

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALINE LUIZA KONELL

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO ESQUELETO DA CODORNA-
JAPONESA (*Coturnix japonica*) COM ESPECIAL ATENÇÃO A DENSIDADE ÓSSEA
POR MEIO DE DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALINE LUIZA KONELL

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO ESQUELETO DA CODORNA-
JAPONESA (*Coturnix japonica*) COM ESPECIAL ATENÇÃO A DENSIDADE ÓSSEA
POR MEIO DE DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Clínica e Cirurgia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Professor Dr. Rogério Ribas Lange

Comitê de Orientação: Professor Dr. José Fernando Ibañez e Professora Dra. Tilde Rodrigues Fróes.

CURITIBA

2016

K82 Konell, Aline Luiza

Contribuição ao conhecimento do esqueleto da codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com especial atenção a densidade óssea por meio de densitometria óptica radiográfica. / Aline Luiza Konell. – Curitiba : 2016.

69 f. il.

Orientador: Rogério Ribas Lange.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. Diagnóstico por imagem. 2. Radiografia veterinária. 3. Ossos – Crescimento. I. Lange, Rogério Ribas. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619.6-073.75

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DO ESQUELETO DA CODORNA-JAPONESA (*Coturnix japonica*) COM ESPECIAL ATENÇÃO A DENSIDADE ÓSSEA POR MEIO DE DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA”** apresentada pela Mestranda **ALINE LUIZA KONELL** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata **APTA** para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2016

Professor Dr. Rogério Ribas Lange
Presidente/Orientador

Professor Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada
Membro

Professor Dr. José Fernando Ibañez
Membro

Dedico este trabalho a minha mãe, Elisabeth.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Ribas Lange, pela confiança, auxílio, incentivo, ensinamentos e paciência. Muitas vezes fazendo papel do pai que eu não tive. Te admiro como veterinário e como pessoa. Quero ser você quando eu crescer!

Ao criadouro Bellas Aves e ao Julio César, pela prontidão, paciência e disponibilidade com as calopsitas do projeto inicial.

Ao Laboratório didático de coturnicultura e ao Prof. Antônio João Scandolera pelos animais e ração para o experimento.

Ao Laboratório de Diagnóstico por Imagem da UFPR e a Prof. Dra. Tilde Rodrigues Fróes pela liberação dos aparelhos e por fazer parte do comitê de orientação juntamente ao Prof. Dr. José Fernando Ibañez.

Prof. Dr. Peterson Dornbush pelos auxílios com os testes estatísticos do segundo capítulo.

Prof. Dr. Mario J.Q. Louzada pelo ensino dos cálculos e fórmulas densitométricas com muita paciência e disponibilização de trabalhos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de mestrado.

Dani Matos e Elaine Gil pela ajuda com as radiografias das calopsitas (mesmo quando o aparelho resolvia dar erro e ficávamos horas esperando).

Sheron Sierakowski e Thaiza Lima, estagiárias e amigas, por aguentarem minhas crises durante o experimento e mesmo assim estarem ao meu lado.

Ana Lúcia, Felipe Miranda e Juliana Bisatto pelo apoio.

Aline Leal pela ajuda com os trâmites da dissertação.

Aos facilitadores de artigos, pertencentes a outras instituições: Camila Luba, Cristiano Bortoluzzi e Valéria Cavicchioli!

Aos amigos: Márcia Helena, pela ajuda durante o experimento, uma pessoa que se tornou uma grande companheira, pelo suporte e parceria. Danilo Marques, pelas palavras de apoio que sempre vinham em boa hora. Rafaella Martini pelos testes estatísticos mais doidos que eu já vi. Luciana Castro pelo apoio estatístico, risadas e conversas. Mariza Bortolini, pelo otimismo e amizade pra todas as horas, longe ou

perto. Monique Leal, por me fazer rir e por acreditar em mim. Juliana Kravetz pelas risadas, cafés e referências. Paula Motter pelas distrações curitibanas e auxílio. Gabriel Caesar pelas correções, Danke!

Frederico Araújo pela ajuda durante o experimento. Por ter sido minha força nos últimos quatro anos. Pelo apoio psicológico, por me fazer rir quando eu não tinha vontade, pelas overdoses de café, pelas brigas, conselhos e consultas rápidas via telefone.

Aos novos amigos de Curitiba, que me fizeram ver as coisas por outros ângulos.

Tedi, minha madrinha, sem você os últimos nove anos não teriam sido possíveis. Não existem palavras pra te agradecer.

Oma, Opa e Mãe: vocês são a minha vida. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim.

Muito obrigada a todos.

Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life, you were only waiting for this moment to arise
Blackbird singing in the dead of night
Take these sunken eyes and learn to see
All your life, you were only waiting for this moment to be free
Blackbird, fly, blackbird, fly
Into the light of the dark black night
Blackbird, fly, blackbird, fly
Into the light of the dark black night
Blackbird singing in the dead of night
Take these broken wings and learn to fly
All your life

You were only waiting for this moment to arise..

(Blackbird – Beatles)

RESUMO

Devido às diferenças esqueléticas das aves, quando comparadas aos demais vertebrados, visto que lhes permite a habilidade de voo, é de suma importância o entendimento de suas peculiaridades. Codornas (*Coturnix* sp.) são utilizadas mundialmente como modelos experimentais e estudos baseados em sua fisiologia podem ser extrapolados para diversas espécies aviárias. A radiografia é o exame complementar de escolha para diagnóstico de doenças na clínica veterinária, e com a utilização de uma escada de alumínio, técnica denominada densitometria óptica radiográfica, é possível determinar a densidade óssea mediante auxílio de programas computacionais, técnica simples, rápida e de baixo custo. Devido ao padrão de ossificação diferenciado nas aves, objetivou-se neste trabalho avaliar o desenvolvimento ósseo em codorna-japonesa mediante avaliações radiográficas periódicas bem como estabelecer padrões de densidade óssea durante o crescimento destes animais. O Capítulo 1 trata de uma introdução ao leitor, para que se estabeleça um parâmetro para a compreensão dos demais capítulos, onde são citadas as principais diferenças do esqueleto aviário, metabolismo do cálcio, aspectos radiográficos básicos e introduz ao leitor a técnica utilizada nos demais capítulos: a densitometria óptica radiográfica. O Capítulo 2 objetivou verificar os principais momentos da ossificação dos ossos longos e determinar valores de densidade óssea nos diferentes sexos e faixas etárias em codornas. Cinquenta e quatro codornas-japonesas (*Coturnix japonica*) de um dia de idade foram utilizadas. A cada três dias, dois animais foram pesados, identificados, submetidos à eutanásia e radiografados. Para a radiografia, a projeção ventrodorsal (VD) foi utilizada, em aparelho digital com técnica de 40 kVp, 100mAs e distância aparelho-chassi de 35cm. Em todas as radiografias, utilizou-se uma escada de alumínio de 21 degraus para posterior determinação da densitometria com o *software ImageJ* 1.48v e calibração para biometria. Mensurações de comprimento do úmero, rádio, ulna, fêmur, tibiotarso e tarsometatarso dos membros direito foram feitas, em milímetros. No 16º dia os primeiros sinais de fusão óssea foram verificados, ao 40º dia a formação de tibiotarso e tarsometatarso estava completa, as asas completaram sua ossificação entre o 52-55º dia de vida e a articulação fêmoro-tibiotársica entre 67 e 70 dias. A densidade óssea aumentou conforme os ossos cresceram em comprimento e o maior coeficiente de correlação ocorreu no úmero, seguido pelo tibiotarso, ulna e fêmur. O Capítulo 3 objetivou verificar a influência de tecidos moles nos valores densitométricos de fêmur e tibiotarso de codornas-japonesas, ossos estes que possuem grandes massas musculares adjacentes. Os mesmos animais do Capítulo 2 foram utilizados. Após as radiografias para o capítulo anterior, os ossos de membro pélvico foram cuidadosamente dissecados e radiografados com a escada de alumínio para avaliação densitométrica e comparação estatística dos resultados obtidos com e sem tecidos moles. Nos fêmures de codornas machos e fêmeas, em todas as idades (1 a 79 dias), houve diferença estatística ($p < 0,05$) nas densidades ósseas quando comparados os tratamentos com e sem tecidos moles. Nos grupos 3, 4 e 5, os fêmures após dissecação tiveram redução de mais de 55% dos valores densitométricos, e nos mesmos grupos, mais de 46% em tibiotarso, contrastando com os valores descritos em

literatura. Foi possível verificar correlação entre idade e densidade óssea na presença de musculatura em fêmur (0,82) e tibiotarso (0,74), sendo considerada forte. No tratamento sem musculatura, a correlação de fêmur foi de 0,6928 e de tibiotarso 0,555, correlação esta considerada moderada concluindo que efetivamente, a avaliação densitométrica do osso destituído de músculo reflete mais precisamente a característica esquelética de codorna-japonesa.

Palavras-chave: ossificação, fotodensitometria radiográfica, densidade óssea, aves, galiformes.

ABSTRACT

Due to skeletal differences between birds and other vertebrates, allowing them to fly, the understanding of their peculiarities is of utmost importance. Quails are used worldwide as experimental models and studies based on their physiology can be extrapolated to various bird species. Radiography is the test of choice for diseases diagnosis in veterinary clinic, and with the use of an aluminum stepwedge, a technique called optical densitometry in radiographic images, it is possible to determine bone density with the assistance of computer program. In consideration of the distinct ossification pattern in birds this study aims to assess the bone development in Japanese quail by periodic radiographic evaluations and establish patterns for bone density during these animals growth as well. The first chapter is an introduction for the reader that establishes a parameter for the comprehension of the following chapters, mentioning the main differences of the aviary skeleton, the calcium metabolism, basic radiographic aspects and introduces the technique used on other chapters: optical densitometry in radiographic images. The second chapter intended to verify the key moments of ossification in long bones and determine values for bone density in quails for different genders and age groups. Fifty-four one-day old Japanese quail (*Coturnix japonica*) were evaluated. Every three days, two animals were weighted, identified, euthanized and x-rayed. In the radiography, ventrodorsal projection was used with digital equipment set to 40kVp, 100mAs and plate equipment distance of 35 cm. In every radiography, an aluminum stepwedge of 21 steps was used for later assessment of the densitometry using ImageJ 1.48v software and biometric calibration. Length measurements of humerus, radius, ulna, femur, tibiotarsus, and tarsometatarsus in the right limb were computed in millimeters. On the sixteenth day the first signs of bone fusion were observed, on the fortieth day the formation of the tibiotarsus and tarsometatarsus was completed, the wings concluded its ossification between the fifty second and fifty fifth day and the femur tibiotarsal joint between 67 and 70 days. The bone density increased as the bones grew in length, and the highest correlation coefficient happened on the humerus followed by the tibiotarsus, ulna and femur. The third chapter sought to assess the influence of soft tissue on the densitometric values of the femur and tibiotarsus in Japanese quail, bones that have large adjacent muscle mass. The same animals from

chapter 2 were used after radiography for this chapter; the bones on the pelvic limb were carefully dissected and x-rayed with the aluminum stepwedge for densitometry evaluation and statistical comparison of the bone with and without soft tissues. On the quail femur of both male and female, and all ages (1 through 79 days), there was a statistical difference ($p < 0,05$) on the bone density when comparing the presence and absence of soft tissue. The groups 2, 3 and 4, showed a reduction of more than 55% on densitometric values in the femurs after dissection. In these same groups, more than 46% on the tibiotarsus contradicting the values found in literature. It was possible to assess the correlation between age and bone density in the presence of muscle, on femur (0,82) and tibiotarsus (0,74), which is considered strong. On the procedure without muscle, the correlation of femur was 0.6928 and tibiotarsus 0,555, which is considered moderate correlation and concludes effectively that densitometric evaluation of bone without muscle, demonstrates more precisely the skeletal characteristics of the Japanese quail.

Keywords: ossification, radiographic photodensitometry, bone density, avian, galliformes.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1: Quantidade de cálcio, fósforo e proteína bruta nas rações fornecidas as codornas-japonesas (*Coturnix japonica*) nas diferentes fases do crescimento.40

TABELA 2: Relação dos degraus da escada de alumínio com suas respectivas espessuras, em milímetros.....57

CAPÍTULO 3

TABELA 3: Diferenças dos valores de DO de fêmur e tibiotarso de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com e sem tecidos moles, em porcentagem, bem como médias \pm desvio padrão (DP), em mmAl, separados por grupos.....60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Animal preso ao chassi para realização de radiografia. P: penetrômetro asteriscos marcam as áreas presas com micropore para correto posicionamento e posterior interpretação (pescoço, asas e tarsometatarsos).....41

FIGURA 2: Interface do programa *ImageJ* com a radiografia de um animal de 43 dias. Pontilhado: área de interesse (ulna) selecionada para verificar a quantidade de tons de cinza presente na área. P: barra de ferramentas do programa. R: resultados calculados a partir da área (*area*) selecionada com a média (*mean*) de tons de cinza, utilizada para cálculo da densidade óssea42

FIGURA 3: Radiografia ventrodorsal de *Coturnix japonica* aos 43 dias de idade, com a escada de alumínio (EA) de 21 degraus utilizada para a realização dos cálculos de densitometria. U: úmero, R: rádio, Un: ulna, F: fêmur, Tt: tibiotarso, Tm: tarsometatarso.43

FIGURA 4: Massa corpórea em gramas de *Coturnix japonica*, machos e fêmeas, do primeiro ao 79º dia de vida, mensurados com intervalos de três dias.....45

FIGURA 5: Densidade óssea de ossos longos de codornas-japonesas ao longo de 79 dias de vida. Regressão linear positiva da DO de ulna, úmero, fêmur e tibiotarso.47

FIGURA 6: Densidade óssea de fêmures de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) de 61 a 79 dias de vida. *p<0,05.....49

CAPÍTULO 3

FIGURA 7: Interface do programa *ImageJ* com a análise de uma radiografia de uma codorna-japonesa (*C. japonica*) de 61 dias. Pontilhado: área de interesse para cálculo da densidade óssea. F: fêmur. Tt: tibiotarso. I: Barra de ferramentas do programa R: resultados calculados a partir da área (*area*) selecionada com a média (*mean*) de tons de cinza. P: penetrômetro de alumínio de 21 de graus.58

FIGURA 8: Imagem da avaliação radiográfica da asa de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com 61 dias. Observar a pobre cobertura muscular (asteriscos), pouca radiopacidade, evidenciando fragilidade do tecido. b) membro pélvico do mesmo animal com grande cobertura de tecidos moles (sinais positivos)61

FIGURA 9: Densidade óssea de fêmur e tibiotarso de *Coturnix japonica* sem e com musculatura divididas em grupos por idades. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).62

FIGURA 10: Correlação entre idade (em dias) e DO (em mmAl) do fêmur e tibiotarso de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com a presença de tecidos moles e correlação entre idade e DO de fêmur e tibiotarso de codornas após dissecação dos ossos.63

