

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONSERVAÇÃO DA FAUNA

FERNANDA JUNQUEIRA VAZ GUIDA

**DESCRIÇÃO DOS DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DE AVES DAS ORDENS ANSERIFORMES,
GALLIFORMES E PSITTACIFORMES E SUA APLICAÇÃO NO
EMBRIODIAGNÓSTICO DE ESPÉCIES SELVAGENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna para obtenção do título de mestre profissional em Conservação da Fauna.

Orientação: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

São Carlos
2018

FERNANDA JUNQUEIRA VAZ GUIDA

**DESCRIÇÃO DOS DIFERENTES ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DE AVES DAS ORDENS ANSERIFORMES,
GALLIFORMES E PSITTACIFORMES E SUA APLICAÇÃO NO
EMBRIODIAGNÓSTICO DE ESPÉCIES SELVAGENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, para obtenção do título de mestre profissional em Conservação da Fauna. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 29 de março de 2018.

Orientador

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira
Universidade de São Paulo

Examinador

Prof. Dr. Luís Fabio Silveira
Universidade de São Paulo

Examinador

Prof. Dr. José Maurício Mauricio Barbanti Duarte
Universidade Estadual Paulista

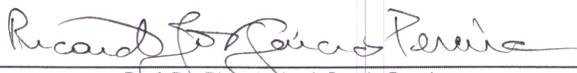


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

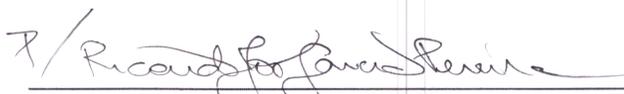
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda Junqueira Vaz Guida, realizada em 29/03/2018:



Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira
USP

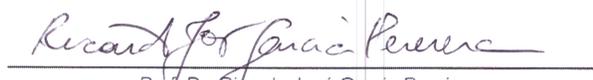
7/ 

Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
UNESP



Prof. Dr. Luís Fábio Silveira
USP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) José Maurício Barbanti Duarte e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.



Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

*As aves que participaram deste experimento.....
meu respeito e eterna gratidão, seja pelo fornecimento dos ovos fundamentais para a pesquisa,
quanto aos embriões que cederam suas vidas na certeza de que contribuirão significativamente
para o aprimoramento das técnicas de incubação artificial em prol da conservação.*

Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira por todo ensinamento ao longo destes anos e por me fazer acreditar que tudo daria certo mesmo com as dificuldades encontradas no meio do caminho.

Ao Dr. João Cruz, diretor técnico científico da FPZSP por ser o maior incentivador ao meu ingresso no PPGCFau.

À minha chefe Ana Maria Beresca pelo apoio de sempre e por ter me liberado do Zoológico para realizar as disciplinas e a parte prática do experimento.

À minha equipe do Setor de Aves, Zé Roberto, Mesquita, Maria, Tânia, Rodrigo, Keity, Beth, Marcos, Niedja, Denise, Andrea, Jaciaria, aprimorandos e principalmente ao Anselmo e Angélica por me ajudarem a monitorar e retirar os ovos de cisne. Não posso deixar de agradecer aos queridos Cecília Gregório, Regiane Paiva e Estanislau que sempre tocaram as atividades do setor com muita dedicação, principalmente pelos muitos dias que estive ausente.

Aos colaboradores do Zoo Safari (em especial ao Ariel) que me enviaram os ovos de pavão.

Ao MV Maurício Durante Chistofolletti por me fornecer todos os ovos de calopsita sempre com muita dedicação e cuidado e que foram fundamentais para a realização deste mestrado.

Aos amigos do laboratório GEMA (Grupo de Estudo para Multiplicação de Aves) do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, em especial ao Bruno Rogério Rui que sempre me ajudou em todas as ocasiões.

Aos meus colegas de turma Claudia Berbert, Karen Bertoldo, Marcos Melo, Mariano Maudet, Olivaldi Azevedo, Pietra Micheletti, Tatiane Rech pelas risadas, companheirismo e por dividir as angústias e dificuldades de ter que fazer um mestrado junto com um emprego. Em

especial à minha amiga Cybele Sabino Lisboa por tudo citado acima, além da companhia em tantas viagens desde o dia da prova de ingresso ao mestrado e pelo auxílio sempre que precisei.

À minha amiga Michele Viana Katayama pela grande ajuda na confecção dos gráficos mas principalmente pela amizade de sempre.

Ao Fabrício Rassy por me ensinar, com muito profissionalismo, como realizar a sobredosagem anestésica nos embriões evitando qualquer sofrimento.

À Paula Andrea, por ter aberto o Laboratório de Reprodução Animal para que eu colocasse as chocadeiras, pela ajuda durante a incubação dos ovos e pelos momentos alegres que passamos ao longo dos anos.

À Tânia Vaz e Claudia Berbert por terem aberto as portas das suas casas para que eu ficasse durante as disciplinas em São Carlos e Araras.

Ao meu marido Paulo Eduardo e ao meu filho João Pedro por terem aguentado meu estresse durante estes anos, além das minhas ausências de casa por muitos dias.

Aos meus pais Fernando (*in memoriam*) e Regina por me fornecerem uma base sólida para que eu pudesse construir minha carreira profissional.

Enfim, agradeço ao Dr. Paulo Magalhães Bressan, em nome da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, por todo apoio durante a realização do mestrado e pela liberação das minhas atividades no Setor de Aves para a realização das disciplinas e do experimento na USP.

RESUMO

Apesar da incubação artificial de ovos de aves selvagens ter progredido nas últimas décadas, essa ferramenta mostra-se ainda rudimentar quando comparada a tecnologia aplicada na indústria avícola, que apresentou avanços consideráveis a fim de maximizar a eclodibilidade dos ovos. Em espécies silvestres, parâmetros como temperatura e umidade da incubadora são muitas vezes determinados por tentativa e erro, levando em consideração apenas a taxa de eclosão dos ovos incubados. Neste sentido, as informações geradas pelo embriodiagnóstico são de grande valia na incubação de ovos não convencionais por oferecem um maior detalhamento sobre as causas de falha de nascimento (p.e. infertilidade, transporte, estocagem, idade e nutrição dos reprodutores, etc.). Assim, o presente estudo teve como objetivo descrever os diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de representantes das ordens Anseriformes, Galliformes e Psittaciformes das espécies *Cygnus atratus*, *Pavo cristatus* e *Nymphicus hollandicus*, respectivamente. Os ovos foram incubados à uma temperatura e umidade padrão para cada espécie e, para descrever o desenvolvimento, os embriões com menos de 50% do período de incubação foram eutanasiados por hipotermia e acima deste período, por sobredosagem anestésica utilizando o líquido anestésico inalante Halotano 100%. No total foram incubados 238 ovos, mas, devido aos óbitos naturais ocorridos durante o processo de incubação, 67 embriões foram descritos até o momento, sendo priorizado os dois terços finais do período de incubação. Devido à dificuldade na aquisição de ovos viáveis e pelo número reduzido de embriões por dia de incubação, o quadro de desenvolvimento apresentou lacunas, portanto a pesquisa terá continuidade. Acreditamos que a continuidade deste estudo fornecerá subsídios para o aperfeiçoamento das técnicas de incubação artificial de ovos, instrumento hoje indispensável em programas de conservação de diversas espécies de aves selvagens

Palavras-chave: ovos, incubação, desenvolvimento embrionário, aves silvestres

ABSTRACT

Although the artificial incubation of wild-bird eggs has progressed in the last decades, this tool is still rudimentary when compared to the technology applied in the poultry industry, which presented considerable advances in order to maximize eggs hatchability. To wild species, parameters such as temperature and humidity of the incubator are often determined by trial and error, taking into account only the hatching rate of the incubated eggs. In this sense, the information generated by embryodiagnosis is of great value in the incubation of unconventional eggs because they offer a greater detail on the causes of birth failure (egg infertility, transport, storage, age and reproductive nutrition, etc.). Thus, the present study aimed to describe the different stages of the embryonic development of representatives of the Anseriformes, Galliformes and Psittaciformes orders of the species *Cygnus atratus*, *Pavo cristatus* and *Nymphicus hollandicus*, respectively. The eggs were incubated at a standard temperature and humidity for each species and, to describe the development, embryos with less than 50% of the incubation period were euthanized by hypotemia and, above this period, by anesthetic overdose using the Halothane 100% inhalant liquid. In total, 238 eggs were incubated, but due to the natural deaths during the incubation process, 67 embryos were described so far, with the final two thirds of the incubation period prioritized. Due to the difficulty in acquiring viable eggs and the reduced number of embryos per day of incubation, the development picture presented gaps, so the research will continue. We believe the continuity of this study will provide subsidies for the improvement of techniques of artificial incubation of eggs, an indispensable instrument in programs of conservation of several species of wild birds.

Keywords: eggs, incubation, embryonic development, wild birds

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Material e Métodos	7
2.1. Espécies selecionadas e local do experimento	7
2.2. Descrição do desenvolvimento embrionário.....	8
3. Resultados	12
3.1. Caracterização do desenvolvimento embrionário <i>Cygnus atratus</i>	12
3.2. Caracterização do desenvolvimento embrionário <i>Pavo cristatus</i>	20
3.3. Caracterização do desenvolvimento embrionário <i>Nymphicus hollandicus</i>	25
3.4. Características externas dos ovos.....	33
3.5. Embriodiagnóstico dos ovos não viáveis.....	35
4. Discussão.....	39
5. Conclusões.....	45
6. Referências bibliográficas.....	46
Apêndice.....	50

1. Introdução

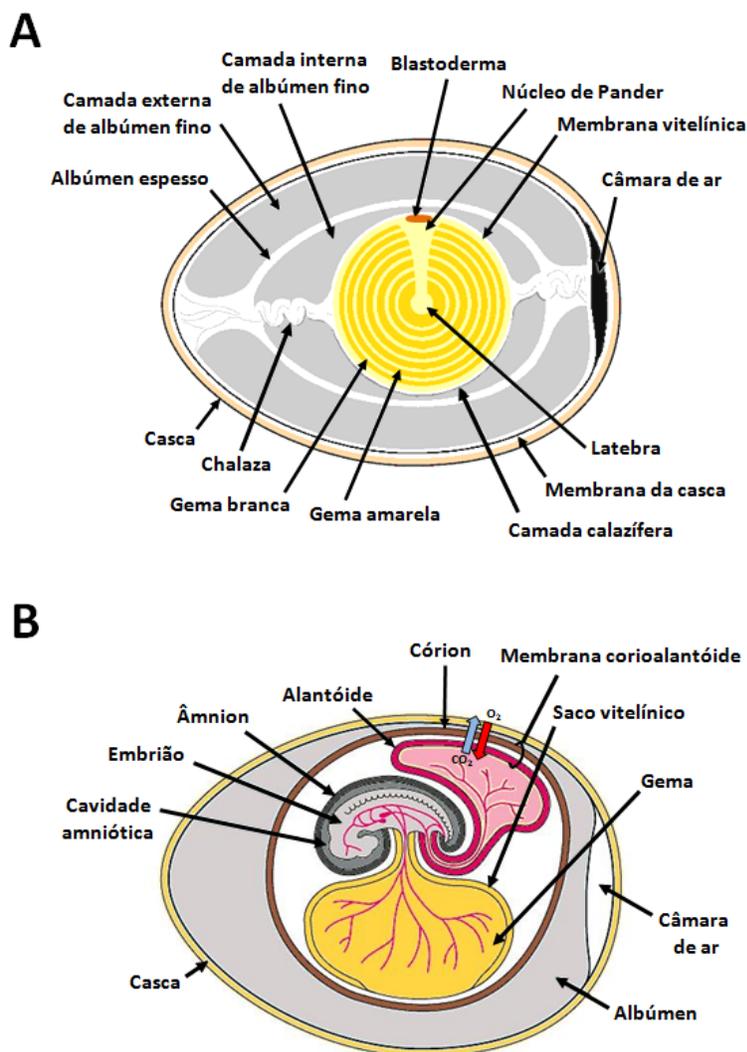
A composição inicial dos ovos das aves varia entre diferentes espécies e está relacionada ao grau de maturidade dos filhotes, que podem ser divididos em quatro categorias: precocial (indivíduo que nasce mais maduro e pode andar, nadar e/ou mergulhar logo após a eclosão); semiprecocial, semialtricial e altricial (indivíduos que nascem menos maduros, sem penas, com olhos fechados e são incapazes de se locomover) (TAZAWA & WHITTOW, 1999). O tamanho da gema em ovos de espécies precociais é maior do que em altriciais, pois estas necessitam de mais energia para se desenvolver. Portanto, espécies precociais possuem ovos ricos em energia e pobres em água, enquanto os das espécies altriciais são ricos em água e pobres em energia. (TAZAWA & WHITTOW, 1999). O ovo recém-formado possui todos os componentes necessários para que o embrião se desenvolva, exceto o oxigênio e o calor (TAZAWA & WHITTOW, 1999; PEREIRA, 2014). O oxigênio é difundido pelos poros existentes na casca do ovo que também permitem a perda de água pela evaporação; já o calor é fornecido pelos pais no momento da incubação, sendo fundamental para o desenvolvimento embrionário e para a formação de um microclima do ovo (TAZAWA & WHITTOW, 1999; PEREIRA, 2014).

