de glucosamina, 24 g de sulfato de condroitina e 20 g de vitamina C. 3 EPM: erro padrão da média. EPM: erro padrão da média. IO: Efeito da nutrição *in ovo*. DI: Efeito da dieta. IO x DI: Interação entre nutrição *in ovo* e na dieta.





**Figura 1.** Efeito da nutrição *in ovo* e na dieta com sulfatos de condroitina e glucosamina e vitamina C, na quantidade de osteoblastos na diáfise tibial de frangos de corte aos 43 dias de idade. (a)-(d) Micrografias de luz da diáfise tibial de frangos de corte. (a) Nutrição *in ovo* com 0 µg do aditivo e inclusão de 0 g de aditivo/kg de ração na dieta dos frangos durante a criação; (b) Nutrição *in ovo* com 0 µg do aditivo e inclusão de 0,74 g de aditivo/kg de ração na dieta dos frangos durante a criação; (c) Nutrição *in ovo* com 4 µg do aditivo e inclusão de 0 g de aditivo/kg de ração na dieta dos frangos durante a criação; (d) Alimentação *in ovo* com 4 µg do aditivo e inclusão de 0,74 g de aditivo/kg de ração na dieta dos frangos durante a criação. Ot: osteócitos; Ob: osteoblastos; Pt: perióstio. EPM: erro padrão médio. Barra de escala: 20 µm. A-B; a-b: médias seguidas por letras maiúsculas diferentes para alimentação *in ovo* ou letras minúsculas para nutrição da ração diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

A nutrição *in ovo* e na dieta, com sulfatos de condroitina e glucosamina e vitamina C, foi avaliada quanto à sua capacidade de promover alterações histológicas no desenvolvimento ósseo e cartilaginoso após a eclosão, e, pela primeira vez, este estudo revelou os efeitos dos GAGs no número de osteoblastos e na espessura da diáfise dos frangos de corte. De acordo com o presente estudo, a inclusão de GAGs e vitamina C na ração de frangos de corte promoveu, eficientemente, o aumento da espessura da diáfise e do número de osteoblastos e osteócitos no perióstio da diáfise tibial quando usados apenas *in ovo* ou na dieta das aves. Isso pode beneficiar o desenvolvimento ósseo e cartilaginoso dos frangos de corte, como verificado por Santos *et al.*<sup>(9)</sup>, e pode representar uma solução para problemas ósseos em frangos de corte.

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese e secreção dos constituintes da matriz orgânica do tecido ósseo<sup>(26)</sup>. Eles participam do processo de mineralização óssea por meio da secreção de vesículas ricas em fosfatase alcalina, que atuam na clivagem do pirofosfato e removem sua influência estabilizadora. Além disso, eles aumentam a concentração local de fosfato por meio da ação sobre o monofosfato de hexose, um produto derivado da quebra do glicogênio, promovendo a mineralização óssea<sup>(26)</sup>.



Os osteoblastos participam indiretamente do processo de reabsorção óssea ao secretar citocinas, que os estimulam<sup>(27)</sup>. Os osteócitos são as células mais abundantes no osso, e são osteoblastos maduros encontrados dentro da matriz óssea. São responsáveis pela manutenção da matriz óssea, pois podem sintetizá-la e reabsorvê-la conforme as necessidades fisiológicas do animal, mas de forma limitada<sup>(28)</sup>. Portanto, o papel fisiológico dos osteoblastos, especialmente dos osteócitos, é importante para a regulação estrutural e biomecânica da massa do tecido ósseo<sup>(29)</sup>. O aumento dessas células, por meio da suplementação exógena com GAGs e vitamina C, contribui para a inibição de problemas locomotores em frangos de corte, como foi verificado anteriormente por Martins *et al.*<sup>(12)</sup>.

Santos *et al.*<sup>(9)</sup> também relataram um aumento no número de osteócitos na diáfise tibial de frangos de corte suplementados com sulfatos de condroitina e glucosamina mais vitamina C. De acordo com os autores, os sulfatos de condroitina e glucosamina provavelmente estimularam a ossificação do tecido endocondral, o que levou ao aumento no número de osteócitos na placa de crescimento. Em relação à ossificação endocondral, Wolff<sup>(30)</sup> relatou que a combinação de sulfato de glucosamina com sulfato de condroitina levou ao aumento na proliferação celular em ratos ovariectomizados, demonstrando que a placa de crescimento da epífise tibial promoveu o crescimento longitudinal do osso após a administração dos GAGs.

De acordo com Choi *et al.*<sup>(31)</sup>, a vitamina C promove a formação de osteoblastos e bloqueia a osteoclastogênese por meio da ativação da sinalização da família MMTV do tipo wingless/ $\beta$ -catenina/fator de transcrição ativador 4. Isso é alcançado por meio das vias de sinalização da quinase de serina/treonina e das vias da proteína quinase ativada por mitógenos. De acordo com Tat *et al.*<sup>(32)</sup>, os GAGs são compostos que modulam a expressão de osteoprotegerina (OPG) e do receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL) – os dois principais fatores envolvidos no processo de remodelação óssea. O aumento da expressão de OPG e a diminuição da expressão de RANKL aumentam a razão entre os mRNA de OPG/RANKL, com efeito protetor sobre a perda óssea. Portanto, um maior número de osteoblastos e maior espessura da diáfise pode contribuir significativamente para a formação de ossos longos em frangos de corte, favorecendo assim a locomoção das aves, como foi observado pela primeira vez na literatura<sup>(7)</sup>.