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

‰: porcentagem

°C: grau Celsius

CEUA: Comissão de tica no uso de animais

C. japonica: *Coturnix japonica*

DEXA: dual energy X-ray absorptiometry (absorciometria por dupla emissão de raio-X)

DO: densidade sea

DOR: densidade tica radiográfica

DP: Desvio padrão

DR: Densidade radiográfica

et al.: (*et alii*) e outros

Fig: figura

g: gramas

g/Kg: gramas por quilograma

HP: hiperostose poliostrtica

Kg: quilograma

Kv: kilovoltagem

LL: laterolateral

mAs: miliamperes por segundo

mm: milímetros

mm/dia: milímetros por dia

mmAl: milímetros de alumínio

PTH: hormônio paratireóideo

VD: ventrodorsal

QCT: Tomografia computadorizada quantitativa

SPA: single photon absorptiometry (absoro de fótons de uma energia)

UFPR: Universidade Federal do Paraná

UV-B: Radiao ultravioleta B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1	HIPÓTESES.....	19
1.2	OBJETIVOS.....	20
1.2.1	Objetivo geral.....	20
1.2.2	Objetivos específicos.....	20
1.3	REFERÊNCIAS.....	21
2	O ESQUELETO DAS AVES – PECULIARIDADES, MATURAÇÃO E DENSIDADE 23	
2.1	AS AVES.....	23
2.2	O SISTEMA ESQUELÉTICO E SUAS DIFERENÇAS.....	24
2.3	CÁLCIO E FATORES QUE INFLUENCIAM SEU METABOLISMO.....	25
2.4	RADIOGRAFIA E HIPEROSTOSE POLIOSTÓTICA.....	28
2.5	DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA OU FOTODENSITOMETRIA....	29
2.6	CONCLUSÃO.....	31
2.7	REFERÊNCIAS.....	32
3	CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA EM CODORNA-JAPONESA (<i>Coturnix japonica</i>)	36
3.1	RESUMO.....	36
3.2	ABSTRACT.....	37
3.3	INTRODUÇÃO.....	38
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.6	CONCLUSÃO.....	49
3.7	REFERÊNCIAS.....	50
4	CAPÍTULO 3. INFLUÊNCIA DE TECIDOS MOLES NA DENSIDADE ÓSSEA POR DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA EM CODORNA-JAPONESA (<i>COTURNIX</i> JAPONICA)	53
4.1	RESUMO.....	53
4.2	ABSTRACT.....	54

4.3	INTRODUÇÃO	55
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.6	CONCLUSÃO	64
4.7	REFERÊNCIAS.....	65
5	ANEXOS.....	68
5.1	CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE.....	68

1 INTRODUÇÃO GERAL

A codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) é um membro da família *Phasianidae* e é considerada uma espécie diferente da chamada codorna comum (*Coturnix coturnix*). Em termos de desenvolvimento, a codorna é um modelo animal extremamente popular, com estudos de crista neural, tireoide, coração, pâncreas, baço, desenvolvimento craniofacial e intestinal (AINSWORTH *et al.*, 2010).

Os ossos participam fundamentalmente do crescimento das aves. Sustentam a força de transmissão para contração muscular e movimentos, sofrem os reflexos da deposição mineral e realizam hematopoese (BENEZ, 2001). Os ossos das asas e pernas são arquetados visando a leveza e o córtex de alguns ossos como do úmero e fêmur, é extremamente fino. Tais modificações auxiliam o voo, mas aumentam a fragilidade do esqueleto (FOWLER, 1995).

O processo de maturação dos ossos longos nas aves é significativamente diferente dos mamíferos e o significado clínico desse fato é frequentemente negligenciado e não reconhecido. Fowler (1980), avaliando radiografias de abutres com doença osseometabólica verificou que a articulação do cotovelo não era visível. As diáfises umeral, radial e ulnar eram evidentes, mas não a área articular. Isto ocorreu, pois nos abutres o período de maturação óssea é longo, sendo necessário mais tempo para que a ossificação seja concluída. A imaturidade e ossificação mais longa oferece uma imagem radiográfica não usual de um membro parcialmente ossificado, impossibilitando a visualização das articulações formadas – sendo assim particularmente diferente dos mamíferos, que possuem centros secundários de ossificação e linhas fisárias visíveis radiograficamente.

O osso cresce pela epífise e diáfise. A cartilagem epifiseal tem função de crescimento longitudinal e radial dos ossos longos, um modelo para crescimento. A cartilagem epifisária desaparece na “puberdade”, cessando o crescimento longitudinal. Os fatores que controlam o crescimento ósseo atuam sobre as características da cartilagem epifisária sendo individuais e hereditários. Crescimento é um termo utilizado genericamente, determinado pela somatória do aumento de tamanho e ganho de peso,

mas o que ocorre nos animais jovens é um aumento de proteína corporal e deposição de gordura, já animais adultos apresentam somente ganho de peso (BENEZ, 2001).

A taxa que a extremidade de um osso em crescimento avança é em função do número de divisões celulares da placa de crescimento cartilaginosa, frequência com que ela se divide e o tamanho que ela irá atingir antes de ser mineralizada. Algumas aves possuem pernas longas (como os flamingos, por exemplo), pois seus ossos crescem rapidamente ao invés de crescerem por um longo período. Se comparadas as aves de pernas curtas, taxas de crescimento de 1mm/dia não são incomuns (KIRKWOOD, 2000).

A cortical óssea é similar em ambos os sexos, mas, em fêmeas, a cavidade medular (porção interna do osso) é muito instável e é a maior reserva de cálcio para a formação do ovo (TULLY, 2002). O trabeculado ósseo é estabelecido a partir do endóstio e o esqueleto aumenta em 20% sua quantidade de cálcio, fenômeno chamado de hiperostose poliostótica (HP), visível radiograficamente, seguido por reabsorção óssea uma vez que a casca do ovo é mineralizada (O'MALLEY, 2005).

Ossos de galinhas poedeiras têm sido utilizados como um modelo *in vivo* para estudar o processo de remodelamento ósseo. As razões para a utilização deste sistema são: 1) ossos medulares não possuem função de peso e rolamento 2) O sistema se dá sobre condições fisiológicas 3) o *turnover* dos ossos medulares é um processo rápido já que é relacionado com um ciclo de 24 horas para postura (VAN DE VELDE *et al.*, 1984), além disso, os ossos medulares estão envolvidos somente com a formação da casca do ovo (VAN DE VELDE *et al.*, 1985).

A radiologia é um dos exames complementares de grande utilidade no diagnóstico e prognóstico na medicina veterinária. É um procedimento não invasivo, de baixo custo e disponível em diversas clínicas e hospitais veterinários. A presença de sacos aéreos favorece a visualização radiográfica interna. A radiologia é útil não somente para o diagnóstico dos distúrbios musculoesqueléticos, como também na avaliação da integridade dos sistemas respiratório, gastrointestinal, cardiovascular e urogenital (CUBAS; GODOY, 2006).

A determinação do conteúdo mineral ósseo fornece uma importante informação a respeito do sistema musculoesquelético, podendo ser realizada por métodos invasivos

ou não (LOUZADA, 2002). A densitometria óptica radiográfica (DOR) é um dos métodos não invasivos utilizados para inferir o conteúdo mineral de ossos, através de suas imagens radiográficas (LOUZADA, 1994). Esta avaliação fornece valores relacionados a uma escada de alumínio, material este que exibe uma curva de absorção de radiação X semelhante à dos ossos (MACK *et al.*, 1959; OWEN, 1956), radiografado concomitantemente ao objeto de estudo (LOUZADA, 1998).

Estudos de DOR permitiram a utilização de aves como modelos clínicos na veterinária, em estudos a respeito de osteoporose ou mesmo para estudos arqueológicos ou paleontológicos (DIRRIGL, 2001; DIRRIGL *et al.*, 2004).

Desta forma, a ampliação do conhecimento dos processos de desenvolvimento esquelético nas aves, poderá contribuir para a resolução de complicações ortopédicas que são uma das principais ocorrências na casuística clínico/cirúrgica desta classe de vertebrados. E ainda da mesma maneira, trazer esclarecimentos aos grandes prejuízos que a indústria avícola sofre, decorrente de traumas que afetam especialmente os membros pélvicos na finalização do processo de produção de aves de corte.

1.1 HIPÓTESES

Existe dificuldade de avaliação radiográfica diagnóstica antes dos 20 dias de vida, impedindo a avaliação clínica de doenças musculoesqueléticas (congenitas ou não) em *C. japonica*;

As articulações são visualizadas radiograficamente antes dos 60 dias de vida, caracterizando um crescimento rápido e exponencial;

O maior ganho de peso animal se dá nos primeiros 60 dias de vida, deixando clara a necessidade de grande aporte energético e de qualidade alimentar neste período;

A densidade mineral óssea em fêmeas é maior que em machos pela necessidade de aporte de cálcio para a postura, principalmente no período antes da reprodução, mesmo em animais jovens;

Os tecidos moles influenciam a densidade óssea de *C. japonica*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Estudar o crescimento ósseo dos ossos longos dos membros pélvicos (tibiotalarso e fêmur) e asas (rádio/ulna e úmero) de codornas-japonesas (*Coturnix japonica*)

1.2.2 Objetivos específicos

1 - Determinar o padrão radiográfico do desenvolvimento ósseo epifisário de tibiotalarso e fêmur e rádio/ulna e úmero em *Coturnix japonica*, fazendo correlação com maturidade, densidade óssea, peso vivo e biometria;

2 - Verificar com quantos dias de vida são visualizados os primeiros sinais de ossificação radiograficamente na codorna-japonesa;

3 - Verificar com quantos dias de vida ocorre radiograficamente o fechamento das fises ósseas, caracterizando a codorna-japonesa como um indivíduo adulto;

4 - Mensurar a densidade óssea da codorna-japonesa, avaliando sua evolução densitométrica;

5 – Avaliar a presença de hiperostose polióstótica nas fêmeas de codorna-japonesa na época de postura radiograficamente e verificar se há diferença na densidade óssea em tal período;

6 – Verificar a influência de tecidos moles na densidade óssea de codorna-japonesa.

1.3 REFERÊNCIAS

AINSWORTH, S.J.; STANLEY, R.L.; EVANSÁCO, D.J.R. Developmental stages of the Japanese quail. **Journal of Anatomy**. v. 216, p3–15, 2010.

BENEZ, S.M. Esqueleto, articulações e músculos. In: BENEZ, S.M. **Aves, criação, clínica, teoria, prática, silvestres, ornamentais, avinhados**. São Paulo: Robe Editorial, 2001, p. 87-94.

CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. Medicina e patologia de aves de companhia. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Caetano do Sul: Interbook, 2006, p. 213-264.

DIRRIGL, F.J. JR. Bone mineral density of wild turkey (*Meleagris gallopavo*) skeletal elements and its effect on differential survivorship. **Journal of Archaeological Science**, v. 28, p. 817-832, 2001.

DIRRIGL, F.J.; DALSKY, G.P.; WARNER, S.E. Dual-energy x-ray absorptiometry of birds: an examination of excised skeletal specimens. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p.313-319, 2004.

FOWLER, M. E. Ossification of long bones in raptors. In: COOPER, J.E.; GREENWOOD, A.G. **Recent advances in the study of raptor diseases**. London: Chiron Publications, 1981, p.75-82.

FOWLER, M.E. Birds. **Restraint and handling of wild and domestic animals**. 2nd ed, Iowa: Wiley Blackwell. 1995, p. 305.

KIRKWOOD, J. Management related diseases. In: SAMOUR, J. **Avian medicine**. Edinburg: Elsevier, 2000, p. 174-175.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. RBE- **Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998.

LOUZADA, M.J.Q. **Otimização da Técnica de Densitometria Óptica em Imagens radiográficas de peças ósseas: estudo "In Vitro"**. 1994. 191f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Campinas, São Paulo, 1994.

LOUZADA, M. J. Q. Densitometria óptica radiográfica na mensuração da densidade mineral óssea de coelhos em crescimento. / Radiographic absorptiometry for measuring bone mineral density in growing rabbits. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, Vol. 18, nº 2,

107-110, 2002.

MACK, P.B.; VOSE, G.P.; NELSON, *I.D.* New development in equipment for the roentgenographic measurement of bone density. **American Journal of Roentgenology**, v. 82, n. 2, p. 303-310, 1959.

O'MALLEY, B. Avian anatomy and physiology. In: O'MALLEY, B. **Clinical anatomy and physiology of exotic species**. Philadelphia: Elsevier, 2005, p. 97-101.

OWEN, M. Measurement of the variations in calcification in normal rabbit bone. **Journal Of Bone and Joint Surgery**, v. 38, n. 3, p. 762-769, 1956.

TULLY, T.N. Basic avian bone growth and healing. In: TULLY, T.N. **The veterinary clinics of north america: exotic animal practice, vol. 5, orthopedics**. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p. 23-31.

VAN DE VELDE, J.P.; LODERIDGE, N.; VERMEIDEN, J.P.W. Parathyroid hormone responses to calcium stress during eggshell calcification. **Endocrinology**. V. 115, n. 5, p. 1901-1904, 1984.

VAN DE VELDE, J.P.; VERMEIDEN, J.P.W.; HAGEN, B.J.; VAN GINKEL, F.C.; PRAHL-ANDERSEN, B. Histological and radiological quantification of estradiol-induced medullary bone formation and osteoclast activity in male quail. **Bone**, v. 6, p. 391-393, 1985.

2 O ESQUELETO DAS AVES – PECULIARIDADES, MATURAÇÃO E DENSIDADE

2.1 AS AVES

A habilidade de voar permitiu que as aves ocupassem uma ampla diversidade de habitats e desenvolvessem diversas adaptações no que se refere a sua dieta (KING; MCLELLAND, 1984). As aves evoluíram dos répteis, e muitas similaridades permaneceram. Como seus antepassados, aves possuem escamas nos membros pélvicos, um côndilo occipital, um osso no ouvido médio, mandíbula e maxila com cinco ossos fundidos (QUESENBERRY *et al.*, 1997), eritrócitos nucleados, presença de sistema porta-renal e excreção de ácido úrico (MAINA, 1996). Enquanto répteis e mamíferos existem em abundante diversidade, o fator “voo” faz com que haja menos variações de espécie para espécie, ou seja, existem menos variações morfológicas entre as espécies aviárias do que dentro da ordem *Carnivora* (com quase 300 espécies) (MAINA 1996), por exemplo. Recentemente verificou-se que o Brasil conta com 1920 espécies de aves reconhecidas (PIACENTINI *et al.*, 2015).

Aves são endotérmicas, conseguindo manter sua temperatura corpórea estável independente da temperatura ambiental, ao contrário dos seus antepassados reptilianos. Sua temperatura é cerca de três graus mais alta que a dos mamíferos, logo, altas taxas metabólicas são necessárias para mantê-las e possibilitar o voo. O gasto energético de uma ave é muito alto, consumindo cerca de 20 a 30 vezes mais energia comparada a quantidade de energia consumida por um réptil de mesmo tamanho. Consequentemente, seus sistemas circulatório e respiratório precisaram evoluir para fornecer energia e oxigênio suficiente para as células (DORRESTEIN, 1997). A capacidade do voo é permitida por uma soma de adaptações tanto fisiológicas como estruturais, a postura corporal bípede as diferencia da maioria dos outros vertebrados e implica em especial distribuição de cargas e forças (LANGE; BRANCO, 2009).