As estruturas básicas do ovo são o blastodisco, gema, chalaza, albumina, membrana da casca, casca e cutícula. O disco germinativo ou blastodico é um pequeno ponto circular, branco e opaco localizado na superfície da gema que carrega todo o código genético herdado dos pais. Após a fecundação o blastodisco é denominado blastoderma e passa a ser ocupado por embrião de 30.000 a 60.000 células logo após a oviposição. O mesmo passa a ser caracterizado por um ponto branco maior e mais uniforme circundado por um halo branco (ITO *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014). Pela análise da cor da gema pode-se diferenciar duas áreas: gema branca, rica

em proteína que nutre o embrião e gema amarela rica em lipídeos (ITO *et al.*, 2013). Além disso, a gema contém imunoglobulinas (IgG) que conferem imunidade materna ao filhote até tornarem-se imunocompetentes (JOYNER, 1994). O albúmen confere proteção física e inércia térmica ao conteúdo interno do ovo, além de ser a maior fonte de água e minerais para o embrião. A casca do ovo é formada no útero em aproximadamente 20 horas (em galinhas) e exerce várias funções como proteção contra invasão microbiana, condução de calor, respiração e transpiração através dos poros localizados na superfície (DEEMING, 2002; ITO *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014). As membranas da casca (interna e externa) são delgadas, flexíveis e compostas de colágeno, ovoqueratina e glicoproteína conectada por ponte de sulfeto e lisina. São semipermeáveis e permitem a passagem de gases e água. A membrana externa é mais espessa e a interna mais fina e estão separadas na área em que se forma a câmara de ar (ITO *et al.*, 2013). A cutícula é uma película de material transparente que cobre a superfície da casca e forma uma barreira de proteção contra invasão bacteriana e perda excessiva de água (EVERAERT & DECUYPERE, 2013). De acordo com DEEMING (2002) o desenvolvimento embrionário pode ser dividido em duas partes: a diferenciação e o crescimento. Durante a diferenciação são formadas a maioria das estruturas embrionárias e extra-embrionárias (12 primeiros dias de incubação em galinha), enquanto no crescimento o embrião aumenta de tamanho e os tecidos se desenvolvem até a ave estar pronta para eclodir (Fig.1). Hamburger & Hamilton (1951) descreveram os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário de galinha, *Gallus gallus* em 46 estágios em função de fatores externos, independentemente da idade cronológica e do tamanho do embrião. No período de incubação de galinha, o embrião passa por processos baseados na divisão e diferenciação celular, movimentos celulares e morte celular, que provocam, neste, grandes transformações ao

longo do tempo. Além dos fatores externos, os fatores intrínsecos internos interferem no seu desenvolvimento e a formação das estruturas embrionárias é o resultado da combinação destes dois fatores. Desta forma, o processo de incubação artificial deve ser cuidadoso já que estes fatores podem atuar no desenvolvimento do embrião e dependendo da fase da incubação os efeitos podem ser maiores ou menores (CESARIO, 2013).

Fig.1: (a) ovo antes da incubação (b) ovo com embrião



Fonte: PEREIRA, 2014

O embriodiagnóstico é um método investigação de problemas vinculados ao manejo e a incubação de ovos não eclodidos no final do período incubatório (PLANO & DI MATTE, 2013). Tal ferramenta permite não apenas o diagnóstico de infertilidade, como também a definição de falhas na manipulação dos ovos via observação do estágio de desenvolvimento em que embriões não nascidos se encontram (PLANO & DI MATTE, 2013). Desse modo, as informações obtidas por esse exame permitem a implementação de ações corretivas para reduzir as mortalidades embrionárias e, conseqüentemente, aumentar a eclodibilidade dos ovos (PLANO & DI MATTE, 2013; ARAÚJO & ALBINO, 2011). A análise embrionária é muito utilizada por empresas avícolas para diagnosticar as causas da baixa produtividade de pintinhos, geralmente ocasionada por erros de manejo nos matrizeiros e/ou incubatórios (ARAÚJO & ALBINO, 2011). Isso porque o número de filhotes é resultado do gerenciamento correto de toda cadeia produtiva, desde a sanidade dos lotes reprodutores e cuidados com ovos incubáveis, até a padronização das condições de transporte, estocagem e incubação nos incubatórios industriais (GONZALES, 2005).

Durante o embriodiagnóstico o ovo pode ser classificado quanto a sua fertilidade (infértil ou fértil) e sua fase de desenvolvimento (fases I, II e III correspondendo à mortalidade inicial, média e final, respectivamente) (PLANO & DI MATTE, 2013). O ovo infértil observa-se o blastodisco, ao passo que no ovo fértil ocorre à formação do blastoderma (PLANO & DI MATTE, 2013). A capacidade de diferenciar um embrião com morte inicial de um ovo não fertilizado é um pré-requisito para que se possa determinar se o problema é de fertilidade ou da incubação. É comum classificar um ovo como infértil quando na verdade houve a morte do embrião em seus estágios iniciais de desenvolvimento, visto que modificações sutis no polo do

ovo não podem ser visualizadas na ovoscopia (SELLIER *et al.*, 2006). No caso de aves domésticas, a fase I é considerada mortalidade embrionária precoce e ocorre do primeiro ao quarto dia de incubação. A fase II é considerada mortalidade embrionária intermediária e engloba embriões mortos do quinto ao décimo sétimo dia de incubação. Por fim, a fase III agrega os casos de mortalidade embrionária tardia, entre o décimo oitavo dia até a preparação para o nascimento (PLANO & DI MATTE, 2013).

A retirada de ovos para estimular novas posturas é prática comum, muito utilizada em zoológicos e criadouros, principalmente no exterior. Fazendo uso das técnicas de incubação artificial, é possível maximizar a quantidade de ovos e filhotes que um casal de aves consegue produzir durante a estação reprodutiva. No entanto, o sucesso da incubação artificial, traduzido pela taxa de eclodibilidade, é dependente de diversos fatores, tais como: idade, manejo e nutrição das aves reprodutoras, transporte e estocagem dos ovos, e condições de incubação (temperatura, umidade, viragem dos ovos, ventilação, etc.). Neste contexto, o estabelecimento das condições ideais de incubação em aves selvagens é regularmente realizado por tentativa e erro, não havendo uma cartilha detalhada que enumere os tipos de falhas e suas respectivas repercussões no desenvolvimento embrionário. Por essa razão, a determinação dos estágios de desenvolvimento embrionário atrelada ao embriodiagnóstico pode ser de grande contribuição na determinação de parâmetros de incubação em espécies desconhecidas (SAINT JALME, 1999).

A reprodução em cativeiro de espécies silvestres vem contribuindo para a conservação *ex situ*, servindo de complemento para as estratégias *in situ*. (FRANCISCO & SILVEIRA, 2013). De acordo com a IUCN, o número de espécies de aves criticamente em perigo no mundo aumentou significativamente desde 1996, passando de 168 para 213 (IUCN, 2014). No Brasil são

233 espécies de aves ameaçadas nas categorias criticamente em perigo, em perigo e vulnerável sendo que atualmente há apenas cinco programas de cativeiro coordenados pelo ICMBio. (MMA, 2014; ICMBio, 2014). Diante desse panorama atual, compreender aspectos sobre a incubação de aves silvestres torna-se uma ferramenta fundamental para programas de conservação (KAWASHIMA *et al*, 2005).

Assim, o presente estudo teve como objetivo categorizar morfológicamente os estágios de desenvolvimento embrionário de representantes das ordens Anseriformes (*Cygnus atratus*) e Galliformes (*Pavo cristatus*), consideradas precociais e Psittaciformes (*Nymphicus hollandicus*), considerada altricial, comparando com o desenvolvimento de *Gallus gallus*. Com isso, espera-se que os quadros descritivos de desenvolvimento possam ser empregados no embriodiagnóstico de ovos não eclodidos (incubados artificialmente ou não) provenientes de espécies dessas ordens, para verificar a aplicabilidade dos mesmos na rotina de zoológicos e/ou criadores e contribuir com o aprimoramento das técnicas de incubação artificial.

2. Material e Métodos

2.1. Espécies selecionadas e local do experimento

O projeto foi desenvolvido no laboratório de reprodução animal da Fundação Parque Zoológico de São Paulo e no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foi conduzido sob autorização SISBIO nº 51669-1 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) em 24 de novembro de 2016 (nº7160290616).

As espécies selecionadas para o estudo foram: cisne-preto, *Cygnus atratus*, pavão-azul ou pavão-branco, *Pavo cristatus*, espécies precociais pertencentes à população da Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e calopsita, *Nymphicus hollandicus*, espécie altricial proveniente de uma criação particular do MV Mauricio Durante Christofolletti. Os espécimes são bem representados na FPZSP e no criadouro particular, o que possibilitou uma coleta maior de ovos, além disso, são representantes das ordens Anseriformes, Galliformes e Psittaciformes, as quais possuem espécies ameaçadas de extinção com programas de reprodução em cativeiro.

Os ovos foram retirados preferencialmente no dia da postura, higienizados com álcool 70% e, quando necessário, armazenados por no máximo cinco dias em uma sala com temperatura controlada de aproximadamente 20° C para que o processo de incubação não se inicie. Foram numerados e medidos (comprimento de largura) e os dados de peso diário e outras observações foram anotados na ficha de controle (Apêndice I).

A incubação dos ovos de cisne-preto e pavão foi feita na chocadeira Premium Ecológica IP 130 a uma temperatura de 37,5°C e umidade de 55-65% e 38°C e umidade de 55%, respectivamente. Os ovos de calopsita foram incubados na Brinsea Octagon 20 Advanced

Incubator a uma temperatura de 37,2°C e umidade de 55%. Para verificar a fertilidade e o desenvolvimento durante a incubação, os ovos passaram por o processo de ovoscopia pelo menos duas vezes na semana utilizando o ovoscópio Lyon. Quando detectada a mortalidade ou a falta de desenvolvimento, os ovos passaram pelo embriodiagnóstico a fim de identificar infertilidade ou estimar o período em que o embrião veio a óbito.