Essa melhoria no desenvolvimento da tíbia pode ter sido promovida pela adição do produto, levando a uma melhor locomoção, como encontrado por Martins *et al.*<sup>(12)</sup>, que estudaram o uso de sulfatos de condroitina e glucosamina na prevenção de problemas locomotores em frangos de corte e relataram uma redução na frequência de frangos com degeneração femoral, discondroplasia tibial e desvios valgo e varo, além de melhoria no escore de marcha.

## 5. Conclusão

A nutrição *in ovo* ou suplementação dietética durante a criação de frangos de corte com glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina e sulfato de glucosamina) e vitamina C beneficia o desenvolvimento ósseo e cartilaginoso.

### Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

### Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

## Contribuições do autor

Conceitualização: Julyana Machado da Silva Martins, Elaine Talita Santos e Lizandra Amoroso. Curadoria de dados: Elaine Talita Santos, Sarah Sgavioli e Jean Kaique Valentim. Análise formal: Arthur Zuanetti Curti e Sarah Sgavioli. Aquisição de financiamento: Lizandra Amoroso, Julyana Machado da Silva Martins e Elaine Talita Santos. Investigação: Arthur Zuanetti Curti. Metodologia: Elaine Talita Santos e Lizandra Amoroso. Administração do projeto: Sarah Sgavioli. Supervisão: Elaine Talita Santos e Sarah Sgavioli. Redação (rascunho original): Arthur Zuanetti Curti, Elaine Talita Santos e Sarah Sgavioli. Redação (revisão e edição): Sarah Sgavioli, Lizandra Amoroso e Jean Kaique Valentim.

## Referências

1. Guevara-Torres BL, Landin-Grandvallet LA, Tirado-Madrid A, Villagómez-Cortés JA. Comparison of locomotion problems and its economic impact on Cobb and Ross broiler strains. *Veterinary Science Research*. 2021; 3:1–6. DOI: <https://journals.bilpubgroup.com/index.php/vsr/article/view/4126>
2. Santos MN, Widowski TM, Kiarie EG, Guerin MT, Edwards AM, Torrey S. In pursuit of a better broiler: walking ability and incidence of contact dermatitis in conventional and slower growing strains of broiler chickens. *Poultry Science*. 2022; 101:1-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101768>
3. Wilcox CH, Sandilands V, Mayasari N, Asmara IY, Anang A. A literature review of broiler chicken welfare, husbandry, and assessment. *World's Poultry Science Journal*. 2024; 80:3–32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00439339.2023.2264824>
4. Nicol CJ, Abeyesinghe SM, Chang YM. An analysis of the welfare of fast-growing and slower-growing strains of broiler chicken. *Frontiers in Animal Science*. 2024; 5:1-21. DOI: <https://doi.org/10.3389/fanim.2024.1374609>
5. Granquist EG, Vasdal G, De Jong IC, Moe RO. Lameness and its relationship with health and production measures in broiler chickens. *Animal*. 2019; 13:2365–2372. DOI: <https://doi.org/10.1017/s1751731119000466>
6. Yang X, Zhao Y, Gan H, Hawkins S, Eckelkamp L, Prado M, Tabler T. Modeling gait score of broiler chicken via production and behavioral data. *Animal*. 2023; 17:1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100692>
7. Sgavioli S, Santos ET, Borges LL, Andrade-Garcia GM, Castiblanco DM, Almeida VR, Baraldi-Artoni SM. Effect of the addition of glycosaminoglycans on bone and cartilaginous development of broiler chickens. *Poultry Science*. 2017; 96:4017–4025. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pex228>
8. Santos ET, Sgavioli S, Castiblanco DMC, Domingues CHDF, Quadros TCO, Borges LL, Baraldi-Artoni SM. Glycosaminoglycans and vitamin C *in ovo* feeding affects bone characteristics of chicks. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2018; 47:1-6. DOI: <https://doi.org/10.1590/rbz4720170304>
9. Santos ET, Sgavioli S, Castiblanco DM, Borges LL, de Quadros TC, de Laurentiz AC, Baraldi-Artoni SM. Glycosaminoglycans and vitamin C affect broiler bone parameters. *Poultry Science*. 2019; 98:4694–4704. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez177>
10. Martins JM, dos Santos Neto LD, Sgavioli S, Araújo IC, Reis AA, Santos RS, Café MB. Effect of glycosaminoglycans on the structure and composition of articular cartilage and bone of broilers. *Poultry Science*. 2023; 102:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102916>
11. Martins JMS, Santos Neto LDD, Gomides LPS, Fernandes EDS, Sgavioli S, Stringhini JH, Café MB. Performance, nutrient digestibility, and intestinal histomorphometry of broilers fed diet supplemented with chondroitin and glucosamine sulfates. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2020; 49:1-10. DOI: <https://doi.org/10.37496/rbz4920190248>
12. Martins JM, dos Santos Neto LD, Noletto-Mendonça RA, de Carvalho GB, Sgavioli S, de Carvalho FB, Café MB. Dietary supplementation with glycosaminoglycans reduces locomotor problems in broiler chickens. *Poultry Science*. 2020; 99:6974–6982. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.061>
13. Maxwell LK, Regier P, Achanta S. Comparison of glucosamine absorption after administration of oral liquid, chewable, and tablet formulations to dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2016; 52:90–94. DOI: <https://doi.org/10.5326/jaaha-ms-6267>
14. Kantor ED, Lampe JW, Navarro SL, Song X, Milne GL, White E. Associations between glucosamine and chondroitin supplement use and biomarkers of systemic inflammation. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2014; 20:479–485. DOI: <https://doi.org/10.1089/acm.2013.0323>
15. Goel A. Heat stress management in poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2021; 105:1136–1145. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.13496>