2.2 O SISTEMA ESQUELÉTICO E SUAS DIFERENÇAS

O sistema esquelético das aves evoluiu como um aparelho eficiente, resistente, leve e aerodinâmico apresentando adaptações específicas que, juntamente com penas, músculos, sistemas circulatório e respiratório especializados, permitem o voo (MACWHIRTER, 2010).

Devido à necessidade de diminuição de peso corpóreo, mecanismos foram desenvolvidos, como a presença de ossos pneumáticos conectados com sacos aéreos, presentes no crânio, vértebras, pelve, esterno, costelas, úmero e fêmur. Os demais ossos possuem grandes cavidades medulares e corticais finas. Espículas interligadas crescem a partir da superfície endosteal do córtex e se estendem pela cavidade medular o que melhora a resistência, ao passo que adiciona um mínimo de peso proporcionando um local para armazenamento de cálcio – os chamados ossos medulares (MACWHIRTER, 2010). Segundo Fowler (1981), o processo de maturação dos ossos longos de aves é significativamente diferente dos mamíferos e o significado clínico desse fato é frequentemente negligenciado e não reconhecido. Por se tratar de uma estrutura leve, os ossos aviários apresentam maior teor de cálcio e maior resistência à tração que seus correspondentes mamíferos. Muitos ossos são fundidos, reduzindo estrategicamente seu peso, aumentando resistência e aperfeiçoando a aerodinâmica (MACWHIRTER, 2010).

O crescimento e a ossificação ocorrem a partir de uma área cartilaginosa na ponta de cada osso. Não existe, radiograficamente, uma placa de crescimento óbvia como existe em mamíferos, já que a epífise não é ossificada conforme o crescimento ocorre (HOCHLEITHNER *et al.*, 2002). As aves possuem alta taxa de crescimento e atingem seu peso e tamanho adulto em uma cronologia surpreendentemente mais rápida do que mamíferos de mesmo peso. Estas altas taxas de crescimento determinam dispêndio energético, podendo aumentar de três a quatro vezes neste período (KIRKWOOD, 1999).

Dentre as diversas modificações que diferenciam as aves dos mamíferos, pode-se citar o processo respiratório diferenciado, sendo a troca gasosa superior com a respiração ativa, ulna maior que o radio e o reduzido número de ossos, incluindo a

fusão dos ossos metacarpais nas asas, dos tarsais proximais nas tíbias (formando o tibiotarso) e dos ossos tarsais distais fusionados nos metatarsos, que formam os tarsometatarsos (SCHMIDT *et al.*, 2015).

Dentro da classificação proposta por Benez (2001), os ossos podem ser classificados de quatro formas: longos, curtos, chatos e irregulares. Os ossos longos, maiores responsáveis pelo crescimento, possuem epífises (nas extremidades), cartilagem epifisária de junção, metáfise e diáfise. O osso cresce a partir da epífise e pela diáfise e são controlados por fatores individuais e hereditários. A cartilagem tem função de crescimento longitudinal e radial dos ossos longos, sendo modelo para o crescimento, mas desaparece na puberdade, que em codornas (*Coturnix* sp.) é atingida em média aos 35 dias de vida, cessando o crescimento longitudinal dos ossos (ALMEIDA *et al.*, 2002)

Doenças que envolvem os ossos podem ser provenientes de distúrbios da placa de crescimento por existir ampla variação na taxas e padrões de crescimento ósseo nas diferentes espécies (KIRKWOOD, 2000) logo, é de suma importância o conhecimento dos padrões de crescimento do esqueleto aviário, tanto se tratando de animais de produção, como espécies mantidas como *pets*.

2.3 CÁLCIO E FATORES QUE INFLUENCIAM SEU METABOLISMO

Decorrente das altas taxas metabólicas, as aves são modelos fisiológicos adequados para estudos esqueléticos e de metabolismo mineral. Anormalidades do metabolismo do cálcio são comuns na indústria avícola, levando a diminuição de produção e defeitos de crescimento, principalmente discondroplasia tibial em frangos de corte (EDWARDS *et al.*, 1994). Devido a importância da economia avícola, o metabolismo deste mineral tem sido pesquisado na cadeia produtiva, incluindo sua importância na dieta bem como sua interação com a luz ultravioleta, especialmente o espectro UV-B (EDWARDS *et al.*, 1994). Em aves *pets* mantidas em cativeiro, problemas do metabolismo de cálcio também são comuns e variam de osteodistrofia em aves jovens (visto a grande necessidade de cálcio para o crescimento), convulsões

hipocalcêmicas e retenção de ovos (LUMEIJ, 1994). Muito do atual conhecimento a respeito do metabolismo do cálcio em aves silvestres tem sido extrapolado de trabalhos da indústria avícola (STANFORD, 2006).

O cálcio desempenha dois papéis importantes nas aves: fornece força estrutural para o esqueleto pela formação dos sais de cálcio e é vital para muitas das reações bioquímicas intracorpóreas pela sua concentração no fluido extracelular (DACKE, 2000). O controle do metabolismo do cálcio em aves tornou-se um sistema homeostático altamente eficiente, capaz de responder rapidamente a altas demandas de requerimento de tal mineral, seja ele no desenvolvimento e crescimento ou para produção de ovos (BENTLEY, 1998; DACKE, 2000).

Os fatores mais importantes no metabolismo do cálcio são: o hormônio paratireóideo (PTH), a vitamina D e a calcitonina, fatores estes que, como nos mamíferos, regulam tal elemento agindo no fígado, rins, trato gastrointestinal e ossos. Estrógeno e prostaglandinas também desempenham papel na regulação do cálcio em aves (BENTLEY, 1998; DACKE, 2000).

O cálcio existe em três frações no soro das aves: 1) sal ionizado 2) ligado as proteínas e 3) como um complexo ligado a uma variedade de ânions (citrato, bicarbonato e fosfato). O cálcio ionizado é a fração fisiologicamente ativa do cálcio no soro, com um papel importante na homeostase óssea, muscular, condução nervosa, coagulação sanguínea e secreção hormonal como vitamina D3 e PTH. A maior parte do cálcio é ligada com proteínas plasmáticas (albumina) e considerada fisiologicamente inativa. Qualquer mudança nos níveis de albumina sérica irá afetar o nível de cálcio (STANFORD, 2006). Existem grandes diferenças na regulação do cálcio entre aves e mamíferos, principalmente, no que diz respeito à taxa metabólica nas fases de alta demanda. A galinha doméstica responderá a desafios hipocalcêmicos mobilizando cálcio para manter sua homeostase dentro de minutos, embora nos mesmos desafios, mamíferos tendem a levar mais de 24 horas para tal mobilização mineral (KOCH, 1984). Isso é facilmente demonstrado por uma ave de postura, quando 10% de suas reservas corpóreas de cálcio podem ser necessárias para produção de ovos em um período de 24 horas (KLASING, 1998). O cálcio requerido para a produção da casca do ovo é obtido, sobretudo, do aumento da absorção intestinal e de uma alta reserva disponível

nos ossos medulares, normalmente visíveis radiograficamente nas fêmeas. O controle homeostático dos ossos medulares envolve a atividade do estrógeno (BENTLEY, 1998).

O paratormônio, produzido nas glândulas paratireóideas, possui ação essencialmente hipercalcêmica em aves, bem como em mamíferos (DACKE, 2000). Ele é produzido em resposta a um baixo nível de cálcio sérico e age influenciando a excreção do cálcio e fósforo (STANFORD, 2006). Sob a influência do PTH, a secreção renal tubular de fosfato aumenta enquanto a reabsorção tubular diminui, resultando em aumento da diurese e diminuição na concentração plasmática do fosfato. O PTH também regula a vitamina D e aumenta a absorção do cálcio proveniente do osso (LUMEIJ, 1994).

A vitamina D3 controla o metabolismo ósseo pela regulação da absorção do cálcio (ASLAM *et al.*, 1998). A vitamina D, ocorre naturalmente em plantas como o ergocalciferol (chamada de vitamina D2). Em mamíferos, as vitaminas D2 e D3 são bem absorvidas, porém, em aves, o ergocalciferol proveniente da dieta não é bem utilizado pelo alto *clearance* renal (KLASING, 1998).

A calcitonina é secretada pela glândula ultimobranquial, que se localiza próxima a glândula paratireóide (CUTLER, 1974). Ao contrário dos mamíferos, em aves a calcitonina não induz hipocalcemia em animais normocalcêmicos, e sim, controla a hipercalcemia protegendo o sistema esquelético de reabsorção excessiva de cálcio (BAIMBRIDGE, 1981).

O estrógeno, hormônio sexual feminino, se liga ao cálcio e sua produção é seguida por um aumento no cálcio sérico, hipercalcemia esta, que não ocorre em mamíferos. Sugere-se que ocorra em aves pela necessidade de cálcio para a produção da casca do ovo, já que estas requerem uma fonte de mobilização rápida de tal mineral. Estrógenos também influenciam a mobilização de cálcio dos ossos medulares durante o ciclo de postura (BENTLEY, 1998; DACKE, 2000).

As prostaglandinas são facilitadores da reabsorção óssea e possuem efeitos hipercalcêmicos similares aos metabólitos do paratormônio e da vitamina D3, agindo sobre os osteoclastos (DACKE, 2000).

Durante a postura, uma grande quantidade de cálcio e fósforo é absorvida da

dieta e depositada nos ossos medulares, podendo preencher o osso completamente. Este período de deposição coincide com o aumento da atividade osteoblástica. Quando a fêmea inicia a deposição da casca do ovo, o cálcio presente no interior do osso é reabsorvido pela atividade osteoclástica. O cálcio se deposita na casca do ovo como carbonato de cálcio e o fósforo é excretado do corpo (LUMEIJ, 1994).

2.4 RADIOGRAFIA E HIPEROSTOSE POLIOSTÓTICA

É essencial que o clínico seja totalmente familiarizado com a anatomia aviária antes de interpretar uma radiografia. Existem interconexões entre estruturas ósseas e sacos aéreos, alguns ossos possuem aparência osteoporótica (que não deve ser considerada anormal) e os córtices de ossos longos são mais delgados que em outras classes de animais (WALSH, 1986).

Para uma interpretação radiográfica precisa, é necessária pelo menos uma exposição ventrodorsal (VD) e outra laterolateral (LL) durante a inspiração. Na posição VD a ave é colocada em decúbito dorsal, evitando a rotação do paciente na mesa. Deve-se procurar alinhar o esterno com a coluna vertebral havendo simetria entre os membros. Na posição LL, os acetábulos devem estar sobrepostos de modo que a ave fique em posição simétrica à mesa. As patas são estendidas e fixadas ventralmente, mantendo a cavidade celomática livre para visualização dos órgãos. A perna sobreposta deve ser fixada mais caudal que a oposta. Como regra geral, deve-se usar uma miliamperagem alta (mAs), kilovoltagem baixa (Kv) e menor tempo de exposição possível (CUBAS; GODOY, 2006).

A cortical óssea é similar em ambos os sexos, mas, em fêmeas, a cavidade medular é muito instável e é a maior reserva de cálcio para a formação do ovo (TULLY, 2002). O trabeculado ósseo é estabelecido do endóstio e o esqueleto aumenta 20% sua quantidade de cálcio, fenômeno chamado de hiperostose polioestótica (HP), visível radiograficamente, seguido por reabsorção óssea uma vez que a casca do ovo é calcificada (O'MALLEY, 2005).

Hiperostose polioestótica é o desenvolvimento de estruturas radiopacas nas

regiões medulares em ossos como o fêmur, ulna, rádio, ossos do cinturão pélvico e vértebras, ossos estes, que normalmente não desenvolvem tal grau de calcificação. Esta condição também está associada a desordens hormonais como tumores ou cistos ovarianos que causam secreção prolongada de estrógeno. Entretanto, essas doenças não estão sempre presentes em aves com HP. Radiograficamente, será visível o aumento da radiopacidade óssea e a extensão do envolvimento ósseo dependerá da duração e da causa, seja ela patológica ou não (SCHMIDT *et al.*, 2015).

Conforme a fêmea se prepara para a postura, espículas e trabéculas progridem do endóstio. Se a estação reprodutiva persistir (com o aumento do estrógeno sérico), mas não houver postura, o osso medular irá preencher completamente a cavidade medular. Durante o ciclo de ovulação e postura, períodos de formação do osso medular e completa depleção irão se alternar. Se o cálcio proveniente da dieta for insuficiente para repor o cálcio utilizado para a formação da casca do ovo, o osso medular será utilizado e a cortical óssea será reabsorvida (SCHMIDT *et al.*, 2015).

Cascas de ovos de galinhas e codornas contém 10% do cálcio corporal total. Cerca de 60% do cálcio da casca é proveniente da ingestão alimentar diretamente, e 40% do esqueleto. (DRIGGERS; COMAR, 1949; JOWSEY *et al.*, 1956). O cálcio do esqueleto é derivado primariamente dos ossos medulares (MUELLER *et al.*, 1964).

2.5 DENSITOMETRIA ÓPTICA RADIOGRÁFICA OU FOTODENSITOMETRIA

A fotodensitometria ou densitometria óptica radiográfica (DOR) possibilita, por meio de radiografias, aferir o densidade mineral óssea facilitando o diagnóstico de osteopenia, monitoramento de densidade óssea em mmAl, respostas a intervenções cirúrgicas e controle e acompanhamento do metabolismo ósseo (MURAMOTO *et al.*, 2005) de forma eficiente, precisa e com baixo custo (LOUZADA, 1994).

Estudos a respeito da densidade óssea são de grande importância, porém, ainda são considerados onerosos dependendo do método utilizado, e o acesso a

determinados equipamentos podem estar restritos a medicina de seres humanos (SYMMONS, 2004).

Ao exame radiográfico convencional, não é possível identificar alterações nas mineralizações ósseas menores que 30% (GARTON *et al.*, 1994). A DOR é um dos métodos utilizados para inferir o conteúdo mineral de ossos, por meio de imagens radiográficas (LOUZADA, 1994). Um dos maiores benefícios da técnica sugeridos por Markel e Bogdanske (1994) é a detecção precoce de distúrbios no processo de recuperação das injúrias ocorridas no tecido ósseo. Louzada (1997) verificou que o método densitométrico em imagens radiográficas é eficiente e evidenciou tal fato quando comparou a média dos valores da densidade óssea, expressos em milímetros de alumínio, com as médias dos percentuais de cálcio presentes em peças ósseas de frangos de corte.