2.2. Descrição do desenvolvimento embrionário

Para descrever o desenvolvimento, os embriões com mais de 50% de período de incubação foram eutanasiados no dia selecionado por sobredosagem anestésica, utilizando o líquido anestésico inalante Halotano 100% (1mL/mL). Com auxílio de uma pinça, foi feito um pequeno orifício no polo maior do ovo (local da câmara de ar) e inserido algodão embebido com Halotano. O ovo foi envolvido por papel filme e, após aproximadamente cinco minutos, os embriões vieram a óbito (Fig.2). Para garantir a morte embrionária, a quantidade de anestésico utilizada para cisne-preto, pavão e calopsita foi de aproximadamente 3ml, 1,5ml e 0,75ml, respectivamente. Embriões que estavam com menos de 50% do período de incubação foram eutanasiados por hipotermia, ou seja, mantidos em uma temperatura menor que 4°C por até 4 horas (AVMA, 2013; CFMV, 2013; *com.pess.* Fabricio Rassy).

Fig.2: (a) Orifício no polo maior. (b) Ovo com algodão embebido por anestésico envolto por plástico filme.



Fotos: Fernanda Vaz



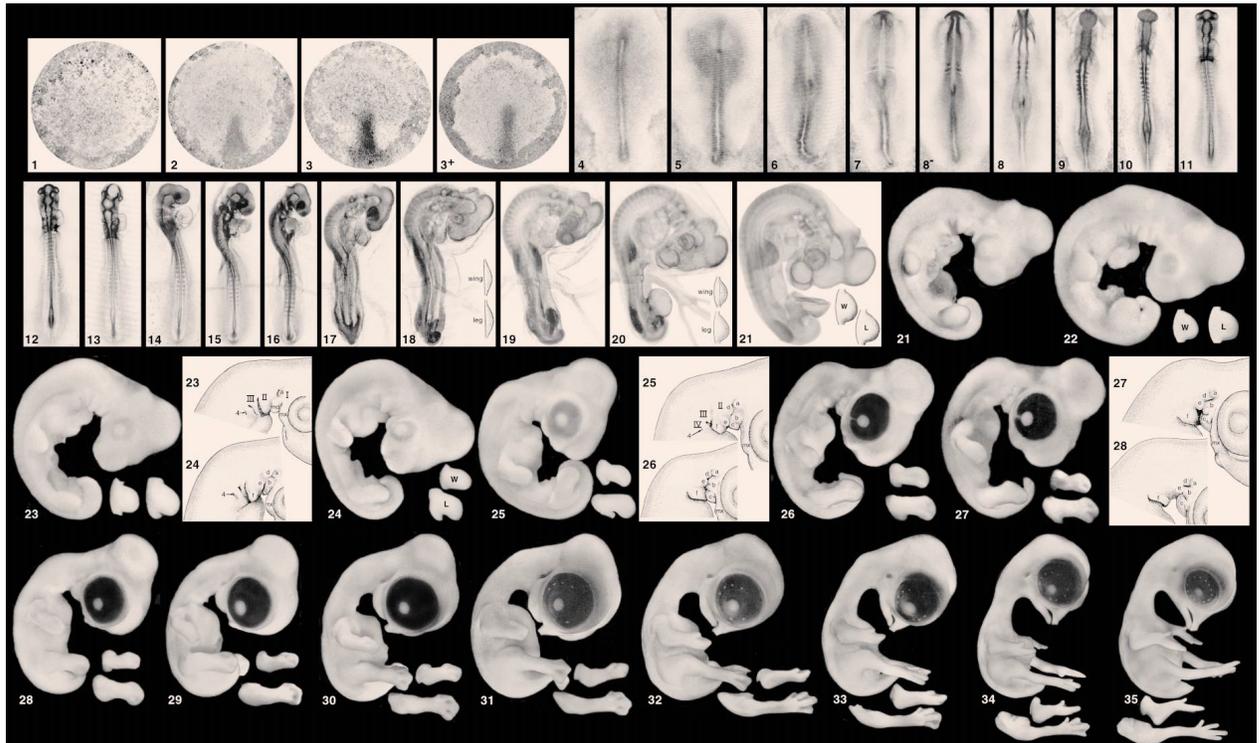
Como modelo para este estudo, foi utilizada a descrição das características embrionárias em relação aos dias de incubação segundo Hamburger & Hamilton (1951) com a adequação de Cesário (2013) (Tab. 1, Fig. 3) e foram levados em consideração apenas aspectos morfológicos externos. Os embriões foram fotografados antes de serem retirados do ovo para verificar o posicionamento em relação à câmara de ar e, em uma placa de Petri, para registrar os aspectos morfológicos como aparecimento de vasos sanguíneos, pigmentação dos olhos, desenvolvimento de membros anteriores e posteriores e aparição do bico. Posteriormente, em embriões com desenvolvimento mais adiantado (equivalente 8-21 dias em galinhas), outras referências morfológicas foram utilizadas para estimativa da fase de desenvolvimento embrionário, como por exemplo: aparecimento de estruturas externas como penas, unhas, dente do ovo, diferenças no posicionamento dos embriões, internalização de vísceras e/ou saco vitelínico, presença e/ou ausência de diferentes anexos fetais, presença de urato, bicagem da membrana interna e rompimento da casca. Embriões de *N. hollandicus* em fase inicial de incubação foram analisados por uma lupa Carl Zeiss Stemi 2000 com uma câmera Axiocam 105 color acoplada. As imagens foram registradas através do programa Zen 2.3 lite (Fig. 4)

Tabela1: Descrição das características embrionárias de *Gallus gallus* em relação aos dias de incubação, segundo Hamburger & Hamilton (1951)* com adequação de Cesário (2013).

Dias de incubação	*Estágio de desenvolvimento segundo H-H	Características embrionárias observadas
1	H-H 10	-Coração começa a pulsar -Evidenciam-se as vesículas ópticas e as placas auditivas
2	H-H 12-13	-Embrião do lado esquerdo repousando sobre o vitelo -Aparecimento dos primeiros sinais de âmnion
3	H-H 19	-Aparecimento do esboço da cauda e dos membros inferiores e superiores -Presença de âmnion e córion -Fluído amniótico envolve todo o embrião
4	H-H 23	- Embrião em forma de C -Início da formação da boca -Começa o aparecimento das fossas nasais

5	H-H 27	-Olho grande e preto -Esboços dos membros mais salientes -Sulcos entre os dedos estão presentes
6	H-H 29	-Bico proeminente -Asas e pernas começam a adquirir forma característica de ave -Asas com segundo dígito nitidamente maior que os outros
7	H-H 31	-Presença de membrana entre os dedos -Abdome se torna saliente -Coração dentro da cavidade torácica -Ouvidos visíveis
8	H-H 34	-Início da formação das penas -Asas e pernas completamente diferenciadas
9	H-H 35	-Bico e pigóstilo bem diferenciados -Embrião com característica própria da espécie - Membranas entre os dedos desaparecem
10	H-H 36	-Endurecimento do bico -Os poros da pele são visíveis a olho nu
11	H-H 37	-Cabeça proporcional ao tamanho do corpo -Corpo e pescoço com forma característica das aves -Corpo coberto por penugem fina -Almofadas da superfície plantar dos pés são visíveis -Garras dos dedos são achatadas lateralmente e curvadas
12	H-H 38	-Dedos completamente formados -Completa-se o empenamento -Está terminando a utilização do albúmen.
13	H-H 39	-Aparecimento de escamas e unhas -Aparecimento do dente do ovo -Cabeça move-se para a direita -Canal do conduto auditivo bem visível
14	H-H 40	-Cabeça vai em direção à câmara de ar
15	H-H 41	-Ocorre a penetração do intestino para o interior da cavidade abdominal
16	H-H 42	-Desaparecimento do albúmen -Escamas e bico firmes e cornificados -Corpo totalmente coberto por penas
17	H-H 43	-Cabeça entre os pés -Diminuição do líquido amniótico
18	H-H 44	-Crista visível -Indivíduo quase do tamanho normal à eclosão -Cabeça posicionada sob a asa direita
19	H-H 45	-Começa a penetração do saco vitelínico na cavidade abdominal -Indivíduo ocupa praticamente todo o ovo, exceto a câmara de ar
20	H-H 46	-Saco vitelínico está quase totalmente absorvido -Umbigo aberto -Membrana corioalantóide começa a secar tornando-se pegajosa -Indivíduo rompe o âmnion e começa a respirar por meio da câmara de ar -Pintinho em posição de eclosão e a respiração pulmonar começa
21	H-H 46	-Pintinho bica a casca para rompê-la -As penas secam e cicatriza-se o umbigo

Fig.3: Descrição do desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus*



Fonte: HAMBURGER & HAMILTON, 1951

Fig.4: Embrião de *N. hollandicus* sendo registrado através do programa Zen 2.3.lite pela lupa Carl Zeiss



Foto: Fernanda Vaz

3. Resultados

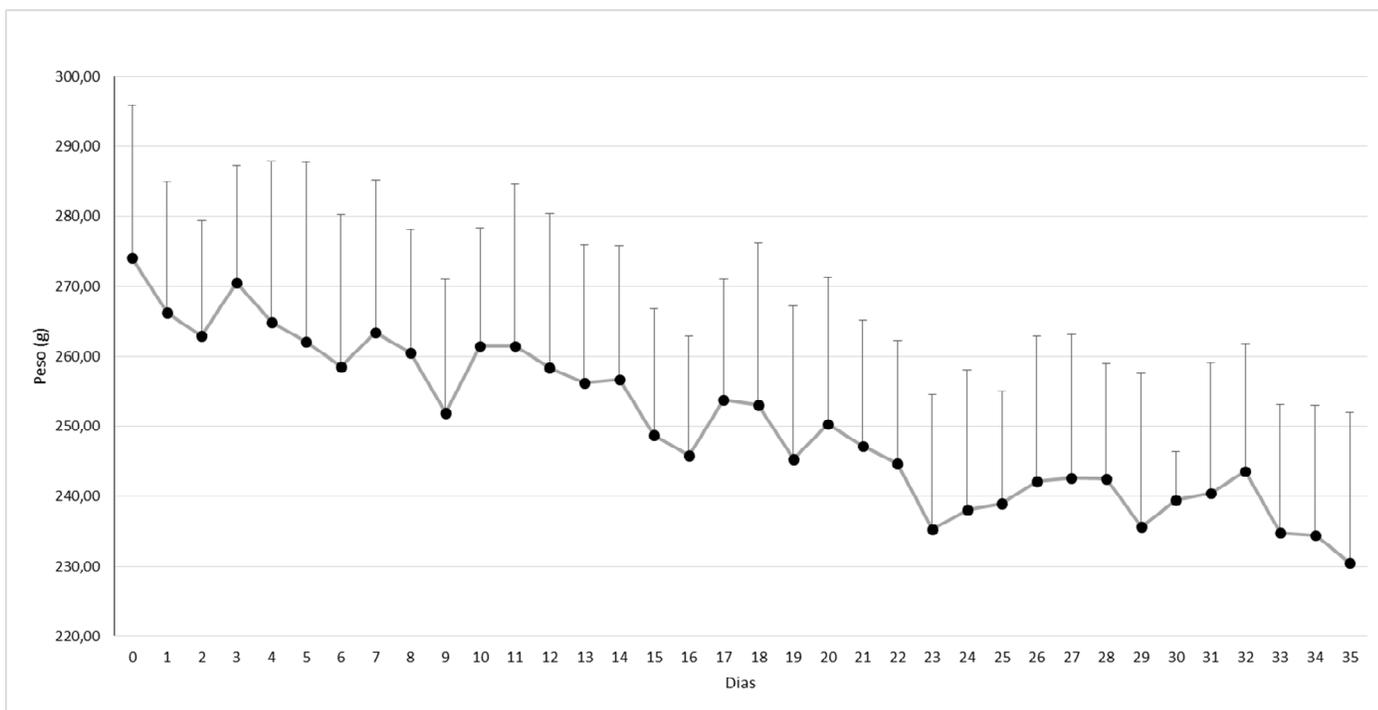
3.1. Cisne-preto, *Cygnus atratus*

No total foram incubados 71 ovos desta espécie sendo que 15 estavam inférteis e 56 férteis. Para a descrição do desenvolvimento foram utilizados 24 embriões, pois 31 vieram a óbito durante a incubação, sendo 11 com morte embrionária inicial até dez dias de incubação, 14 até vinte dias e 6 até trinta e seis dias. O desenvolvimento do embrião foi correlacionado com o descrito por *Gallus gallus* (HAMBURGER & HAMILTON, 1951) utilizando apenas as características morfológicas visuais de acordo com o dia de incubação. Além disso, foi calculada a perda de peso do ovo antes de iniciar o processo de incubação até o dia exato da abertura do ovo para a realização do embriodiagnóstico (Tabela 2). O gráfico da média de perda de peso diária de todos os ovos viáveis para o experimento mostrou uma diminuição do peso até o final da incubação, antes do nascimento (Fig. 5).