16. Del Barrio AS, Mansilla WD, Navarro-Villa A, Mica JH, Smeets JH, Den Hartog LA, García-Ruiz AI. Effect of mineral and vitamin C mix on growth performance and blood corticosterone concentrations in heat-stressed broilers. *Journal of Applied Poultry Research*. 2020; 29:23–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.11.001>
17. Van Hieu T, Guntoro B, Qui NH, Quyen NTK, Al Hafiz FA. The application of ascorbic acid as a therapeutic feed additive to boost immunity and antioxidant activity of poultry in heat stress environment. *Veterinary World*. 2022; 15:685–693. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.685-693>
18. Araújo IC, Café MB, Noletto RA, Martins JM, Ulhoa CJ, Guareshi GC, Leandro NS. Effect of vitamin E *in ovo* feeding to broiler embryos on hatchability, chick quality, oxidative state, and performance. *Poultry Science*. 2019; 98:3652–3661. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pey439>
19. Peebles ED. *In ovo* applications in poultry: a review. *Poultry Science*. 2018; 97:2322–2338. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pey081>
20. Shim MY, Pesti GM. Effects of incubation temperature on the bone development of broilers. *The Journal of Poultry Science*. 2011; 90:1867–1877. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01242>
21. Ferreira IB, Junior JM, Sgavioli S, Vicentini TI, Morita VS, Boleli IC. Vitamin C prevents the effects of high rearing temperatures on the quality of broiler thigh meat. *Poultry Science*. 2015; 94:841–851. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pev058>
22. Sgavioli S, Borges LL, de Almeida VR, Thimotheo M, de Oliveira JA, Boleli IC. Egg injection of ascorbic acid stimulates leucocytosis and cell proliferation in the bursa of Fabricius. *International Journal of Poultry Science*. 2013; 12:464–472. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/ijps.2013.464.472>
23. Cobb-Vantress. Manual de manejo de frangos de corte. 2008. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/avicultura/files/2012/04/Cobb-Manual-Frango-Corte-BR.pdf>
24. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RD, Lopes DC, Euclides RF. Composição de alimentos e critérios nutricionais. Tabelas brasileiras para aves e suínos, 2ª edição. UFV, Viçosa, MG, 2011.
25. SAS Institute. SAS/STAT user's guide: statistics. Version 9.2. Cary (NC): SAS Institute Inc.; 2002.
26. Pizauro Junior JM, Ciancaglini P, Macari M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 2002; 4:169–186. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2002000300001>
27. Duplomb L, Dagouassat M, Jourdon P, Heymann D. Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem Cells*. 2007; 25:544–552. DOI: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0395>
28. Pizauro Júnior JM, Santos L, Gonçalves A. Estrutura e função do tecido ósseo. In: *Fisiologia das aves comerciais*. Jaboticabal: FUNEP; 2017.
29. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*. 2015; 2015:1–17. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
30. Wolff RB. Glucosamine and chondroitin sulfate association increases tibial epiphyseal growth plate proliferation and bone formation in ovariectomized rats. *Clinics*. 2014; 69:847–853. DOI: [https://doi.org/10.6061/clinics/2014\(12\)10](https://doi.org/10.6061/clinics/2014(12)10)
31. Choi HK, Kim GJ, Yoo HS, Song DH, Chung KH, Lee KJ, Koo YT, An JH. Vitamin C activates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis via Wnt/ $\beta$ -Catenin/ATF4 signaling pathways. *Nutrients*. 2019; 11:1–20. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11030506>
32. Tat SK, Pelletier JP, Vergés J, Lajeunesse D, Montell E, Fahmi H, Martel-Pelletier J. Chondroitin and glucosamine sulfate in combination decrease the pro-resorptive properties of human osteoarthritis subchondral bone osteoblasts: a basic science study. *Arthritis Research & Therapy*. 2007; 9:1–10. DOI: <https://doi.org/10.1186/ar2325>