O processo de mineralização óssea se dá pela deposição de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita, conferindo a rigidez ao tecido ósseo, sendo responsável por 70% da composição do osso (BRUNO, 2002) A densidade da hidroxiapatita é muito semelhante à densidade do alumínio, desta forma, relacionou-se o grau de mineralização óssea a densidade do alumínio, concluindo-se que a comparação da quantidade de cálcio e fósforo depositados nos ossos com a quantidade de alumínio encontrada em uma escala pré definida, é possível mediante um estudo radiográfico (ALMEIDA PAZ *et al.*, 2005).

Para realização da avaliação da densidade do osso através da DOR, é necessário realizar uma curva densitométrica no filme radiográfico com a utilização de uma escada de alumínio (ou penetrômetro) com diferentes espessuras. Tal curva servirá como a representação dos valores da densidade óptica das imagens presentes na radiografia (no caso, dos ossos) equivalentes à espessura da escada de alumínio e os valores serão expressos na unidade de milímetros de espessura de alumínio (mmAl) (LOUZADA *et al.*, 1998).

Os métodos comumente utilizados para a mensuração da densidade óssea são: a tomografia computadorizada quantitativa, que possui alta sensibilidade, no entanto, é cara e a dose de radiação é 30 vezes maior que a utilizada na técnica conhecida como DEXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*), ou absorciometria por dupla emissão de

Raio-X, que possui uma fonte de irradiação mais estável. A absorção de fótons de uma energia (SPA) foi o primeiro método não-invasivo utilizado, mas necessita de mínima quantidade de tecido mole para uma boa acurácia da técnica. O DEXA surgiu para suprir as limitações da SPA, porém o tempo necessário para o exame é longo (de 20 a 40 minutos) (GRIER *et al.*, 1996).

Em estudo comparando DOR com análises bioquímicas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina em gatos com hiperparatireoidismo nutricional secundário, Rahal (2002) verificou que a fotodensitometria foi mais eficiente na avaliação da desmineralização do que as análises séricas, comprovando a sensibilidade da técnica.

2.6 CONCLUSÃO

A estrutura esquelética das aves é única, sem similaridade com qualquer outra classe de vertebrados. As modificações esqueléticas sofridas ao longo da evolução e da especiação são fundamentais para o acesso aos ares e com isto uma grande vantagem ecológica. A cronologia do desenvolvimento esquelético e a sua maturidade nas diversas ordens ou mais diversas espécies ainda é pouco ou insuficientemente conhecida. Haveriam padrões filogenéticos nestes parâmetros?

Correlacionar o desenvolvimento esquelético com a longevidade, o porte e tamanho, a habilidade para o voo, as competências para a natação, ou o mergulho, entre outras aptidões, poderia render especulações interessantes, haja vista a enorme diversidade de comportamentos frente a estas e outras tantas características. Certamente a ampliação do conhecimento deste compartimento da ornitologia corresponde à grande possibilidade e uma instigante área de conhecimento, com um forte viés com a clínica de aves e a indústria avícola.

Estes foram os motivos que despertaram o interesse em pesquisar o crescimento ósseo visando contribuir para o conhecimento da biomecânica estrutural das aves.

2.7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA PAZ, I. C. L.; MENDES, A. A.; TAKITA, T. S.; VULCANO, L. C.; GUERRA, P. C.; WECHSLER, F. S.; GARCIA, R. G.; TAKAHASHI, S. E.; MOREIRA, J.; PELÍCIA, K.; KOMIYAMA, C. M.; QUINTEIRO, R. R. Comparison of techniques for tibial dyscondroplasia assessment in broilers chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v. 7, n. 1, p. 27-32, 2005.

ALMEIDA, M.I.M.; OLIVEIRA, E.G.; RAMOS, P.R.; VEIGA, N.; DIAS, K. Growth performance of male quails (*Coturnix* sp.) of two lines under two nutritional environments. **Archive of veterinary science**. v.7, n.2, p.103-108, 2002.

ASLAM S.M; GARLICH J.D; QURESHI M.A. Vitamin D deficiency alters the immune responses of broiler chicks. **Poultry Science**, v. 77, n.6, p.842-849, 1998.

BAIMBRIDGE K.G; TAYLOR TG. The role of calcitonin in controlling hypercalcaemia in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Comparative Biochemistry Physiology Part A**, v. 68, p. 647-651, 1981.

BENEZ, S.M. Esqueleto, articulações e músculos. In: BENEZ, S.M. **Aves, criação, clínica, teoria, prática, silvestres, ornamentais, avinhados**. São Paulo: Robe Editorial, 2001, p. 87-94.

BENTLEY P.J. **Comparative Vertebrate Endocrinology**. Cambridge: Cambridge Univ Press, 1998, p. 269-301.

BRUNO, L. D.G. **Desenvolvimento ósseo em frangos de corte: Influência da restrição alimentar e da temperatura ambiente**. Jaboticabal: UNESP, 2002, 72p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de Paulista, 2002.

CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. Medicina e patologia de aves de companhia. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Caetano do Sul: Interbook, 2006, p. 213-264.

CUTLER, G.B.; HABENER, J.F.; DEE, P.C.; PLOTTS, J.T. Comparative immunochemical studies of chicken ultimobranchial calcitonin. **General and Comparative Endocrinology**, v.24, p. 183, 1974.

DACKE, C.G. The parathyroids, calcitonin, and vitamin D. In: WHITTOW G.C. **Sturkie's avian physiology**. 5th ed. San Diego: Academic, 2000. p. 473–488.

DORRESTEIN, G.M. Metabolism, pharmacology and therapy. In: ALTMAN, S.L.;

CLUBB, G.M.; DORRESTEIN, G.M.; QUESENBERRY, K. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: WB Saunders, 1997, p.661-670.

DRIGGERS, J. C.; COMAR, C. L. The secretion of radioactive calcium (Ca) in the hen's egg. **Poultry Science**, n.28, 1949, p.420-424.

EDWARDS J.R.; ELLIOT, M.A.; SOONCHARERNYING, S.; BRITTON, W.M. Quantitative requirements for cholecalciferol in the absence of ultraviolet light. **Poultry Science**, v. 73, p. 288-294, 1994.

FOWLER, M. E. Ossification of long bones in raptors. In: COOPER, J.E.; GREENWOOD, A.G. **Recent advances in the study of raptor diseases**. London: Chiron Publications, 1981, p.75-82.

GARTON, M.J.; ROBERTSON, E.M.; GILBERT, F.J.; GOMERSSAL, L.; REID, D.M. Can radiologists detect osteopenia on plain radiographs? **Clinical radiology**, v.49, p.118-122, 1994.

GRIER, S.J.; TURNER, A.S.; ALVIS, M.R. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. **Investigative Radiology**, v. 31, n. 1, p. 50-62, 1996.

HOCHLEITHNER, C.; HOCHLEITHNER, M.; ARTMANN, A. Avian imaging. In: MEREDITH, A.; REDROBE, S. **BSAVA manual of exotic pets**. England: british small animal veterinary association, 2002, p. 149-156.

JOWSEY, J. R.; BERLIE, M. R.; SPINKS, J. VI. T.; O'NEIL, J. B. Uptake of calcium by the laying hen and subsequent transfer from egg to chick. **Poultry Science**, n. 35, p.1234-1238, 1956.

KING, A.S.; McLELLAND, J. **Birds – Their structure and function**. 2ed. London: Bailliere Tindall. 1984.

KIRKWOOD, J.K. Introduction to birds. In: POOLE, T. **The UFAW handbook: The care and management of laboratory animals**. 7 ed. Oxford: Blackwell Science, 1999, p. 661-670.

KIRKWOOD, J. Management related diseases. In: SAMOUR, J. **Avian medicine**. Edinburg: Elsevier, 2000, p. 174-175.

KLASING K.C. **Comparative Avian Nutrition**. New York: CAB Intl, 1998, p. 290-295.

KOCH J.; WIDEMAN, R.F.; EDWARDS, G.B. Blood ionic calcium response to hypocalcemia in the chicken induced by ethylene glycol-bis-(B-aminoethylether)-N,N'-tetra-acetic acid: Role of the parathyroids. **Poultry Science**, n.63, p.167- 171, 1984.

LANGE, R.R.; BRANCO, D.C. Ortopedia em aves. In: VILANI, R.G.D'O.C.; SCHMIDT, E. M.S. **Avanços na medicina de animais selvagens, medicina de aves**. Curitiba,

2009, p.223-248.

LOUZADA, M.J.Q. **Otimização da Técnica de Densitometria Óptica em Imagens radiográficas de peças ósseas: estudo "In Vitro"**. 1994. 191f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica), Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Campinas, São Paulo, 1994.

LOUZADA, M. J. Q. Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. **Veterinária e Zootecnia**, v. 9, p. 95-109, 1997.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. **RBE- Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998.

LUMEIJ, J.T. Endocrinology. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and application**. Florida: Wingers Publishing Inc, 1994, p.583-606.

MACWHIRTER, P. Anatomia, fisiologia e nutrição básicas. In: TULLY Jr, T.N.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. **Clínica de aves**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 22-34.

MAINA, J.N. Perspectives on the structure and function of birds. In: ROSSKOPF, W.; WOERPEL, R. **Diseases of cage and aviary birds**. 3th ed. Baltimore: William & Wilkins, 1996, p.163-217.

MARKEL, M. D.; BOGDANSKE, J. J. Dual-energy x-ray absorptiometry of canine femurs with and without fracture fixation devices. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n.6, p.862-866, 1994.

MUELLER W.J.; SCHRAER R.; SCHRAER, H. Calcium metabolism and skeletal dynamics of laying pullets. **Journal of Nutrition**, n.84, p.20-26, 1964.

MURAMOTO, C.; STERMAN, F.A.; FONSECA PINTO, A.C.B.C. Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça Poodle por meio da Densitometria Óptica Radiográfica. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Sciences**, v. 42, n. 2, p. 89-97, 2005.

O'MALLEY, B. Avian anatomy and physiology. In: O'MALLEY, B. **Clinical anatomy and physiology of exotic species**. Philadelphia: Elsevier, 2005, p. 97-101.

PIACENTINI, V.Q.; ALEIXO, C.E. AGNE, G.N. MAURÍCIO, J.F. PACHECO, G.A. BRAVO, G.R.R. BRITO, L.N. NAKA, F. OLMOS, S. POSSO, L.F. SILVEIRA, G.S. BETINI, E. CARRANO, I. FRANZ, A.C. LEES, L.M. LIMA, D. PIOLI, F. SCHUNCK, F.R. AMARAL, G.A. BENCKE, M. COHN-HAFT, L.F.A. FIGUEIREDO, F.C. STRAUBE & E. CESARI. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de

- Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n.2, p.91–298, 2015.
- QUESENBERRY, K.; OROSZ, S.; DORRESTEIN, G.M. Musculoskeletal system. In: DORRESTEIN, G.M.; ALTMAN, R.B.; CLUBB, S.L.; DORRESTEIN, G.M. **Avian medicine and surgery**. Philadelphia: WB Saunders, 1997, p. 517-523.
- RAHAL, S.C.; MORTARI, A.C.; CAPORALI, E.H.G.; VULCANO, L.C.; SANTOS, F.A.M.S.; TAKAHIRA, R.K.; CROCCI, A.J. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.421-425, 2002.
- SCHMIDT, R.E.; Reavill, D.R.; Phalen, D.N. Musculoskeletal system. In: SCHMIDT, R.E.; Reavill, D.R.; Phalen, D.N. **Pathology of pet and aviary birds**. 2nd ed. Iowa: Wiley Blackwell, 2015, p.199-220.
- STANFORD, M. Calcium metabolism. In: HARRISON, G.J; LIGHTFOOT, T.L. **Clinical avian medicine volume I**, Florida: Spix Publishing, 2006, p.141-151.
- SYMMONS, R. Digital photodensitometry: a reliable and accessible method for measuring bone density. **Journal of Archaeological Science**, v. 31, p. 711-719, 2004.
- TULLY, T.N. Basic avian bone growth and healing. In: TULLY, T.N. **The veterinary clinics of north america: exotic animal practice, vol. 5, orthopedics**. Philadelphia: WB Saunders, 2002, p. 23-31.
- WALSH, M.T. Radiology. In: HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. **Clinical avian medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1986. p. 202-203.

3 CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO ÓSSEO E DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA EM CODORNA-JAPONESA (*Coturnix japonica*)

3.1 RESUMO

Codornas são aves domésticas, muito utilizadas como modelo experimental e na produção de carne e ovos. O desenvolvimento ósseo nas aves é diferenciado, e, radiograficamente, não existe placa de crescimento óbvia. A densitometria radiográfica (DR) vem sendo utilizada para avaliar e mensurar a densidade óssea. Cinquenta e quatro codornas-japonesas (*Coturnix japonica*) de um dia de vida, de ambos os sexos, foram mantidas com 14 horas de luz por dia, alimentação e água *ad libitum*. A cada três dias, dois animais foram pesados, identificados, submetidos à eutanásia e radiografados. Foi utilizada uma escada de alumínio de 21 degraus para a mensuração densitométrica. Mensurações de comprimento do úmero, rádio, ulna, fêmur, tibiotarso e tarsometatarso foram realizadas. No 16º dia, observou-se o início da fusão dos ossos tarsais. No 25º dia, os carpos ulnares e radiais já estavam fusionados. Aos 40 dias, os ossos társicos já haviam se fusionado à tíbia e a segunda fileira de tarsos apresentava-se fusionada ao metatarso. Entre 52 e 55 dias, a articulação úmero-radioulnar estava fechada e a articulação fêmoro-tibiotársica fechou entre 67 e 70 dias. A densidade óssea aumentou conforme os ossos cresciam em comprimento. O maior coeficiente de correlação ocorreu no úmero, seguido pelo tibiotarso, ulna e fêmur. Nestes ossos, o período de sete a 13 dias diferiu significativamente das demais idades. No úmero e no fêmur, também houve diferença no período de 70 a 79 dias. Entre 61 a 79 dias confirmou-se a presença de hiperostose poliostótica (HP) nos fêmures dos animais analisados. A DR é uma técnica aplicável em *C. japonica* sendo um método acessível e de baixo custo. Os resultados confirmam um grande aumento mineral ao longo do crescimento, bem como durante a postura, e confirma a presença de HP na espécie. Adicionalmente, aos 52 dias foi possível visualizar folículos ovarianos nas fêmeas, e aos 58 dias, nos machos, as glândulas cloacais foram visíveis.