Tabela 2: Relação do período de incubação em que os ovos foram abertos, a correlação aproximada com a descrição feita por HAMBURGER & HAMILTON (1951)* de *Gallus gallus* e a quantidade de embriões descritos. O dia do nascimento (36) não está representado na tabela.

Dias de incubação	Estágio estimado H & H* (dia)	N
11	5-6	2
14	8-9	2
17	9-10	2
20	10-11	2
25	11-12	1
26	12	1
27	13	1
28	14-15	1
29	15	2
30	16	1
31	16	1
32	17	1
33	17	1
34	18	3
35	18-19	2

Fig.5: Relação da média de perda de peso dos ovos viáveis de *Cygnus atratus* por dia de incubação (n=24)



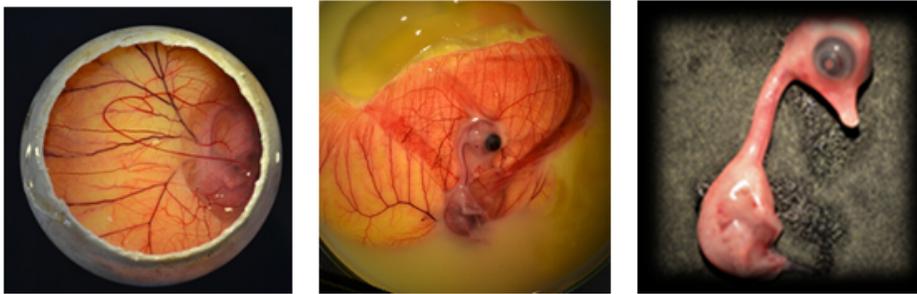
Devido ao número insuficiente de ovos viáveis, não foi possível fechar o quadro completo do desenvolvimento de *Cygnus atratus* e todas as características morfológicas, posicionamento dentro do ovo e detalhes do embrião foram descritas na figura 6.

Fig 6. Descrição do desenvolvimento embrionário de *C. atratus* com 11,14,17,20,25,26,30,31,32,33,34,35 e 36 dias de incubação.



Dia 11

- Bico superior maior que o inferior
- Bico e unhas ainda moles
- Presença de membranas interdigitais



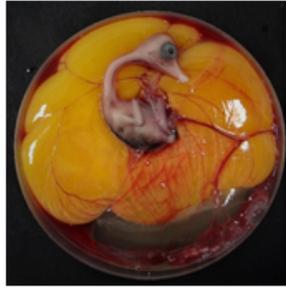
Dia 14

- Embrião começa a ter aparência de um anatideo
- Pescoço mais alongado
- Início da formação do dente do ovo
- Aparecimento de folículos na região caudal



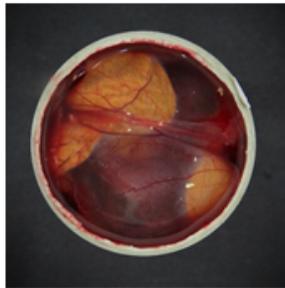
Dia 17

- Aparecimento de folículos na região dorsal
- Bico mais alongado



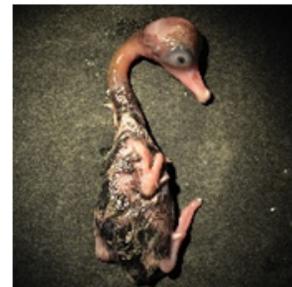
Dia 20

- Embrião posicionado no meio do saco vitelínico
- Foliculos por todo o corpo
- Presença de penugem na região dorsal
- Canal do conduto auditivo visível
- Intestino entrando na cavidade abdominal



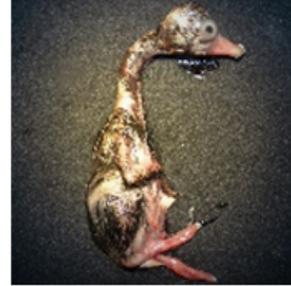
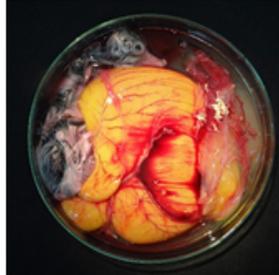
Dia 25

- Penas na região dorsal
- Penugem na região ventral, asas, pescoço e cabeça
- Cavidade nasal visível porem ainda fechada
- Crescimento sutil do dente do ovo
- Tamanho da cabeça proporcional ao tamanho do corpo



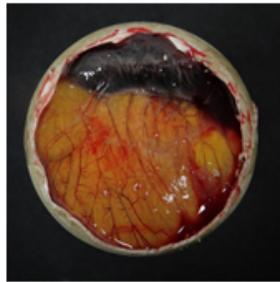
Dia 26

- Penas maiores no dorso e ventre
- Bico inferior e superior do mesmo tamanho
- Presença de urato em pequena quantidade



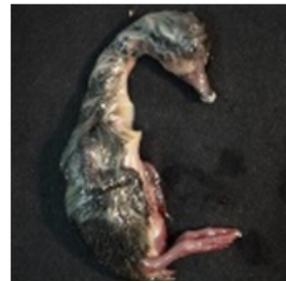
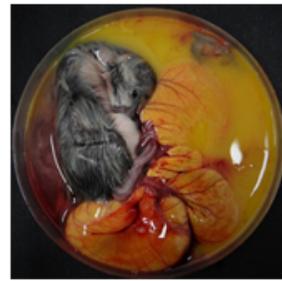
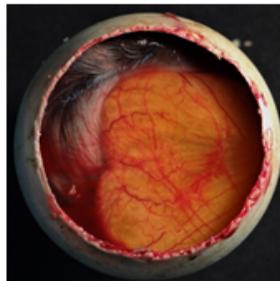
Dia 27

- Escurecimento da ponta do bico
- Corpo coberto por penas
- Presença de urato em pequena quantidade
- Alças intestinais ainda fora da cavidade abdominal



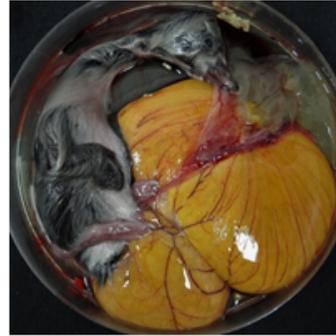
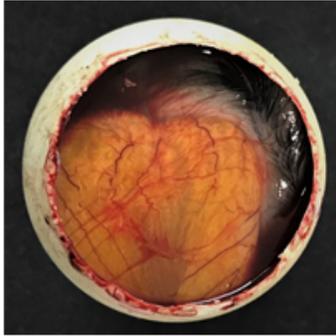
Dia 28

- Escurecimento do bico por completo
- Pálpebra inferior encontra com a superior
- Líquido amniótico mais reduzido
- Poucas alças intestinais fora da cavidade abdominal



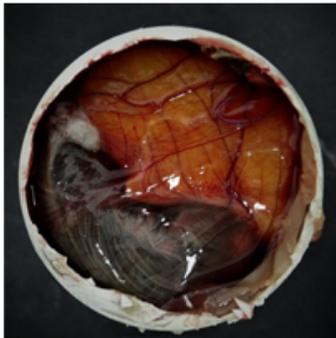
Dia 30

- Embrião com morfologia característica da espécie



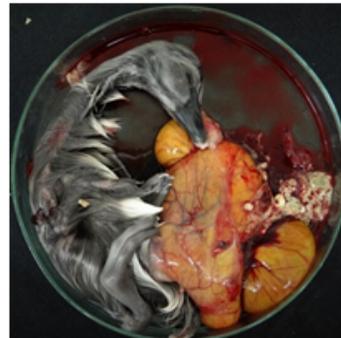
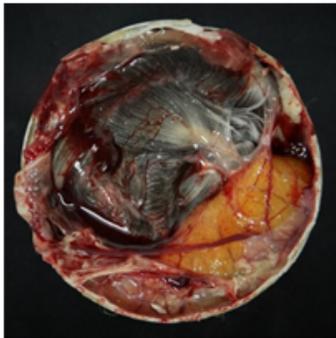
Dia 31

- Albúmen ainda não foi totalmente absorvido
- Líquido amniótico ainda presente



Dia 32

- Bico e unhas bem escuros
- Vitelo ocupando a metade do ovo



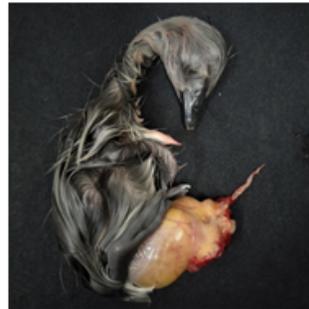
Dia 33

- Interiorização das alças intestinais dentro da cavidade abdominal
- Ausência de líquido amniótico
- Crescimento da câmara de ar



Dia 34

- Asa direita acima da cabeça
- Diminuição da quantidade de vasos sanguíneos
- Embrião ocupa praticamente todo o ovo



Dia 35

- Bico em direção da câmara de ar
- Asa direita acima da cabeça
- Perna direita na parte superior da cabeça
- Pequena quantidade de vitelo ainda não absorvida



Dia 36

- Filhote nascido
- Olhos abertos
- Cabeça se sustenta sozinha
- Presença de penas por todo o corpo
- Dente do ovo presente