Palavras-chave: Radiografia, raio-x, ave, fise, crescimento ósseo, densidade óssea

3.2 ABSTRACT

Quails are a domestic fowl, widely used as experimental models, and/or meat and egg production. Bone development in birds is distinct and there is no radiographically obvious growth plate. Radiographic densitometry (DR) has been used to evaluate and measure bone density. Fifty-four one day-old Japanese quail (*Coturnix japonica*), of both sexes, were kept in a 14 hours light per day program and had *ad libitum* access to water and feed. Every three days, two animals were weighed, identified, euthanized and x-rayed. A 21 steps aluminum stepwedge was used for densitometric measurements. Length measurements were made in humerus, radius, ulna, femur, tibiotarsus and tarsometatarsus. At 16 days of age, it was observed an outset fusion of the tarsal bones. On the day 25th, the ulnar and radial carpi were already fused. At 40 days, the tarsic bones were fused to the tibia and the second row of the tarsal bones was fused to the metatarsal bone. Between 52 and 55 days of age, the humerus-radioulnar joint was closed; however, the femoral-tibiotarsic joint closed between 67 and 70 days. Bone density increased as the bones grew in length. The highest correlation coefficient was observed in the humerus, followed by tibiotarsus, ulna and femur. The period from 7 to 13 days of age differed significantly from other age groups, in the same bones. The humerus and femur were also different in the period of 70-79 days. Between 61 to 79 days, it was possible to identify polyostotic hyperostosis (PH) in the femurs of evaluated animals. The DR is an applicable technique in *C. japonica* and a low cost method. The results confirm a large mineral deposition increasing during growth, as well as during the laying phase, confirming the presence of PH in this specie. Additionally, after 52 days, it was possible to visualize ovarian follicles in females, and 58 days the cloacal glands were visible in males.

Key-words: X-ray, radiography, avian, fisis, bone growth, bone density

3.3 INTRODUÇÃO

Codornas-japonesas (*Coturnix japonica*) são aves domésticas da ordem dos galináceos, Família Fasianidae e Gênero *Coturnix* (MURAKAMI; ARIKI 1998). Em termos de desenvolvimento, a codorna ainda é um modelo animal experimental muito popular, bem como sua utilização na produção de carne e ovos (AINSWORTH *et al.*, 2010).

Para auxiliar na redução do peso corpóreo, o sistema esquelético de grande parte das aves é caracterizado por um alto grau de pneumatização, primariamente envolvendo ossos do esqueleto proximal, como úmero, coracóide, esterno, cinturão pélvico e fêmur. Seus ossos se caracterizam por um córtex fino com um padrão trabecular muito delicado. Os ossos longos contêm ar, assim como, em menor grau, outras partes do esqueleto (DEMIRASLAN *et al.*, 2014).

O desenvolvimento ósseo nas aves é diferenciado e, radiograficamente, não existe placa de crescimento óbvia como nos mamíferos. A ossificação e o crescimento ocorrem a partir de uma área cartilaginosa presente nas epífises. Com a persistência de partes cartilaginosas nas aves jovens, o esqueleto é pouco evidenciado radiograficamente (KRAUTWALD-JUNGHANNS *et al.*, 2010).

A radiologia é um dos exames complementares de maior utilidade no diagnóstico e prognóstico na clínica aviária. É um procedimento não invasivo, de baixo custo e facilmente acessível. As aves possuem sacos aéreos, que favorecem a visualização radiográfica interna e os órgãos apresentam pouca mobilidade. A radiografia é útil não somente para o diagnóstico dos distúrbios musculoesqueléticos, como também na avaliação da integridade dos sistemas respiratório, gastrintestinal, cardiovascular e urogenital (CUBAS; GODOY, 2006).

A cortical óssea é similar em ambos os sexos, mas, em fêmeas, a cavidade medular é muito instável e é onde reside a maior reserva de cálcio para a formação da casca do ovo (TULLY, 2002). O trabeculado ósseo é estabelecido do endóstio e o esqueleto aumenta em 20% sua quantidade de cálcio, fenômeno chamado de hiperostose polioestótica (HP), visível radiograficamente, seguido por reabsorção óssea uma vez que a casca do ovo é calcificada (O'MALLEY, 2005). Este fenômeno ocorre

pelo aumento de estrógeno sérico (época reprodutivamente ativa das fêmeas), levando ao aumento de radiopacidade das cavidades medulares, principalmente nos ossos longos. Essa intensificação de radiopacidade se dá pelo aumento da espessura do osso compacto e fixação do depósito de cálcio dentro da cavidade medular (DEMIRASLAN *et al.*, 2014), podendo também ocorrer em machos com tumores nas células de sertoli e em fêmeas com tumores ovarianos, sendo necessária a diferenciação de casos fisiológicos (MACWHIRTER, 2010).

Imagens radiográficas típicas de ossos pneumáticos são verificadas por um córtex radiopaco em torno de um sistema de pequenas trabéculas ósseas conectadas e ao exame radiográfico convencional, não é possível identificar alterações nas mineralizações ósseas menores que 30% (GARTON *et al.*, 1994).

A densitometria radiográfica (DR) tem sido utilizada para avaliar a densidade óssea (DO), sendo referida como recurso útil no diagnóstico e orientação terapêutica em relação ao tratamento de doenças osseometabólicas, estudo de reparação óssea de fraturas e procedimentos cirúrgicos (LOUZADA, 2001). Devido aos altos custos para se adquirir aparelhos sofisticados para a realização de exames rotineiros de densidade óssea, a DR passa a ser uma opção barata, precisa e eficiente, sendo poucos equipamentos necessários para a realização de exames de rotina (CAMARGO FILHO, 2014).

Visto os diferentes períodos de ossificação, o objetivo do trabalho foi determinar o padrão radiográfico do desenvolvimento ósseo em ossos longos em codorna-japonesa, fazendo correlação com maturidade e densidade óssea, bem como avaliar se há diferença densitométrica nos ossos das fêmeas em período de postura.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil, sob protocolo número 065/2014.

Cinquenta e quatro codornas-japonesas (*Coturnix japonica*), de um dia de vida, provenientes da Fazenda Experimental da UFPR, de ambos os sexos, foram utilizadas. Do primeiro ao 14º dia de vida, os animais foram mantidos em duas gaiolas de alumínio de 50x50x50cm de tamanho, com jornal como substrato, mantidos sob temperatura média de 28,7°C. A partir do 15º dia de vida, os animais foram divididos em sete gaiolas aleatoriamente e a temperatura média foi de 25,3° C. Alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*, recebendo ração de cria/recria até os 55 dias e ração para postura até 79º dia, final do experimento O regime de luz foi estabelecido em 14 horas por dia controlado por um *timer* digital programável (FDD-60/SB2, G20, Santa Catarina).

TABELA 1: Quantidade de cálcio, fósforo e proteína bruta nas rações fornecidas as codornas-japonesas (*Coturnix japonica*) nas diferentes fases do crescimento.

Ração	Cálcio	Fósforo	Proteína bruta
Cria/Recria	9 g/Kg	3 g/Kg	22 g/Kg
Postura	37g/Kg	6,2 g/kg	210g/Kg

A cada três dias, dois animais foram pesados em balança de 300g Pesola® (*Rebmattli* 19, CH-6340 *Baar, Switzerland*), identificados, submetidos à eutanásia e radiografados. Para a radiografia, a projeção ventrodorsal (VD) foi utilizada, em aparelho digital (*Agfa Healthcare* CR-30-X, DS5302, *Mortsel, Belgium*) com técnica de 40 kVp, 100mAs (HARCOURT-BROWN, 2005) e distância aparelho-chassi de 35cm. Os corpos dos animais foram presos ao chassi com fita adesiva do tipo micropore no pescoço, asas e tarsometatarsos (Fig. 1). Em todas as radiografias, utilizou-se uma

escada de alumínio (penetrômetro) de 21 degraus (diferentes espessuras de alumínio) para posterior determinação da densitometria com o software *ImageJ* 1.48v (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA – Public Domain*) (Fig. 2) e calibração para biometria. Mensurações de comprimento de úmero, rádio, ulna, fêmur, tibiotarso e tarsometatarso dos membros direito foram feitas, em milímetros, utilizando o mesmo software.



FIGURA 1: Animal preso ao chassi para realização de radiografia. P: penetrômetro. Asteriscos marcam as áreas presas com micropore para correto posicionamento e posterior interpretação (pescoço, asas e tarsometatarsos).

Todas as radiografias foram analisadas individualmente para avaliação de radiopacidade óssea, anormalidades, avaliação de articulações, grau de ossificação epifisária bem como cálculo da DR. Os valores da DO do úmero, ulna, fêmur e tibiotarso direitos, foram convertidos em milímetros de alumínio, segundo técnica de Louzada (1998) (Fig. 3).



FIGURA 2: Interface do programa *ImageJ* com a radiografia de um animal de 43 dias. Pontilhado: área de interesse (ulna) selecionada para verificar a quantidade de tons de cinza presente na área. P: barra de ferramentas do programa. R: resultados calculados a partir da área (area) selecionada com a média (mean) de tons de cinza, utilizada para cálculo da densidade óssea.

Na asa, as mensurações foram feitas da seguinte forma: para o úmero, uma linha reta foi feita do meio da cabeça do úmero até próximo à fossa coronóidea. Para a ulna, uma linha paralela foi feita da diáfise do olécrano a diáfise da cabeça da ulna e para o rádio, a linha foi feita da cabeça do rádio à diáfise do processo estilóide do rádio. Para o membro inferior, no fêmur, uma linha foi traçada do meio da cabeça do fêmur ao côndilo medial. No tibiotarso, a linha foi traçada da epífise da área intercondilar anterior até o côndilo do tibiotarso e no tarsometatarso, a linha foi traçada da articulação intertarsiana até a articulação metatarsofalângica.

Para realização da análise estatística, foram realizados os testes t, regressão linear e ANOVA *two-way* com o programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software, Inc.*), para isso, os animais foram divididos em grupos por idades: 1 a 19, 22 a 37, 40 a 58 e 61 a 79 dias de vida, e dentro destes grupos, em sexo.

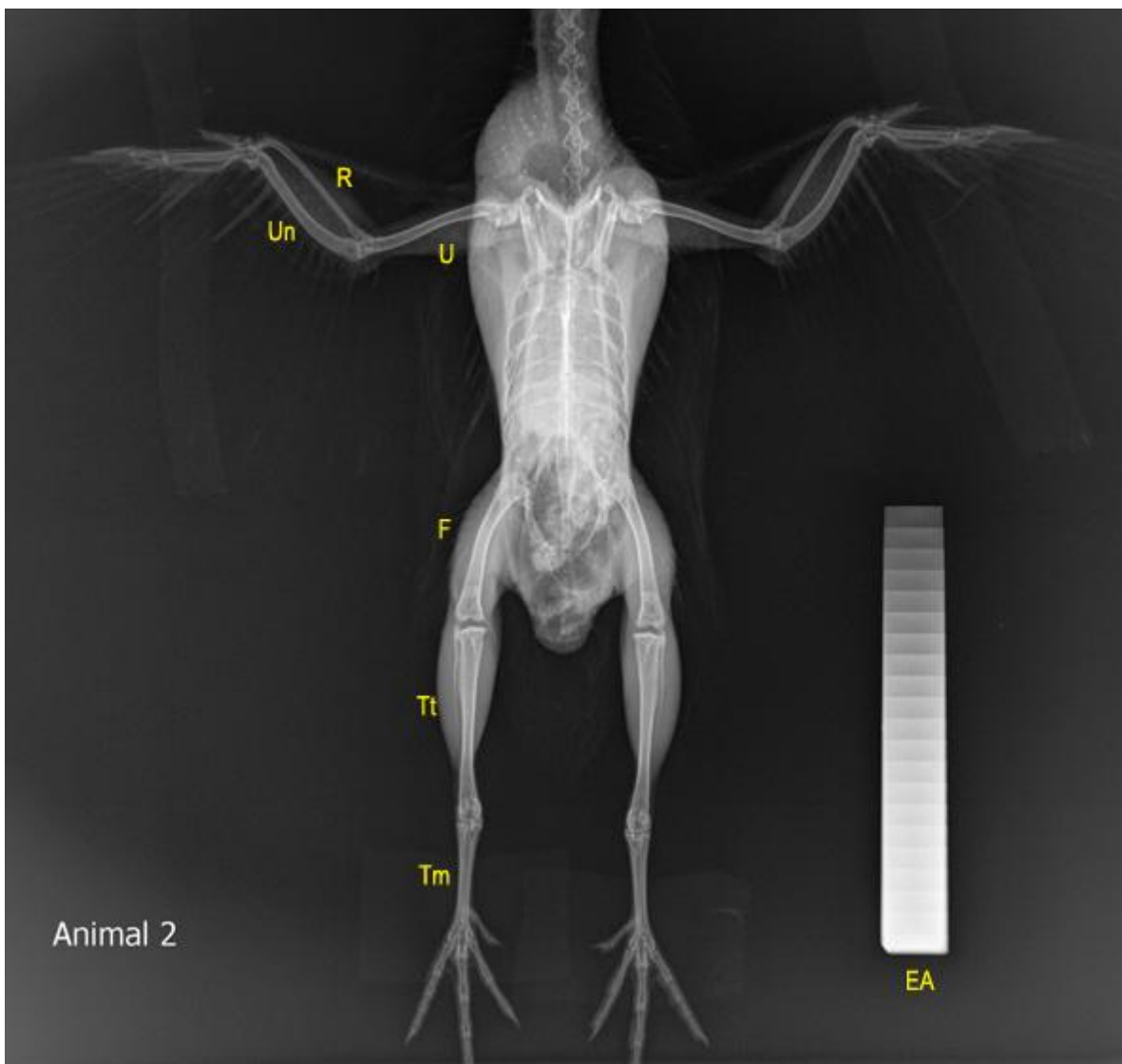


FIGURA 3: Radiografia ventrodorsal de *Coturnix japonica* aos 43 dias de idade, com a escada de alumínio (EA) de 21 degraus utilizada para a realização dos cálculos de densitometria. U: úmero, R: rádio, Un: ulna, F: fêmur, Tt: tibiotarso, Tm: tarsometatarso.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do primeiro ao quarto dia, não foi possível mensurar o úmero, rádio e a ulna pela dificuldade de visualizá-los radiograficamente pela baixa radiopacidade dos ossos neste período. A partir do sétimo dia, somente o rádio ainda não era delimitável. No décimo dia, a mudança de radiopacidade foi evidente, já sendo possível evidenciar a álula, os

metacarpianos e a fíbula. No dia 16, foi possível visualizar o início da fusão dos ossos tarsais. No 25º dia, os carpos ulnares e radiais já estavam fusionados. Aos 28 dias os ossos társicos já haviam se fundido, parecendo agora somente uma única estrutura, já sendo possível a visualização das patelas. Aos 37 dias a cabeça do úmero já podia ser delimitada. Aos 40 dias, os ossos társicos já haviam se fundido à tibia, formando o tibiotarso, e a segunda fileira de tarsos se apresentava fusionada ao metatarso, formando o tarsometatarso.

Em contraste aos mamíferos, as epífises de aves em crescimento não exibem zonas epífiseais de ossificação, com a exceção da junta intertarsal. Durante a maturação da junta intertarsal, cada um dos ossos tarsais se desenvolve separadamente. Em aves, a primeira fileira de ossos tarsais se funde com a tibia para formar o tibiotarso, e o tarsometatarso se desenvolve da fusão dos ossos tarsais distais, com o metatarso (KRAUTWALD-JUNGHANS *et al.*, 2011). Aos 43 dias houve o fechamento dos dígitos, e entre 52 e 55 dias, a articulação úmero-radioulnar estava fechada. Apesar da grande diversidade de espécies aviárias, sendo mais de 1900 só no Brasil (PIACENTINI *et al.*, 2015), estudos a respeito de maturidade esquelética são escassos. Um estudo pioneiro foi realizado por Fowler (1981), onde se verificou que a maturidade esquelética em abutres se dá antes dos 60 dias de vida, porém, tais animais além de se tratarem de rapinantes, possuíam doença ósseometabólica, condição esta que pode ter influenciado o estudo.

Aos 52 dias foi possível visualizar folículos ovarianos nas fêmeas. Aos 58 dias verificou-se nos machos, na região cloacal, a presença de uma área bem delimitada, ovalada, com radiopacidade reduzida, imagem compatível com as glândulas cloacais. Apesar de não ser o objetivo do trabalho, tais estruturas persistiram visíveis em todas as radiografias dos machos até o final do experimento. Foram também observados, no mesmo período, sinais de hiperemia e edema cloacal com a presença de espuma esbranquiçada nas gaiolas, peculiaridade do esperma destes animais.

A visualização do edema de cloaca e da presença de espuma é uma ferramenta não-invasiva de identificação da capacidade reprodutiva no macho (BISWAS *et al.*, 2007). Santos (2012) verificou que a partir dos 55 dias, todas as células da linhagem

espermática já se encontram na luz tubular. Período este, compatível com os primeiros sinais de capacidade reprodutiva do macho visualizado em nosso experimento.

Aos 64 dias, as fêmeas iniciaram a postura de ovos. Em estudo realizado por Steigner e colaboradores (1991) com diferentes linhagens de codornas-japonesas, o primeiro dia de postura de uma linhagem pesada (semelhante à utilizada no presente trabalho) foi em média de 47,2 dias com uma média de peso de 218,1g. O peso das fêmeas no mesmo período foi semelhante (Fig. 4), porém, a postura tardia, se comparada ao trabalho de Steigner, pode ser explicada por fatores como genética, alimentação, padrão de energia utilizado, temperatura (RICKLEFS, 1979), fotoperíodo, tipo e intensidade de luz (HOSICK, 1966). O início da postura observado no presente experimento foi mais tardio do que o relatado por Padgett e Ivey (1959), que estabeleceram que em animais expostos a 14 horas de luz por dia, a maturidade sexual da fêmea se dá entre a 6ª e a 7ª semana de vida. A proximidade da fonte luminosa, a intensidade e o tipo da luz podem ter sido fatores que diferenciaram a maturidade sexual nos animais avaliados, onde no nosso experimento, ocorreu somente na 9ª semana de vida.

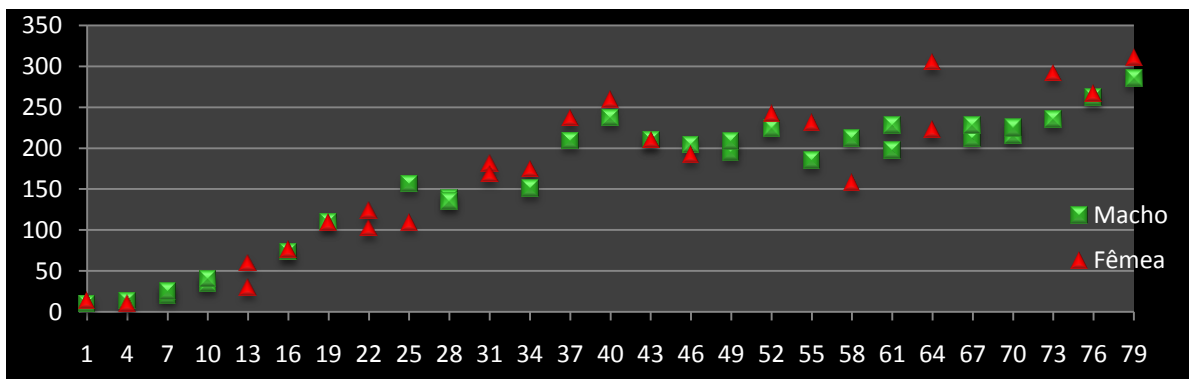


FIGURA 4: Massa corpórea em gramas de *Coturnix japonica*, machos e fêmeas, do primeiro ao 79º dia de vida, mensurados com intervalos de três dias.

Entre 67 e 70 dias, houve o fechamento da articulação fêmoro-tibiotársica. Verificou-se que o posicionamento do animal (patas com extensão e angulação diferenciadas) durante a contenção para o exame, influencia as imagens visto que por não haver fises visíveis e nenhuma distância articular padronizada em aves, a inspeção visual é subjetiva, podendo depender da interpretação do observador.

O grau de alongamento e desenvolvimento ósseo não é o mesmo em todas as partes dos ossos longos, sendo a ocorrência de alongamento maior na epífise e na área proximal, se comparada à diáfise. A região proximal e as epífises ósseas são responsáveis pelo desenvolvimento e alongamento, processo esse que ocorre por replicação condrocitária, maturação celular e mineralização (APPLEGATE; LILBURN, 2002; DIBNER *et al.*, 2007).

Neumann (1986) estabeleceu que não existe correlação entre a intensidade do crescimento e a taxa de desenvolvimento ósseo. Entretanto, outros autores afirmam que o desenvolvimento ósseo normal é influenciado por alimentação, genética e aumento do peso vivo (KOCABAGLI *et al.*, 2001).

Buckner e colegas (1950) verificaram a relação entre o peso vivo e diversos aspectos do desenvolvimento de tibiotarso e fêmur em machos e fêmeas de frangos *New Hampshire*. Análises de seus dados demonstraram que mais de 98% da variabilidade do comprimento do tibiotarso e do fêmur foram em função de peso vivo.

Segundo Ricklefs (1979) e Santos (2012), o peso de codornas macho, estabiliza-se a partir dos 60 dias de idade. Sendo o animal considerado adulto, com 70 dias. Notou-se que o peso vivo das fêmeas variou com maior frequência, isto pode ser explicado pela postura de ovos (Fig. 4).

Em trabalho realizado por Ricklefs (1979), comparando diferentes padrões de desenvolvimento de aves (animais precoces, semi-precoces e altriciais), levantou-se a hipótese de que o aumento do peso vivo é inversamente relacionado ao grau de maturidade. A taxa de crescimento das diferentes espécies é relacionada ao peso vivo do adulto, disponibilidade de alimento, período que o animal permanece no ninho e padrão de desenvolvimento (precoce, semi-precoce ou altricial). Rapinantes (altriciais), por exemplo, crescem muito mais rápido que galiformes (como a codorna – animal precoce) de mesmo peso. A energia utilizada por aves precoces para manter sua atividade e regulação de temperatura, pode limitar a energia disponível para o crescimento. Ricklefs ainda sugere que, o desenvolvimento dos membros pélvicos, determina a taxa de crescimento da codorna-japonesa, e pode definir o ritmo do desenvolvimento das aves.

Em relação às densidades ósseas, em análise de regressão linear, comparando

a DO do úmero, da ulna, do fêmur e do tibiotarso com os seus respectivos comprimentos em milímetros, houve significância ($p < 0,05$), ou seja, a densidade óssea aumentou conforme os ossos aumentaram em comprimento. O maior coeficiente de correlação (0,81) ocorreu no úmero, demonstrando que o crescimento do úmero está intimamente ligado com o aumento da DO, seguido pelo tibiotarso (0,756), ulna (0,71) e fêmur (0,628) (Fig. 5).

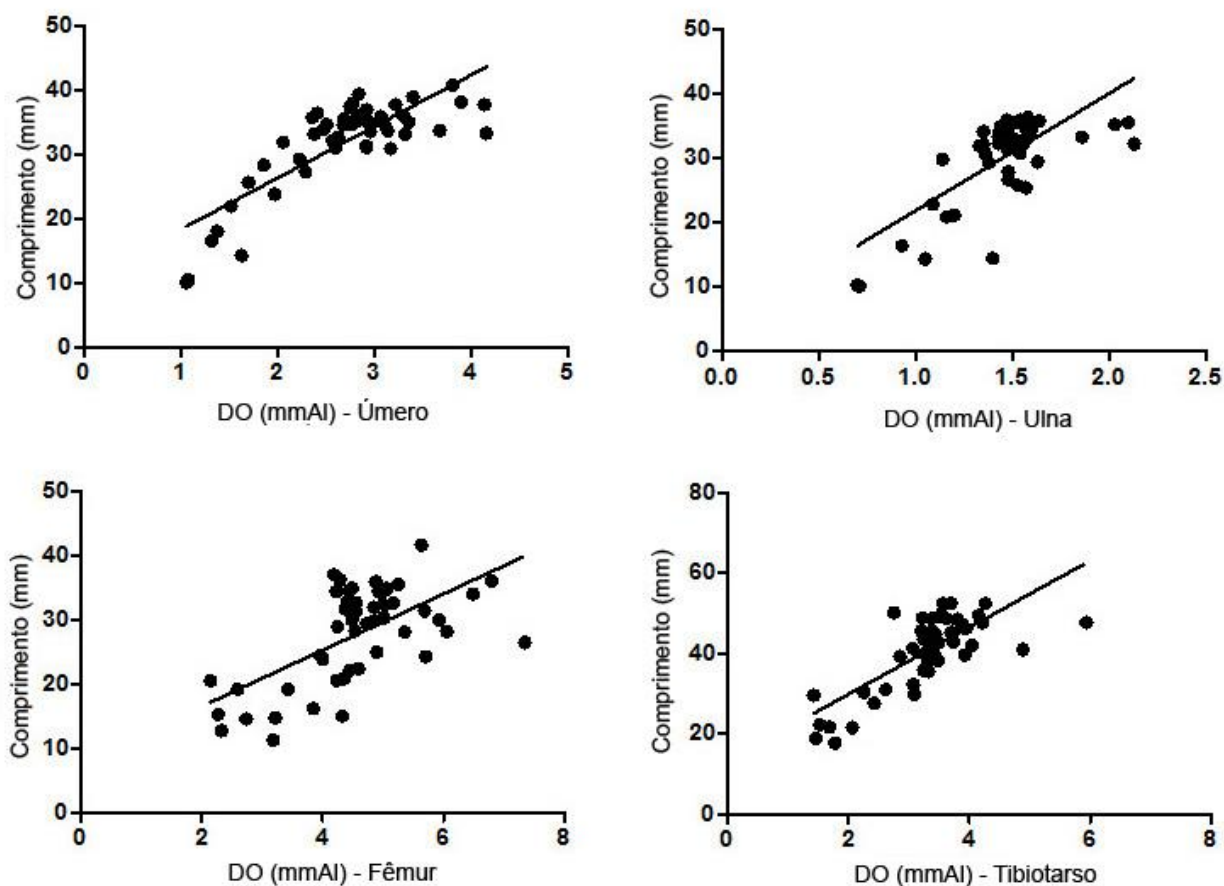


FIGURA 5: Densidade óssea de ossos longos de codornas-japonesas ao longo de 79 dias de vida. Regressão linear positiva da DO de ulna, úmero, fêmur e tibiotarso.

Em todos os ossos estudados (úmero, ulna, fêmur e tibiotarso), o período de sete a 13 dias diferiu significativamente das demais idades ($p < 0,05$), podendo haver, neste

período do crescimento, a maior mobilização de cálcio para osteogênese. No úmero e no fêmur, também houve diferença no período de 70 a 79 dias. Isto pode ter ocorrido devido a este período coincidir com o início de postura das fêmeas, que ocorreu no dia 64. A hiperostose polióstótica (HP) (“osso medular”), é uma característica fisiológica observada em fêmeas antes da postura, e trata-se de um sítio fisiológico de armazenamento de cálcio (PEES, 2008), logo, a densidade óssea aumenta pelo acúmulo mineral. Outro fator a ser considerado, é a presença de grandes massas musculares ao redor dos ossos longos de membro pélvico, interferindo nos resultados. Camargo Filho (2014) escolheu a ulna como osso padrão para avaliação da DO por possuir boa espessura e apresentar menor sobreposição de tecidos moles e penas, reduzindo a influência nos resultados. Um dos pontos a se questionar na maior densidade femoral (bem como alta densidade em tibiotarso – apesar de não apresentar diferença estatística) é a presença de exacerbado tecido muscular. A somatória da musculatura e do tecido ósseo culminam com a leitura de uma maior DO pela sobreposição. Deve-se ressaltar que a somatória das densidades dos ossos e dos músculos pode ser a responsável pelos resultados obtidos em fêmur e tibiotarso.

No período de 61 a 79 dias, realizou-se a comparação da DO dos fêmures de machos e fêmeas para analisar a presença de HP nas fêmeas (Fig. 6). Houve diferença estatística ($p < 0,05$), confirmando a presença de HP nos fêmures das fêmeas analisadas. Isto se deve à época reprodutiva dos animais, quando as fêmeas acumulam o cálcio nos ossos longos (e com frequência, no fêmur) para a formação da casca dos ovos.

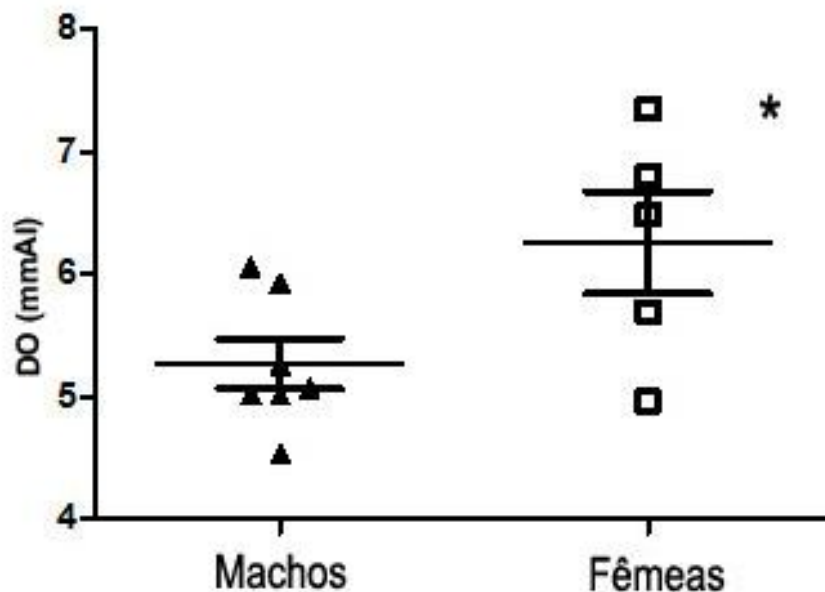


FIGURA 6: Densidade óssea de fêmures de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) de 61 a 79 dias de vida. * $p < 0,05$.

3.6 CONCLUSÃO

A DR é uma técnica aplicável a *C. japonica* sendo um método acessível e de baixo custo que permite o estabelecimento de diversos padrões osteológicos e ortopédicos. Os resultados observados confirmaram um grande aumento de densidade ao longo do crescimento animal, bem como durante a postura, confirmando a presença de hiperostose poliostótica na espécie. Verificou-se também, radiograficamente, a presença das glândulas cloacais no macho adulto, outra forma de comprovar o sexo destes animais.