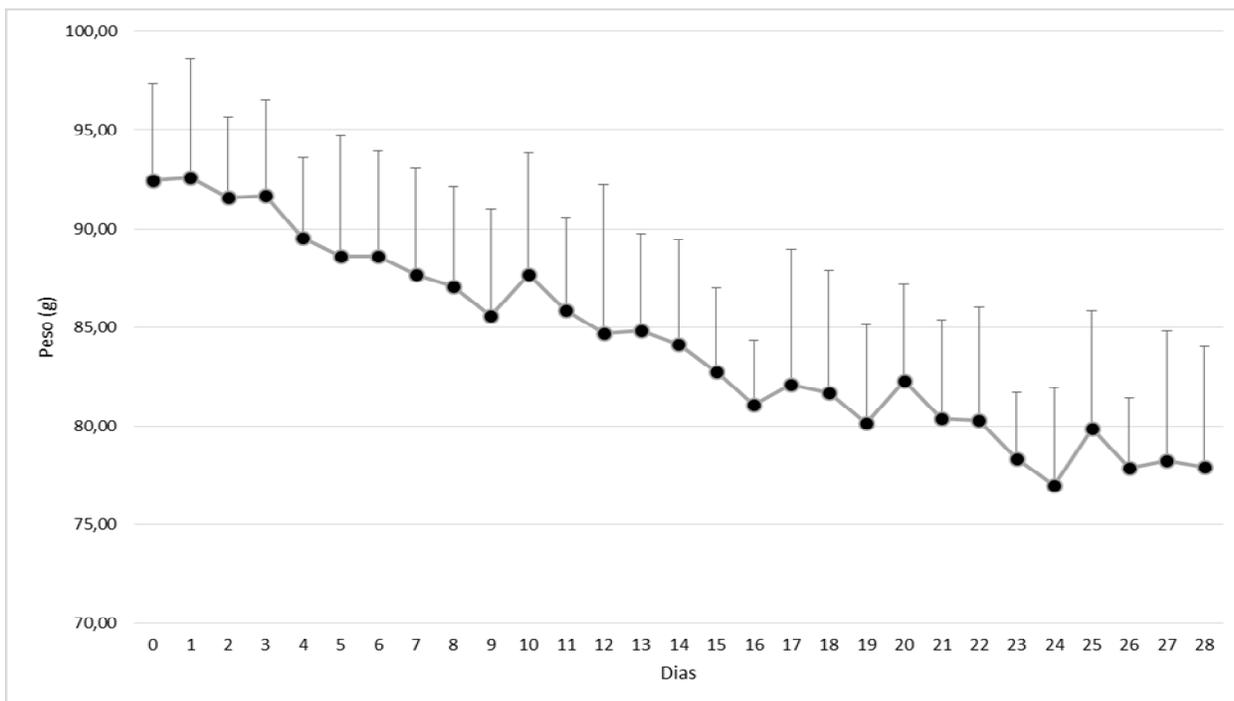
3.2. Pavão, *Pavo cristatus*

No total foram incubados 86 ovos desta espécie sendo que 36 estavam inférteis e 50 férteis. Para a descrição do desenvolvimento foram utilizados 14 embriões, pois 30 vieram a óbito durante a incubação, sendo 13 com morte embrionária inicial até dez dias de incubação, 8 até vinte dias e 9 até vinte e sete dias. Além destes, 6 embriões também foram eutanasiados porém, devido a má-formação, não foram descritos no estudo. O desenvolvimento do embrião foi correlacionado com o descrito por *Gallus gallus domesticus* (HAMBURGER & HAMILTON, 1951) utilizando apenas as características morfológicas visuais de acordo com o dia de incubação. Além disso, foi calculada a perda de peso do ovo antes de iniciar o processo de incubação até o dia exato da abertura do ovo para a realização do embriodiagnóstico (Tabela 3). O gráfico da média de perda de peso diária de todos os ovos viáveis para o experimento mostrou uma diminuição do peso até o final da incubação, antes do nascimento (Fig. 10).

Tabela 3: Relação do período de incubação em que os ovos foram abertos, a correlação aproximada com a descrição feita por HAMBURGER & HAMILTON (1951)* de *Gallus gallus* e a quantidade de embriões. O dia do nascimento (27) não está representado na tabela.

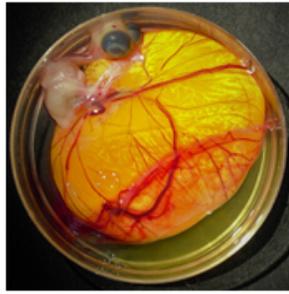
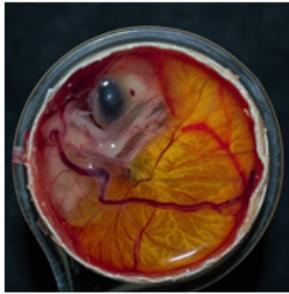
Dias de incubação	Estágio estimado H & H* (dia)	N
12	7-8	1
14	8	1
16	13	1
18	13-14	2
20	14	2
22	14-15	2
24	17	2
26	19	1

Fig 7.: Relação da média de perda de peso dos ovos viáveis de *Pavo cristatus* por dia de incubação (n=14)



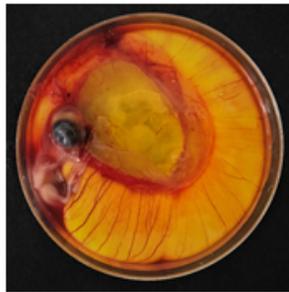
Devido ao número insuficiente de ovos viáveis, não foi possível fechar o quadro completo do desenvolvimento de *Pavo cristatus* e todas as características morfológicas, posicionamento dentro do ovo e detalhes do embrião foram descritas nas figuras 8.

Fig 8. Descrição do desenvolvimento embrionário de *P. cristatus* com 12,14,16,18,20,22,24 e 26 dias de incubação.



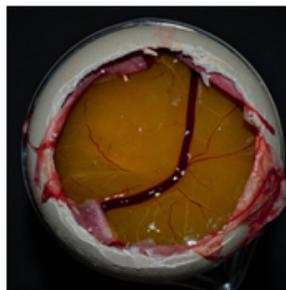
Dia 12

- Olho grande
- Presença do dente do ovo
- Presença de unhas
- Foliculos por todo o corpo, exceto na cabeça



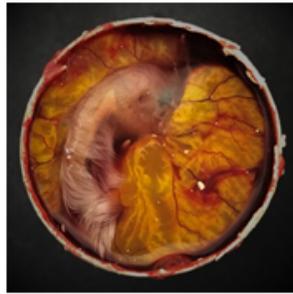
Dia 14

- Embrião posicionado abaixo do vitelo posicionado sobre seu lado esquerdo
- Bico e unhas ainda moles
- Canal do conduto auditivo visível



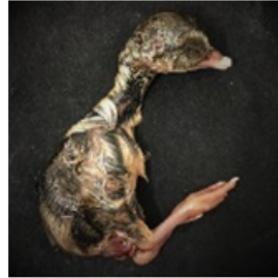
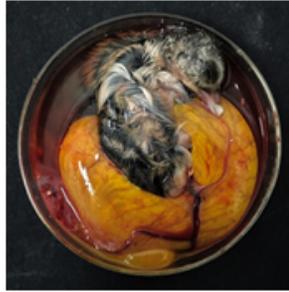
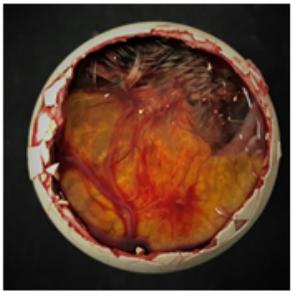
Dia 16

- Embrião com penas pelo corpo, exceto na cabeça
- Presença de urato em pequena quantidade
- Bico inferior menor que o superior
- Bico e unhas mais firmes



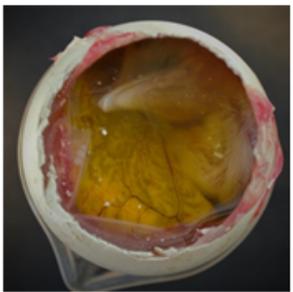
Dia 18

- Penas por todo o corpo
- Bico superior e inferior quase do mesmo tamanho
- Pálpebra inferior encontra-se com a superior



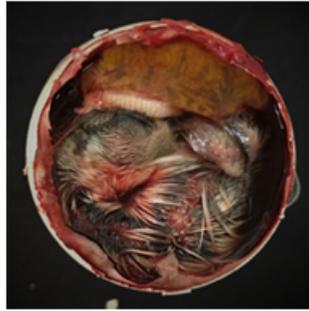
Dia 20

- Albúmen muito reduzido
- Alças intestinais fora da cavidade abdominal



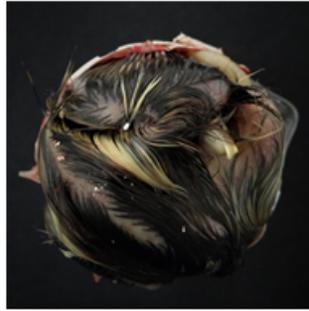
Dia 22

- Embrião ocupa metade do volume do ovo
- Cabeça em direção à câmara de ar, apoiada no lado direito



Dia 24

- Embrião ocupa grande parte do ovo
- Interiorização das alças intestinais dentro da cavidade abdominal
- Redução do líquido amniótico
- Perna direita acima da cabeça



Dia 26

- Embrião ocupa todo o ovo
- Bico em direção da câmara de ar
- Asa direita acima da cabeça
- Perna direita na parte superior da cabeça



Dia 27

- Filhote nascido
- Olhos abertos
- Cabeça se sustenta sozinha
- Presença de penas por todo o corpo
- Dente do ovo presente

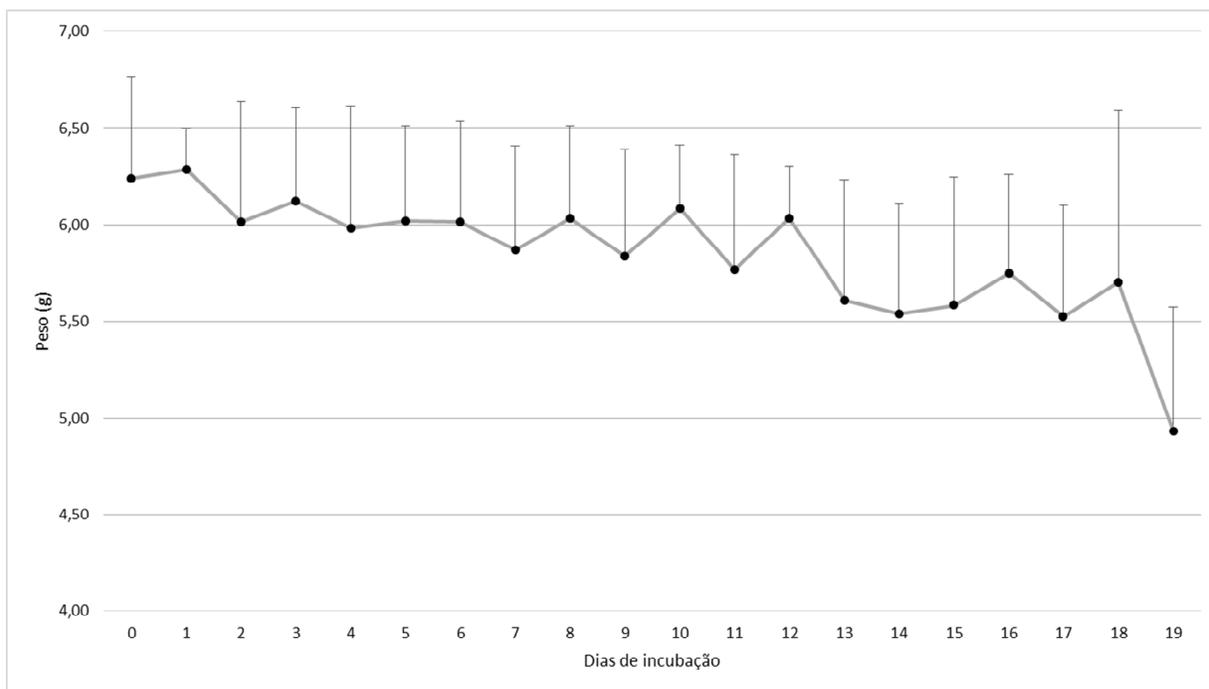
3.3. Calopsita, *Nymphicus hollandicus*

No total foram incubados 81 ovos desta espécie sendo que 27 estavam inférteis e 54 férteis. Para a descrição do desenvolvimento foram utilizados 29 embriões, pois 25 vieram a óbito durante a incubação, sendo 16 com morte embrionária inicial até cinco dias de incubação, 5 até dez dias e 4 até vinte dias. O desenvolvimento do embrião foi correlacionado com o descrito por *Gallus gallus domesticus* (HAMBURGER & HAMILTON, 1951) utilizando apenas as características morfológicas visuais de acordo com o dia de incubação. Além disso, foi calculada a perda de peso do ovo antes de iniciar o processo de incubação até o dia exato da abertura do ovo para a realização do embriodiagnóstico (Tabela 4). O gráfico da média de perda de peso diária de todos os ovos viáveis para o experimento mostrou uma diminuição do peso até o final da incubação, antes do nascimento (Fig. 9).