3.7 REFERÊNCIAS

AINSWORTH, S.J.; STANLEY, R.L.; EVANSÁCO, D.J.R. Developmental stages of the Japanese quail. **Journal of Anatomy**, v. 216, p. 3–15, 2010.

APPLEGATE, T.J.; LILBURNS, M.S. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. **Poultry Science**, v. 81, p. 1289–1294, 2002.

BISWAS, A.; RANGANATHA, J.M.; SASTRY, K.V.H. Relationship of cloacal gland with testes, testosterone and fertility in different lines of male Japanese quail. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 94–102, 2007.

BUCKNER, G.D.W.; INSKO JR. M.; HARMS-HENRY, A.; FAULL-WACHS, E. The comparative rates of growth and calcification of the femur, tibia and metatarsus bones of the male and female New Hampshire chicken having straight keel. **Poultry Science**, v. 29, p. 332–335, 1950.

CAMARGO FILHO, O.B. Influência de diferentes dietas na densidade óssea de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n.3, p.409-420, 2014.

CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. Medicina e patologia de aves de companhia. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. **Atlas de medicina, terapêutica e patologia de animais exóticos**. São Caetano do Sul: Interbook, 2006, p. 213-264.

DEMIRASLAN, Y.; TUFAN, T.; SARI, M.; AKBULUT, Y.; DAYAN, M.O.; KUKURT, A. The effect of clinoptilolite on long bone morphometry in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 6, p. 179-183, 2014.

DIBNER, J.J; RICHARDS, J.D.; KITCHELL, M.L.; QUIROZ, M.A. Metabolic challenges and early bone development. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 126–137, 2007.

FOWLER, M. E. Ossification of long bones in raptors. In: COOPER, J.E.; GREENWOOD, A.G. **Recent advances in the study of raptor diseases**. London: Chiron Publications, 1981, p.75-82.

GARTON, M.J.; ROBERTSON, E.M.; GILBERT, F.J.; GOMERSSAL, L.; REID, D.M. Can radiologists detect osteopenia on plain radiographs? **Clinical radiology**, v. 49, p. 118-122, 1994.

HARCOURT-BROWN, N. Diagnostic imaging. In: HARCOURT-BROWN, N.; CHITTY, J. **BSAVA Manual of Psittacine Birds**. England: BSAVA, p. 97-106, 2005.

HOSICK, H.L. The influence of light intensity on oviposition of the coturnix quail. **Wilson Bulletin**, v. 78, n. 4, p. 434-443, 1966.

KRAUTWALD-JUNGHANNS M.E.; PEES, M. Técnicas de diagnóstico por imagem. In: TULLY, T.M.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. **Clínica de aves**. São Paulo: Elsevier, p. 75-85, 2010.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E.; SCHROFF, S.; BARTELS, T. In: KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.E.; PEES, M.; REESE, S.; TULLY, T. **Diagnostic imaging of exotic pets**. Germany: Schlutersche, p. 1-35, 2011.

KOCABAGLI, N. The effect of dietary phytase supplementation at different levels on tibial bone characteristics and strength in broilers. **Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences**, v. 25, p. 797-802, 2001.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. **RBE- Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998.

LOUZADA, M.J.Q.; NOGUEIRA, G.P.; GARCIA JUNIOR, I.R.; CARVALHO, C.A.; DE PAULA, G.A. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbula de coelhos castrados. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 13, n. 1, p. 33-38, 2001.

MACWHIRTER, P. Evolução das espécies aviárias. In: TULLY, T.M.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. **Clínica de aves**. São Paulo: Elsevier, p. 1-21. 2010.

MURAKAMI, A. E.; ARIKI, J. Produção de codornas japonesas. Jaboticabal: FUNEP, 1998, 79p.

NEUMANN, J. Changes in bone tissue of broilers treated with growth promoters. **Acta Veterinaria Brno**, v. 55, p. 285-291, 1986.

O'MALLEY, B. Avian anatomy and physiology. In: O'MALLEY, B. **Clinical anatomy and physiology of exotic species**. Philadelphia: Elsevier, p. 97-101, 2005.

PADGETT, C.A.; IVEY, W.D. Coturnix quail as a laboratory research animal. **Science**. v. 129, n. 3344, p. 267-268, 1959.

PEES, M. Radiography. In: CHITTY, J.; LIERZ, M. **BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine birds**. BSAVA England: BSAVA, p.114-120. 2008.

PIACENTINI, V.Q.; A. ALEIXO, C.E. AGNE, G.N. MAURÍCIO, J.F. PACHECO, G.A. BRAVO, G.R.R. BRITO, L.N. NAKA, F. OLMOS, S. POSSO, L.F. SILVEIRA, G.S. BETINI, E. CARRANO, I. FRANZ, A.C. LEES, L.M. LIMA, D. PIOLI, F. SCHUNCK, F.R. AMARAL, G.A. BENCKE, M. COHN-HAFT, L.F.A. FIGUEIREDO, F.C. STRAUBE & E. CESARI. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological

Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n.2, p.91–298, 2015

RICKLEFS, R.E. Patterns of growth in birds. V. A comparative study of development in the starlings, common tern and japanese quail. **The Auk**, v. 96, p. 10-30. 1979.

SANTOS, T.C.; MURAKAMI, A.E.; OLIVEIRA, C.A.L.; COSTA, P.D. Body and testicular development in males of meat and egg-type quails of 25 to 360 days. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1205-1212, 2012.

STEIGNER, J.W.; NESTOR, K.E.; LILBURN, M.S. Growth and development of lines of japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) divergently selected for body weight at 4 weeks of age. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 10, n. 2, p. 389-392, 1991.

TULLY, T, N. Basic avian bone growth and healing. In: TULLY, T, N. **The veterinary clinics of north america: exotic animal practice**, vol. 5, orthopedics. Philadelphia: WB Saunders. p. 23-31, 2002.

4 CAPITULO 3. INFLUÊNCIA DE TECIDOS MOLES NA DENSIDADE ÓSSEA POR DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA EM CODORNA-JAPONESA (*COTURNIX JAPONICA*)

4.1 RESUMO

Existem diferentes formas de avaliar a densidade óssea, que se define como a massa de tecido ósseo presente numa unidade volumétrica de osso. Devido a diversas adaptações evolutivas, aves possuem particularidades anatômicas que as diferenciam inclusive durante a escolha e interpretação de métodos diagnósticos. A utilização de radiografia para diagnóstico de doenças esqueléticas nesta classe é de extrema importância, e a utilização de uma escada de alumínio permite avaliar a densidade óssea pelo método de densitometria óptica radiográfica. Devido a necessidade de grandes massas musculares para indústria avícola, não existem estudos demonstrando a influência de tecidos moles na densidade óssea pelo método de densitometria óptica radiográfica. Cinquenta e quatro codornas-japonesas, de um dia, machos e fêmeas, foram radiografadas a cada três dias, com uma escada de alumínio de 21 degraus e eutanasiadas, até o 79º dia de vida. Fêmur e tibiotarso foram dissecados para nova radiografia com a mesma escada de alumínio. Os animais foram separados em grupos por idades. Nos fêmures de machos e fêmeas, em todas as idades, houve diferença estatística ($p < 0,05$) nas densidades quando comparados os tratamentos com e sem tecidos moles. Nos grupos 2, 3 e 4, os fêmures após dissecação tiveram redução de mais de 55% dos valores densitométricos, e nos mesmos grupos, mais de 46% em tibiotarso. Foi possível verificar correlação entre idade e densidade de fêmur (0,82) e tibiotarso (0,74) com musculatura e de 0,69 e 0,55 sem musculatura, respectivamente. A leitura com a escada de alumínio possibilitou leitura somente a partir do 10º dia de vida. Verifica-se que efetivamente a avaliação densitométrica do osso destituído de tecidos moles reflete mais precisamente a característica esquelética.

Palavras-chave: musculatura, densitometria óptica, aves, ossos

4.2 ABSTRACT

There are different ways to evaluate bone density, which can be defined as bone mass in a unit of volumetric bone. Due to several evolutionary adaptations, birds have anatomical characteristics that differentiate them even to select and interpret exams. The use of radiography for diagnosis of skeletal diseases in this class is of utmost importance and with the use of an aluminum stepwedge, a technique called optical densitometry, in radiographic images allows us to evaluate bone density. Due the need for large muscle masses in poultry industry, there are no studies demonstrating the influence of soft tissue in bone density by optical densitometry in quails. Fifty-four one-day old Japanese quails (*Coturnix japonica*), males and females were evaluated. Every three days, two animals were weighted, identified, euthanized and x-rayed with an aluminum stepwedge until 79th day. The bones on the pelvic limb (femur and tibiotarsus) were carefully dissected and x-rayed with the aluminum stepwedge for densitometry evaluation and statistical comparison of the bone with and without soft tissues. The animals were separated by age groups. On the femur of both male and female, and all ages (1 through 79 days), there was a statistical difference ($p < 0,05$) on the bone density when comparing the presence and absence of soft tissue. The groups 2, 3 and 4, showed a reduction of more than 55% on densitometric values in the femurs after dissection. In these same groups, more than 46% on the tibiotarsus. It was possible to assess the correlation between age and bone density in the presence of muscle, on femur (0,82) and tibiotarsus (0,74). On the procedure without muscle, the correlation of femur was 0.692 and tibiotarsus 0,55. The aluminum stepwedge allows us to read the bone density only from day 10. We conclude that the densitometric evaluation of bone without muscle effectively demonstrates more precisely the skeletal characteristics of the Japanese quail.

Key words: muscle, optic densitometry, avian, bones

4.3 INTRODUÇÃO

Densidade óssea (DO) é definida como a massa de tecido ósseo presente numa unidade volumétrica de osso (NORDIN; FRANKEL, 2003) e seus estudos são de grande importância, porém, ainda são considerados onerosos dependendo do método utilizado e o acesso a determinados equipamentos podem estar restritos a medicina de seres humanos (SYMMONS, 2004).

O sistema esquelético das aves evoluiu como um aparelho eficiente, resistente, leve e aerodinâmico apresentando adaptações específicas que, juntamente com penas, músculos, sistemas circulatório e respiratório especializados, permitem o voo (MACWHIRTER, 2010). Atualmente a radiografia representa o exame complementar de escolha para avaliação de fraturas, desmineralização óssea e determinação prognóstica. Avaliações de opacidade óssea usando radiografias convencionais são subjetivas, sendo necessárias cerca de 40 a 50% de perda óssea antes que mudanças na radiopacidade sejam notadas a olho nu (LAUTEN *et al.*, 2001).

Doenças ósseometabólicas são as doenças mais comuns encontradas em aves de cativeiro, sejam elas de postura, carne ou silvestres e geralmente são de causa nutricional (ZOTTI *et al.*, 2004) sendo de suma importância o estudo da normalidade esquelética para avaliação de possíveis afecções.

As técnicas não-invasivas para avaliação da densidade óssea utilizadas atualmente são a tomografia computadorizada quantitativa (QCT), absorção de fótons de uma energia (SPA) e absorção de fótons de duas energias (DEXA) (GENANT *et al.*, 1989). Devido às condições econômicas da população e das instituições brasileiras, o alto custo de tais técnicas impossibilita sua utilização em certos casos (LOUZADA, 2002). O custo inferior a outras técnicas e o fato de não ser invasiva tornam a técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas de fácil utilização. Sabe-se que o osso é mais denso que o músculo, e o músculo é mais denso que a gordura. Quanto mais denso for o objeto, mais ele inibirá a passagem da radiação (KEALY, 2012).

Estudos mensurando densidade óssea em aves utilizam a ulna por risco de sobreposição de tecidos moles (CAMARGO FILHO, 2014), porém, não existem estudos demonstrando a influência de tais tecidos, numericamente, no aumento da densidade

óssea em aves. Logo, este estudo propõe-se a dar início a esta investigação utilizando como modelo, a codorna-japonesa.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil, sob protocolo número 065/2014.

Cinquenta e quatro codornas-japonesas (*Coturnix japonica*), de um dia de vida, provenientes da Fazenda Experimental da UFPR, de ambos os sexos, foram utilizadas para o experimento. Do primeiro ao 14º dia de vida, os animais foram mantidos em duas gaiolas de alumínio de 50x50x50cm, com jornal como substrato, mantidos sob temperatura média de 28,7°C. A partir do 15º dia de vida, os animais foram divididos em sete gaiolas aleatoriamente, a temperatura média foi de 25,3º C. Alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*, recebendo ração inicial até os 21 dias, ração de crescimento do 21º até o 41º dia e ração para postura até 79º dia, final do experimento. O regime de luz foi estabelecido em 14 horas por dia controlado por um *timer* digital programável (FDD-60/SB2, G20, Santa Catarina).

A cada três dias, dois animais foram identificados, submetidos a eutanásia e radiografados. Para a radiografia, a projeção ventrodorsal (VD) de membro pélvico direito foi utilizada, em aparelho digital (*Agfa Healthcare CR-30-X, DS5302, Mortsel, Belgium*) com técnica de 40 kVp, 100mAs (HARCOURT-BROWN, 2005) e distância aparelho-chassi de 35cm. Os corpos dos animais foram fixados ao chassi com fita adesiva do tipo micropore no pescoço, asas e tarsometatarsos. Em todas as radiografias, utilizou-se uma escada de alumínio de 21 degraus (penetrômetro) (tabela 2). Após tal procedimento, os membros direitos foram dissecados cuidadosamente e mantidos em formol por 30 dias. Para avaliação radiográfica sem tecidos moles, os membros foram lavados em água corrente, secos em papel toalha e radiografados com o penetrômetro, mesma técnica radiográfica e mesmo posicionamento citados

anteriormente.

A área de interesse dos ossos fêmur e tibiotarso foi demarcada (Fig.7), para determinação da densidade em milímetros de alumínio com o software *ImageJ* 1.48v (*Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA – Public Domain*), segundo técnica de Louzada (1998).

TABELA 2: Relação dos degraus da escada de alumínio com suas respectivas espessuras, em milímetros.

Degrau	Espessura (milímetros)
1	0.78
2	1.33
3	1.63
4	2.09
5	2.48
6	2.99
7	3.44
8	3.91
9	4.38
10	4.93
11	5.39
12	5.93
13	6.4
14	6.91
15	7.41
16	7.91
17	8.41
18	8.93

19	9.47
20	9.99
21	10.5

Para realização da análise estatística, foram realizados os testes de análise de variância, Tukey e correlação. Para isso, os animais foram divididos em grupos por idades: 10 a 19 (Grupo 1), 22 a 37 (Grupo 2), 40 a 58 (Grupo 3) e 61 a 79 (Grupo 4) dias de vida e dentro destes grupos, em sexo. As análises foram realizadas nos programas *Statistix 9* (Analytical Software, Tallahassee, FL) e *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc.).