Tabela 4: Relação do período de incubação em que os ovos foram abertos, a correlação aproximada com a descrição feita por HAMBURGER & HAMILTON (1951)* de *Gallus gallus* e a quantidade de embriões descritos. O dia do nascimento (20) não está representado na tabela.

Dias de incubação	Estágio estimado H & H* (dia)	N
7	4	1
8	5	1
9	6	1
10	7	1
11	8	1
12	8-9	2
13	10-11	2
14	12	2
15	13-14	2
16	14-15	4
17	15	5
18	16-17	3
19	18-19	2

Fig 9.: Relação da média de perda de peso dos ovos viáveis de *Nymphicus hollandicus* por dia de incubação (n=29)



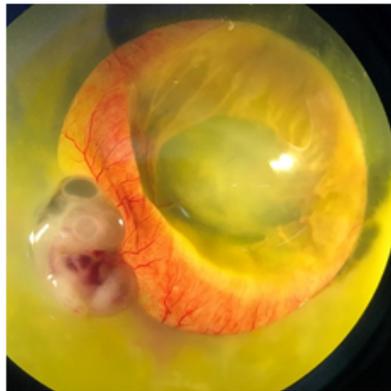
Devido ao número insuficiente de ovos viáveis, não foi possível fechar o quadro completo do desenvolvimento de *Nymphicus hollandicus* e todas as características morfológicas, posicionamento dentro do ovo e detalhes do embrião foram descritas na figura 10.

Fig 10. Descrição do desenvolvimento embrionário de *N. hollandicus* de 7 a 19 dias de incubação.



Dia 7

- Embrião posicionado sobre o seu lado esquerdo, em forma de C
- Olhos grandes
- Esboço dos membros salientes



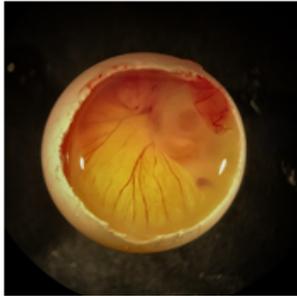
Dia 8

- Membros superiores e inferiores visíveis
- Aparecimento sutil do bico



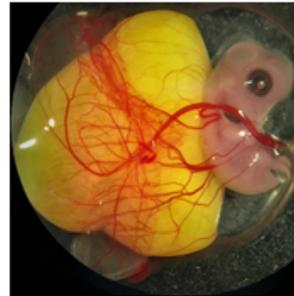
Dia 9

- Olhos bem definidos
- Bico proeminente
- Membrana entre os dedos presente, sendo o segundo dedo maior
- Aparecimento sutil da ábula



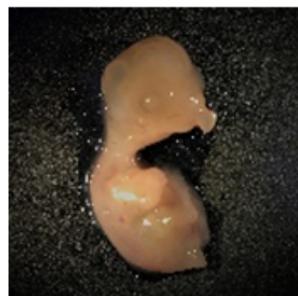
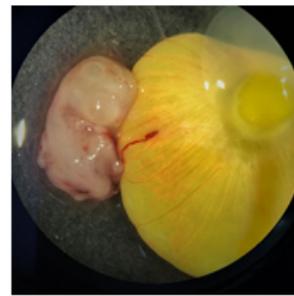
Dia 10

- Fossa nasal bem visível
- Região do pigóstilo ainda alongada
- Abdome mais saliente



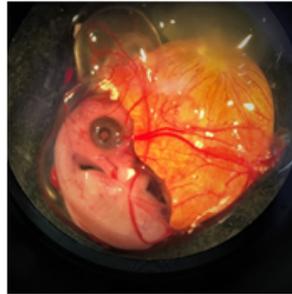
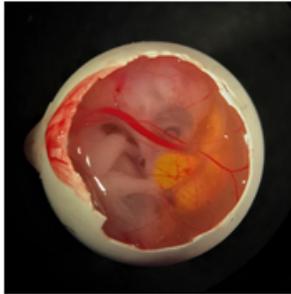
Dia 11

- Aparecimento do dente do ovo
- Asas e pernas bem diferenciadas
- Tibia e tarso bem visíveis
- Úmero e ulna bem visíveis
- Membrana entre os dedos desaparece
- Bico superior e inferior do mesmo tamanho



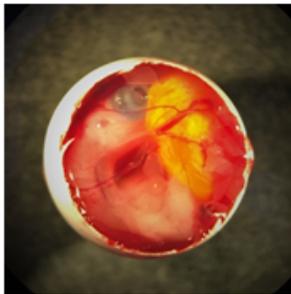
Dia 12

- Presença sutil de unhas
- Dente do ovo mais proeminente
- Ausência de penas



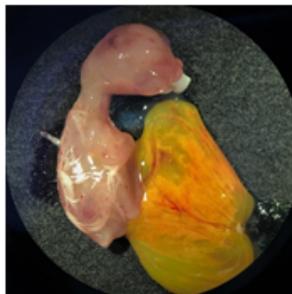
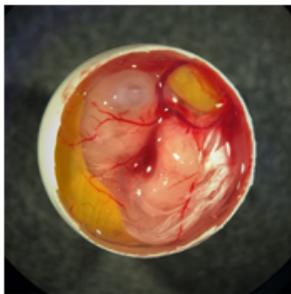
Dia 13

- Embrião começa ter aparência de um psitacideo
- Dente do ovo bem visível e de coloração branca
- Fossa nasal proeminente
- Tamanho da cabeça proporcional em relação ao corpo
- Embrião já ocupa metade do ovo



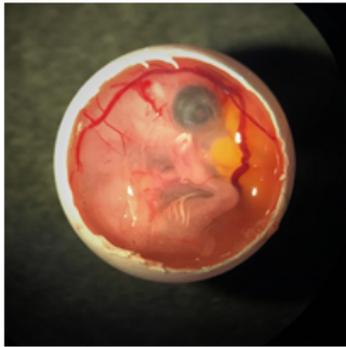
Dia 14

- Pálpebra inferior visível
- Presença de penas pelo corpo, exceto na cabeça
- Presença de urato em pequena quantidade
- Embrião ocupa mais da metade do ovo
- Alças intestinais exteriorizadas



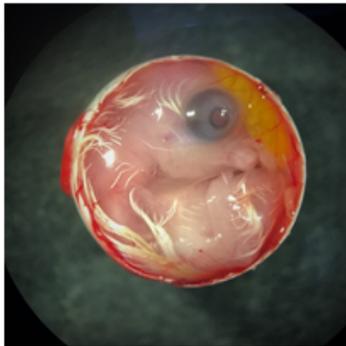
Dia 15

- Penas bem visíveis pelo corpo
- Ligeiro endurecimento do bico e unhas
- Dedos abertos na posição zigodáctila
- Vasos sanguíneos menos calibrosos



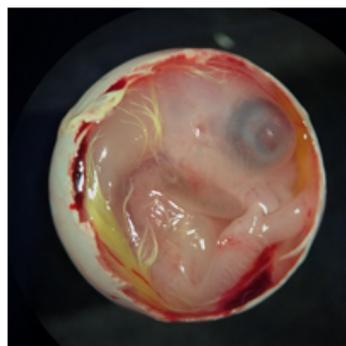
Dia 16

- Canal do conduto auditivo visível
- Vasos sanguíneos menos calibrosos em torno do saco vitelínico
- Cabeça entre as pernas



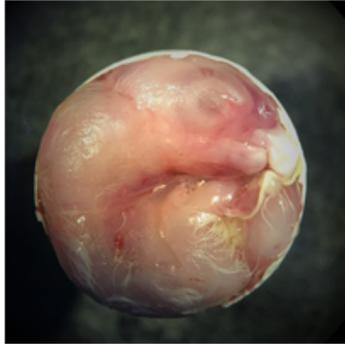
Dia 17

- Pálpebra inferior cobre grande parte do olho
- Interiorização das alças intestinais dentro da cavidade abdominal
- Líquido amniótico reduzido
- Asa direita perto da cabeça



Dia 18

- Embrião ocupa praticamente todo o ovo
- Asa direita sob a cabeça
- Ausência de líquido amniótico
- Saco vitelínico bem reduzido



Dia 19

- Embrião ocupa todo o ovo
- Furou a câmara de ar
- Pequeno trincado na casca
- Pequena quantidade de vitelo ainda não absorvido



Dia 20

- Filhote nascido
- Olhos fechados
- Cabeça não se sustenta sozinha
- Região dorsal ausente de penas
- Dente do ovo presente

3.4. Características externas dos ovos

Durante o processo de incubação foi possível identificar algumas variações externas em diversos ovos das três espécies como: casca suja, com depósito de cálcio, com falha de calcificação, rugosa e áspera, com formato alongado, arredondado e de tamanho reduzido (Fig. 11).

Fig 11.: Exemplos de diferentes características externas dos ovos de *Cygnus atratus*, *Pavo cristatus* e *Nymphicus hollandicus*



• Diferentes formatos de ovos de *C. atratus*



• Ovo de *C. atratus* com casca suja de barro



• Ovo de *C. atratus* com falha de calcificação



• Diferentes formatos de ovos de *P. cristatus*



• Ovo de *P. cristatus* com depósito extra de cálcio



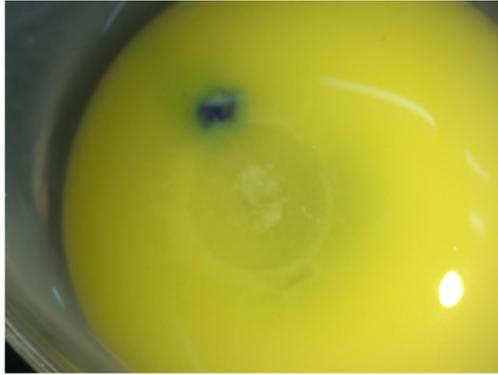
• Ovo de *N. hollandicus* com formato arredondado e casca rugosa (direita) em relação ao padrão (esquerda).

Fotos: Fernanda Vaz

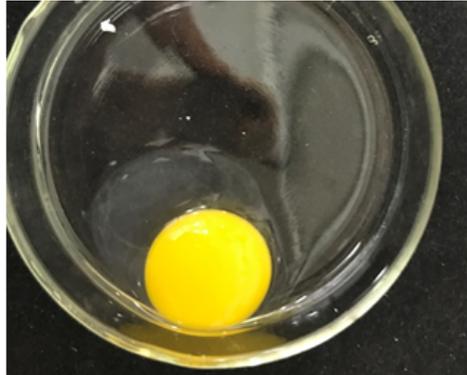
3.5. Embriodiagnóstico em ovos não viáveis

Os ovos que não tiveram sucesso durante o processo de incubação artificial foram abertos a fim de identificar se estavam inférteis e descrever as principais características encontradas. Ovos inférteis normalmente apresentaram as gemas intactas mesmo após alguns dias de incubação e, quando corados com azul de tripano, foi possível observar a borda irregular, presença de vacúolos com aspecto granular. Ovos férteis apresentaram um alo de sangue na região do disco germinativo e a gema rompida (Fig. 12). No caso de *N. hollandicus*, quando a mortalidade foi detectada poucos dias após a morte, apesar da gema rompida, o embrião ainda estava intacto, podendo ser separado do saco vitelínico para registro fotográfico feito com a lupa. Seguindo a classificação de embriões de *G. gallus domesticus*, estima-se que os embriões tenham 2, 3 a 4 e 5 a 6 dias de vida (Fig.13,14). Em embriões com óbito no final do período de incubação, foi possível observar situações de atraso no desenvolvimento, posicionamento errado do corpo impedindo a quebra da casca no polo maior do ovo e, conseqüentemente, o não acesso a câmara de ar. Além disso, alguns embriões apresentaram deformidades físicas nos membros inferiores.

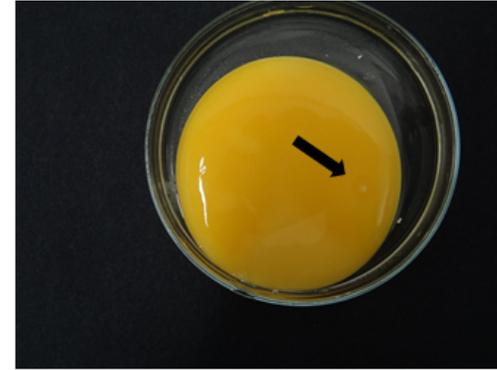
Fig 12.: Exemplos de discos germinativos de ovos inférteis e alo de sangue em ovos férteis.



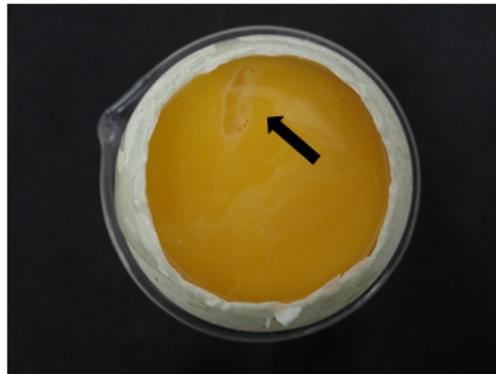
• Disco germinativo do ovo infértil de *N. hollandicus*



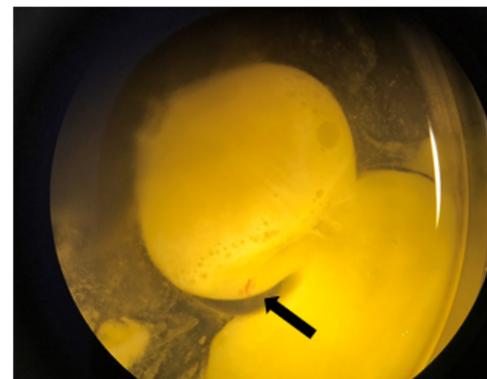
• Gema intacta do ovo infértil de *N. hollandicus*



• Disco germinativo do ovo infértil de *C. atratus*



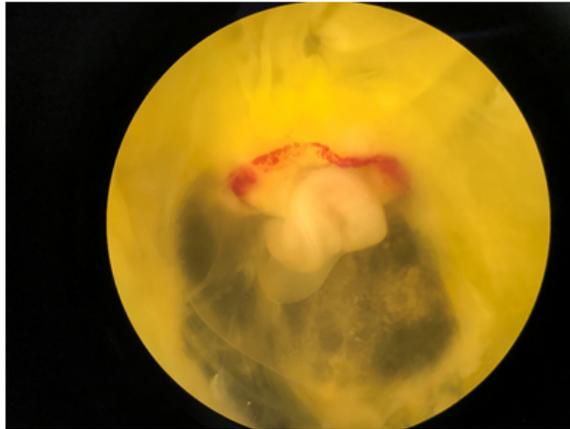
• Detalhe do alo de sangue em ovo de *C. atratus* com mortalidade inicial de incubação



• Detalhe do alo de sangue em ovo de *N. hollandicus* com mortalidade inicial de incubação

Fotos: Fernanda Vaz

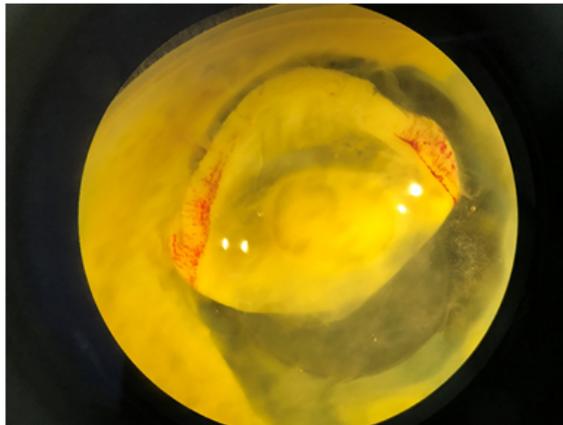
Fig 13.: Embriões de *N. hollandicus* com mortalidade inicial



- Detalhe do ovo de *N. hollandicus* com mortalidade embrionária estimada de 2 dias.



- Detalhe de embrião *N. hollandicus* com mortalidade estimada de 2 dias.



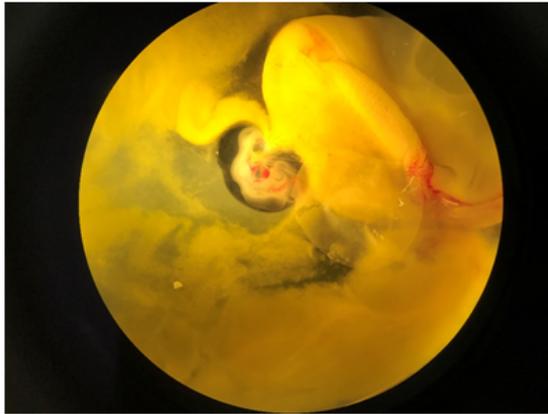
- Detalhe do ovo de *N. hollandicus* com mortalidade embrionária estimada de 3 a 4 dias.



- Detalhe de embrião *N. hollandicus* com mortalidade estimada de 3 a 4 dias.

Fotos: Fernanda Vaz

Fig 14.: Embrião de *N. hollandicus* com mortalidade inicial e embriões de *C. atratus* e *P. cristatus* com atraso no desenvolvimento, posicionamento errado e deformidades físicas.



- Detalhe do ovo de *N. hollandicus* com mortalidade embrionária estimada de 5 a 6 dias.



- Detalhe de embrião *N. hollandicus* com mortalidade estimada de 5 a 6 dias.



- Embrião de *C. atratus* atraso no desenvolvimento (37 dias de incubação), com vitelo não absorvido e posicionamento errado.



- Embriões de *P. cristatus* com mortalidade estimada de 27 e 20 dias, respectivamente.

Fotos: Fernanda Vaz

4. Discussão

O processo de incubação artificial é um processo complexo e pesquisas indicam que os critérios ambientais mais importantes são a temperatura, os níveis de CO₂, O₂, que influenciam na taxa de crescimento e desenvolvimento do sistema cardiovascular do embrião, e a umidade, que determina a taxa de perda de água. A indústria avícola apresentou avanços consideráveis a fim de maximizar a eclodibilidade dos ovos e para isso as incubadoras foram se modernizando para uma escala industrial, com possibilidade de incubar milhares de ovos ao mesmo tempo (DECUYPERE *et. al.*, 2013). No contexto da incubação de ovos de aves silvestres, apesar do progresso nas últimas décadas, essa ferramenta mostra-se rudimentar quando comparada a tecnologia aplicada na indústria avícola.

Outro ponto que merece um destaque é a qualidade das matrizes. Na indústria avícola diversos estudos foram realizados a fim de compreender a relação entre a qualidade do embrião e a idade da matriz, além de aspectos relacionados à genética (MAIORKA *et. al.*, 2013). Pintinhos oriundos de matrizes jovens apresentam menor taxa de sobrevivência logo após a eclosão por conta de fatores como menor porosidade da casca, maior espessura da membrana interna e maior densidade do albúmen, dificultando a difusão da água entre o ovo e o meio ambiente (NOBLE *et.al*, 1986 *apud* MAIORKA *et. al.*, 2013). Baião & Aguilar (2001) *apud* Maiorka *et. al.* (2013) relataram que o tamanho do ovo aumenta com a idade da matriz ocasionando uma diminuição na espessura da casca, mas embora isso indique uma melhoria, a correlação entre o peso do ovo e a resistência da casca é muito baixa. Outro fator importante é a nutrição das matrizes, que se baseia na oferta de alimento em quantidade suficiente de nutrientes, fontes de energia, aminoácidos, vitaminas e minerais. As rações comerciais feitas para frango de corte são compostas por

ingredientes que, além de nutrir as matrizes, maximiza o aproveitamento da ração pela alta digestibilidade e baixa taxa de desperdício (FERNANDES & FAGUNDES, 2013 FACTA). Quando aplicamos essa situação no manejo de aves silvestres é possível notar a discrepância em relação à indústria avícola pela dificuldade em controlar tais fatores. No momento em que ocorre a postura, a temperatura cai e o conteúdo do ovo encolhe, criando uma pressão negativa dentro do mesmo, forçando o ar a entrar através dos poros formando assim a câmara de ar. Se o local onde o ninho foi construído for um ambiente contaminado, bactérias podem penetrar no ovo devido a esse fluxo de ar, aumentando o risco de contaminação (MEIJERHOF, 2013). No caso do presente estudo, as matrizes de *C. atratus* e *P. cristatus* são mantidas em grandes recintos onde não é possível controlar a ingestão de alimento, a variabilidade genética por não controlar a formação dos casais, a dificuldade na identificação das fêmeas que realizaram a postura de ovos bem o local onde o ninho foi construído, sendo estes fatores hipóteses para a alta taxa de mortalidade. Essas situações são comuns no manejo em cativeiro de aves silvestres e nem sempre é possível selecionar as matrizes pela dificuldade na aquisição de algumas espécies e tão pouco selecionar os ovos de acordo com a qualidade, já que em muitas ocasiões conseguimos apenas poucos ovos de um mesmo casal.

Em um estudo realizado por Brand (2012) com avestruz, *Struthio camelus*, mostrou que a idade da matriz teve um efeito significativo sobre a proporção de filhotes que bicaram a casca do ovo, bem como sobre a mortalidade embrionária precoce e tardia. Além disso, ovos armazenados por 3 a 6 dias antes de serem incubados, eram mais propensos ao nascimento do que os que foram incubados logo após a postura. Isso porque logo após a ovoposição ocorre a fase de gastrulação e, em frango de corte, ovos estocados por alguns dias demonstraram um estágio de gástrula

avançado e bons resultados na eclodibilidade (MEIJERHOF, 2013). A maioria dos ovos das três espécies deste estudo também foram armazenados a fim de programar os nascimentos nos dias selecionados, não passando dos 5 dias.

Nas espécies *Cygnus atratus* e *Pavo cristatus* foi possível observar uma taxa de mortalidade embrionária relativamente alta de 55,3% e 60% respectivamente. As causas destas mortalidades também podem estar vinculadas a falha no manejo da incubação, mesmo que todos os parâmetros de temperatura e umidade da incubação tenham sido seguidos. Em 2016 os ovos estavam sendo incubados em uma sala sem controle de temperatura feita por ar condicionado e isso pode ter causado algumas oscilações de temperatura e umidade ao longo dos dias. A partir de 2017, as incubadoras foram transferidas para uma sala com temperatura constante de 20°C para não atrelar o problema de temperatura com as oscilações dos parâmetros.

No caso de *N. hollandicus*, a taxa de mortalidade embrionária foi de 46.3%, relativamente mais baixa que as demais espécies estudadas e isso pode ser justificado pelo maior controle das matrizes, que são mantidas individualizadas por casal em viveiros, tendo o controle total das posturas, do local do ninho e da ingestão de alimento.

Como o quadro de desenvolvimento embrionário de *C. atratus*, *P. cristatus* e *N. hollandicus*, ainda não foi fechado, a comparação entre aves precociais e altriciais não pode ser feita por completo, porém, no estudo realizado por Blom, 2015 utilizando embriões de codorna, *Coturnix japonica* e de um passeriforme, *Turdus pilaris*, diferenças morfológicas foram encontradas no começo e no final da incubação. A parte anterior do cérebro em *C. japonica* teve um crescimento maior do que no *T. pilaris* durante os primeiros estágios de desenvolvimento, enquanto a parte posterior foi maior no *T. pilaris*. Esta mesma diferença foi encontrada em embriões mais velhos.

Outra parte do estudo mostrou que os membros de locomoção de cada espécie exibiram diferentes padrões de crescimento em um estágio embrionário precoce. No passeriforme os membros anteriores foram significativamente maiores do que os membros posteriores, na codorna não foi detectada nenhuma diferença e no avestruz, *Struthio camelus*, outra espécie estudada, os membros posteriores foram consideravelmente maiores do que os anteriores. De acordo com os autores, os dados são observações importantes relatando diferenças nas características neonatais, levando a conclusão de que características ontogenéticas podem alterar o desenvolvimento embrionário inicial.

Murray, 2013 relata que freqüentemente os embriões de diamante-mandarim, *Taeniopygia guttata*, apresentam variação de tamanho quando comparado com galinha, que possuem um crescimento mais regular. Portanto, a determinação da idade embrionária utilizando as medidas de membros, bico, crânio pode não ser a melhor metodologia. A posição do embrião dentro do ovo em relação à gema é um indicador confiável de idade em *Gallus gallus domesticus* (FREEMAN et al., 1974 *apud* BROWNE 2006.)

Um importante estudo feito por PISENTI *et al.* (2001), com *Falco sparverius*, espécie altricial, mostrou que as descrições do desenvolvimento estabelecido para *Gallus gallus domesticus* representam um ponto de referência para determinar a idade e identificar anormalidades nos embriões, porém, no terço final da incubação, a galinha tem um crescimento rápido quando comparado com a espécie altricial. CARL, J. & DANIEL, JR. (1957) também compararam a embriogênese de um galliforme (*Gallus gallus*) com um passeriforme (*Agelaius phoeniceus*) e descreveram que ambos tiveram um desenvolvimento semelhante tanto morfológica quanto fisiologicamente, exceto com relação ao sistema nervoso e digestivo.

SELLIER *et al.* (2006) comparando os estágios de desenvolvimento em embriões de espécies de galliformes e anseriformes após 72 horas de incubação, concluíram que as tabelas do desenvolvimento concebidas por Hamburger & Hamilton (1951) são aplicáveis a embriões de outras espécies de aves mas espera-se observar diferenças temporais no aparecimento de fases específicas do desenvolvimento.

Trabalhos com descrição embrionária são importantes para serem usados como referência durante a necropsia de ovos que vierem a óbito durante a incubação e muito útil para pesquisadores que trabalham *in situ* para determinar a idade do embrião de ovos abandonados. A partir desta informação, o problema pode ser identificado e melhorias no processo de incubação podem ser feitas para aumentar a taxa de sucesso de nascimento (BROWNE, 2006). A embriologia aviária tem sido tendenciosa para a embriologia de galinha doméstica de Hamburger & Hamilton (1951), porém, ainda são poucos os estudos que compararam o desenvolvimento de espécies altriciais e precociais, sendo a maioria apenas no desenvolvimento precoce (BLOM, 2005). Browne, 2016, que estudou o desenvolvimento embrionário de *Himantopus novaezelandiae*, espécie criticamente ameaçada (IUCN, 2014), a partir de embriões fixados em formol, relatou a dificuldade em adquirir ovos que sejam utilizados para a eutanásia a fim de descrever sem lacunas o desenvolvimento. Além disso, é necessária uma maior quantidade de embriões no mesmo estágio de desenvolvimento, já que certo grau de variação no desenvolvimento pode ocorrer. Esta mesma situação ocorreu neste estudo já que o número de embriões descritos pode ser considerado baixo.

A proposta desta dissertação foi justamente descrever o desenvolvimento embrionário de espécies silvestres (mesmo que consideradas domésticas pelos órgãos ambientais brasileiros)

comuns em cativeiro e que servirão de modelo para a aplicação no embriodiagnóstico de espécies raras ou até mesmo ameaçadas de extinção. Devido à dificuldade na aquisição de ovos viáveis e pelo número reduzido de embriões por dia de incubação, o quadro de desenvolvimento apresentou lacunas, portanto a pesquisa terá continuidade. Acreditamos a continuidade deste estudo fornecerá subsídios para o aperfeiçoamento das técnicas de incubação artificial de ovos, instrumento hoje indispensável em programas de conservação de diversas espécies de aves selvagens.

5. Conclusões

- a) Será necessário um número maior de embriões por fase de desenvolvimento para que a descrição possa ser feita com maior precisão visto que os períodos de incubação de espécies selvagens podem sofrer uma variação de 1 a 3 dias.

- b) Descrição feita por Hamburguer e Hamilton (1951) utilizando frango pode ser utilizada como referência para a determinação dos estágios de desenvolvimento, porém não foi possível concluir com precisão em qual fase (I, II ou III) os embriões estariam no momento do embriodiagnóstico pois o ritmo de desenvolvimento embrionário das espécies é diferente.

6. Referências bibliográficas

- ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L.F.T. Embriodiagnóstico. In: ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L.F.T. Comercial Incubation. **Kerala: Transworld Research Network**, 2011. Cap. 3, p. 29-67.
- AVMA. Guidelines for the Euthanasia of Animals. **American Veterinary Medical Association**, 2013. Illinois, United States of America. 102p.
- BLOM, J.; LILJA, C. A comparative study of embryonic development of some bird species with different patterns of postnatal growth. **Zoology**, v.108, p. 81-95, 2005
- BRAND, Z. **Studies on embryonic development and hatchability of ostrich eggs**. 2012. Dissertation. (Master degree in Philosophiae doctor). Department of Animal Sciences. University of Stellenbosch. South Africa, 2012.
- BROWNE, T. J. **Staging Kaki (*Himantopus novaezelandiae*) Embryos Using Embryonic Morphological Features**. 2006. Dissertation (Post-graduate in Wildlife Management). Department of Zoology. University of Otago, New Zealand, 2006.
- CARL, J.; DANIEL, JR. An embryological comparison of the domestic fowl and the red-winged blackbird. **Auk**, vol.74, p. 340-358, 1957.
- CESARIO, D. C. Desenvolvimento embrionário pré e pós-postura – períodos críticos. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 1.3, p. 47-63.
- CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). **Guia Brasileiro de boas práticas para a eutanásia em animais. Conceitos e procedimentos recomendados**. Comissão de ética, bioética e bem-estar animal. Brasília, 2013.
- DECUYPERE, E.; BANWELL, R.; HEMERYCK, P.; MORO, D. Desafios do processo de incubação. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 2.13, p. 299-314.

DEEMING, D.C. Embryonic development and utilization of eggs components. In: DEEMING, D. C. **Avian incubation: behaviour, environment, and evolution**. Oxford: Oxford University Press, 2002. Cap. 4, p.43-53.

EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 1.2, p. 31-45.

FERNANDES, E. de A.; FAGUNDES, N. S. Nutrição da matriz. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 2.8, p. 203-221.

FRANCISCO, M. R.; SILVEIRA, L. F. Conservação animal *ex situ*. In: PIRATELLI, A. J.; FRANCISCO, M. R. **Conservação da Biodiversidade: dos Conceitos às Ações**. 1.ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2013. Cap. 3, p.117-130.

GONZALES, E. Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2005, Campo Grande-MS. **Anais do Zootec** Campo Grande-MS; Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.

ICMBIO. **Programas de Cativeiro de Espécies Ameaçadas**. 2012. Acessado em 08 de março de 2015. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br>.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). IUCN Red List version 2014.3: Table 2 Last Updated: 13 November 2014. Acessado em 08 de março de 2015. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; MIYAJI, S. O. Sistema reprodutor e formação do ovo. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 1.1, p. 1-30.

JOYNER, K. L. Theriogenology. In: RITCHIE, B. W.; HARRINSON, G. J.; HARRINSON, L. R. **Avian medicine – principle and applications**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. Cap. 29, p. 748-784.

KAWASHIMA, T.; KUMATA, K.; TAMAKI, Y.; KUWANA, T.; HASHIMOTO, K. An Avian Embryo Culture System for Embryogenesis Using an Artificial Vessel: Possible Conservation Benefits in the Rescue and Management of Endangered Avian Species. **Zoo Biology**, v. 24, p. 519-529, 2005.

MAIORKA, A.; LUQUETTI, B. C.; MACARI, M. Idade da matriz e qualidade do pintinho . In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 2.6, p. 163-175.

MEIJERHOF, R. Temperaturas nas fases iniciais da incubação. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 2.11, p. 273- 282.

MURRAY, J. R.; VARIAN-RAMOS, C. W.; WOLCH, Z.S.; SAHA, M. S. Embryological Staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. **Journal of morphology** 274, 1090-1110, 2013.

PEREIRA, R. J. G. Reprodução das Aves. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. Cap. 120, p. 2236-2269.

PISENTI, J.M.; SANTOLO, G. M.; YAMAMOTO, J.T.; MORZENTI, A.A. Embryonic development of the American kestrel (*Falco sparverius*): external criteria for staging. **J. Raptor Res.** v. 35(3), p.194-206, 2001.

PLANO, C. M.; DI MATTE, A. M. Embriodiagnóstico e patologia perinatal. In: MACARI, M.; GONZALES, E.; PATRÍCIO, I. S.; NÄÄS, I. A.; MARTINS, P. C. **Manejo da Incubação**. 3.ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap. 2.10, p. 245-272.

SAINT JALME, M. Endangered Avian Species Captive Propagation: An Overview of Functions and Techniques. Proceedings of the International Congress on Bird Reproduction, p.187-2002, 1999.

SELLIER, N.; BRILLARDI, J.-P.; DUPUY, V.; BAKST, M. R. Comparative Staging of Embryo Development in Chicken, Turkey, Duck, Goose, Guinea Fowl, and Japanese Quail Assessed from Five Hours After Fertilization Through Seventy-Two Hours of Incubation. **Poultry Science Association**, p. 2019-228, 2006.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G. C. Incubation physiology. In: WHITTOW, G. C. **Sturkie's avian physiology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1999. Cap. 24, p.617-634.

Apêndice

Tabela S1: Ficha de controle utilizada durante a incubação dos ovos.

Controle de pesos e medidas de ovos

Espécie _____ Recinto de origem _____

Cadastro do casal _____

Temperatura de incubação _____ Umidade _____

Cor do ovo	Textura do ovo	Comprimento (mm)	Largura (mm)

Data de oviposição _____.

Data da incubação _____

Período de incubação _____

Data da eutanásia _____

Data	Peso (g)	Temperatura chocadeira	Umidade chocadeira	Temperatura da sala	Observações
1°					
2°					
3°					
4°					
5°					
6°					
7°					
8°					
9°					
10°					
11°					
12°					
13°					
14°					
15°					
16°					
17°					
18°					
19°					
20°					
21°					
22°					
23°					
24°					
25°					
26°					
27°					
28°					
29°					
30°					
31°					
32°					
33°					
34°					