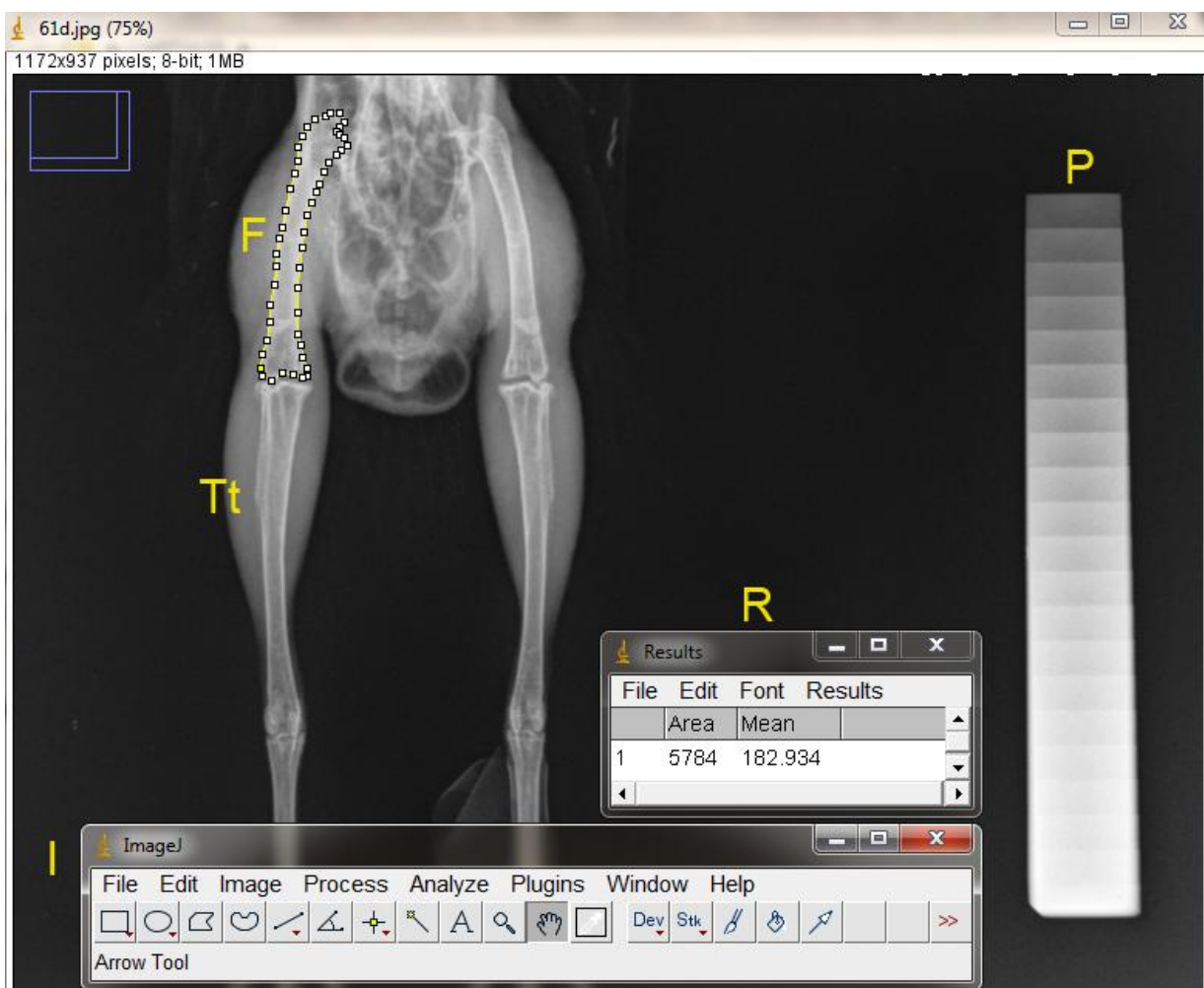


FIGURA 7: Interface do programa *ImageJ* com a análise de uma radiografia de uma codorna-japonesa (C).

japonica) de 61 dias. Pontilhado: área de interesse para cálculo da densidade óssea. F: fêmur. Tt: tibiotarso. I: Barra de ferramentas do programa R: resultados calculados a partir da área (*area*) selecionada com a média (*mean*) de tons de cinza. P: penetrômetro de alumínio de 21 graus.

:

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Camargo Filho (2014) escolheu a ulna como osso padrão para avaliação da DR por possuir boa espessura e apresentar menor sobreposição de tecidos moles e penas, reduzindo a influência nos resultados. No trabalho aqui apresentado, o fêmur e o tibiotarso foram escolhidos por serem os ossos com maior cobertura muscular para visualizar qual a real influência nos resultados da DO (Fig. 8). Estudos de avaliação de DO por diferentes métodos e diferentes equipamentos devem considerar a influência de tecidos moles – entre o osso e a fonte emissora de Raios-X (SOUZA *et al.*, 1999), pois quando os fótons atravessam um determinado objeto, eles sofrem atenuação, diminuindo sua intensidade e causando absorção e dissipação (PIETROBELLI *et al.*, 1996).

Nos fêmures de codornas machos e fêmeas, em todas as idades (de 1 a 79 dias), houve diferença estatística ($p < 0,05$) na DO quando comparados os tratamentos com e sem tecidos moles. Tal fato havia sido questionado no Capítulo 2, tendo agora sido comprovado. A somatória da musculatura e do tecido ósseo culminam com a leitura de uma maior DO pela sobreposição de tecidos. Mazess (1979), afirmou que mensurações densitométricas são afetadas por tecidos moles que envolvem o osso e pela cavidade medular, erros de técnica podem ser de 3 a 5% em ossos excisados, de 5 a 10% em ossos com pouca cobertura de tecido mole e para ossos com muita cobertura, de 10 a 30%.

A tabela 3 mostra as médias \pm desvio padrão da DO dos grupos e diferenças em porcentagem, dos ossos com e sem tecido mole. Nos grupos 2, 3 e 4, os fêmures após dissecação tiveram redução de mais de 55% dos valores de DO, e nos mesmos grupos, mais de 46% em tibiotarso, contrastando com os valores descritos por Mazess (1982) que afirmou que em área de alta cobertura de tecidos moles, os métodos de

densitometria estão susceptíveis a erros de até 30%.

TABELA 3: Diferenças dos valores de DO de fêmur e tibiotarso de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com e sem tecidos moles, em porcentagem, bem como médias \pm desvio padrão (DP), em mmAl, separados por grupos

Grupos	FÊMUR			TIBIOTARSO		
	COM MÉDIA \pm DP	SEM MÉDIA \pm DP	Diferença DO (%)	COM MÉDIA \pm DP	SEM MÉDIA \pm DP	Diferença DO (%)
1	3,07 \pm 0,76	1,47 \pm 0,09	51,93%	1,82 \pm 0,68	1,39 \pm 0,15	23,83%
2	4,56 \pm 0,468	1,71 \pm 0,36	62,41%	3,32 \pm 0,38	1,67 \pm 0,40	49,62%
3	4,71 \pm 0,70	2,11 \pm 0,48	55,1%	3,66 \pm 0,44	1,89 \pm 0,35	48,22%
4	5,53 \pm 0,891	2,30 \pm 0,59	58,27%	3,73 \pm 0,52	2,01 \pm 0,43	46,07%

Existem imprecisões por limitações inerentes ao uso dos emissores dos Raios-X, que são: não uniformidade do campo de radiação, radiação secundária, policromaticidade do espectro de Raio-X e variação do espectro de Raio-X e da reação do filme (MAZESS, 1979).

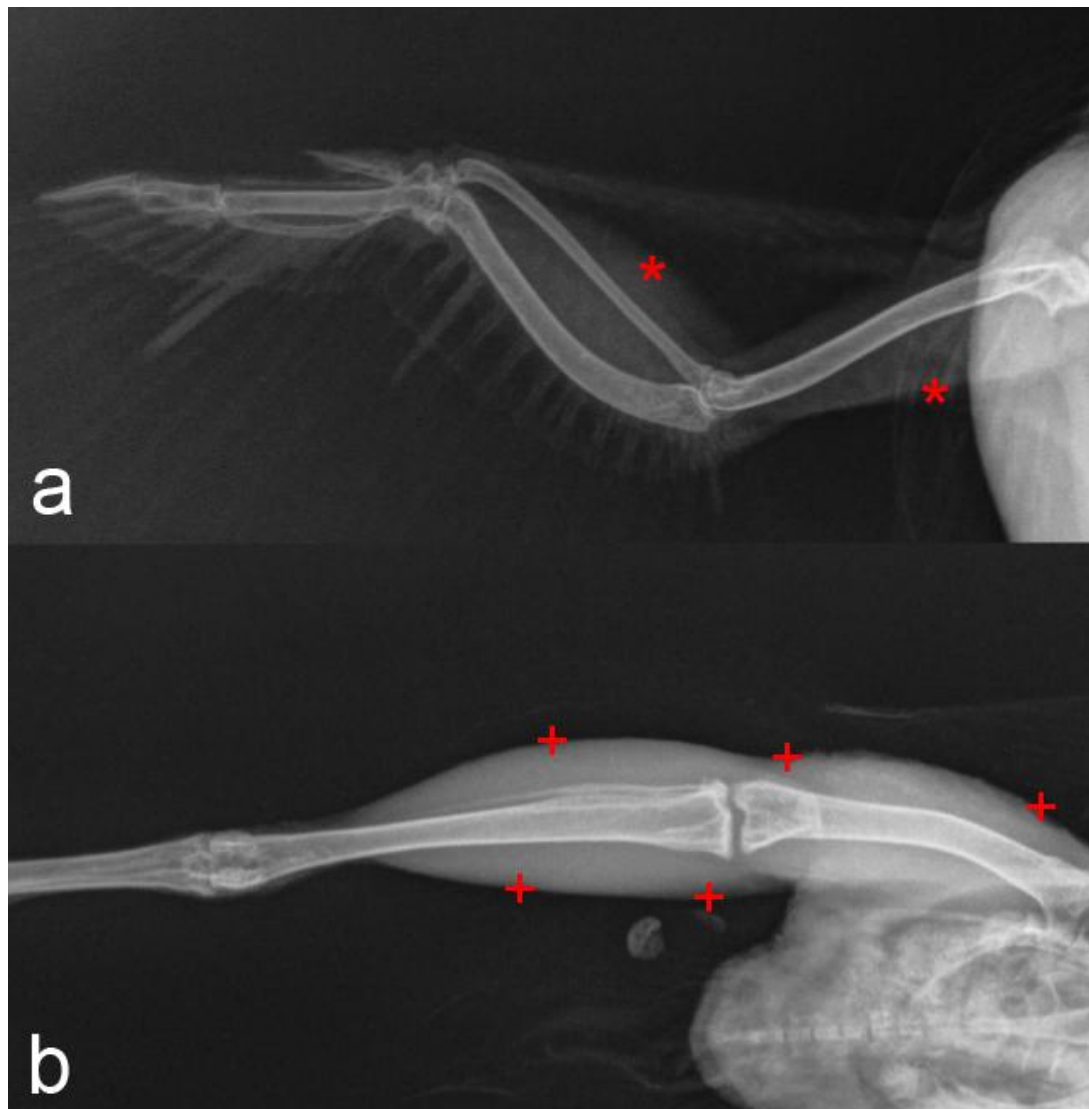


FIGURA 8: Imagem da avaliação radiográfica da asa de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com 61 dias. Observar a pobre cobertura muscular (asteriscos), pouca radiopacidade, evidenciando fragilidade do tecido. b) membro pélvico do mesmo animal com grande cobertura de tecidos moles (sinais positivos).

Com o avanço tecnológico e maior disponibilidade de recursos em serviços veterinários a radiologia digital vem se popularizando na maior parte do país. Tal tecnologia otimiza exposição e qualidade de imagens, apresentando melhor manipulação, visualização, transmissão e armazenamento para a imagem (FURQUIM; COSTA, 2009), método este, que foi utilizado no presente trabalho para posterior leitura da DO. Tradicionalmente, as radiografias utilizadas para a DR são *escaneadas*

(LOUZADA *et al.*, 2001; BERTI *et al.*, 2005; MURAMOTO *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2006; ALMEIDA PAZ, 2006; CAMARGO FILHO, 2014) e dependendo do *scanner* utilizado, pode haver distorções na imagem (MORAIS, 2006).

É possível observar que conforme a idade aumenta, a DO aumenta de forma constante nos grupos (Fig. 9). As massas musculares influenciam de forma visível a DO de fêmur (Grupo 2, 3 e 4 com musculatura) e de tibiotarso (Grupo 2, 3 e 4 com musculatura).

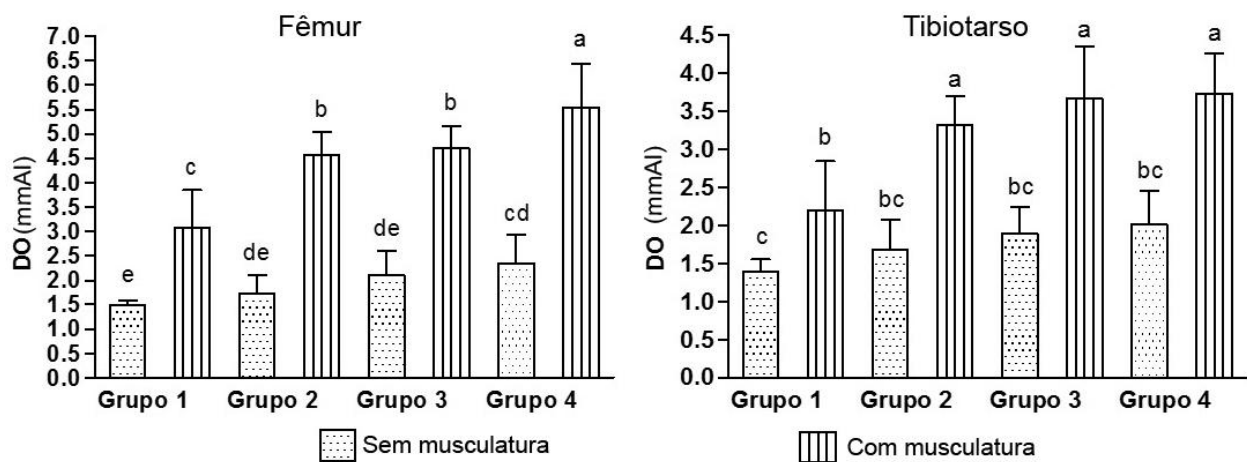


FIGURA 9: Densidade óssea de fêmur e tibiotarso de *Coturnix japonica* sem e com musculatura divididas em grupos por idades. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

No tibiotarso, o único período em que fêmeas e machos não tiveram diferença estatística nos tratamentos com e sem tecidos moles foi no grupo 1. Isto pode ser explicado pela baixa leitura de DO em tal período (média de 1,398mmAl no grupo sem musculatura e 1,82 mmAl no grupo com) e pouca cobertura de tecidos moles. O tibiotarso é um osso que até os 19 dias de idade além de baixa leitura de DO, é recoberto por muito pouco tecido. O grande ganho de peso em codornas ocorre aos 27 dias de idade (SILVA *et al.*, 2012), fase de grande catabolismo muscular, o que poderia explicar porque a partir do grupo 2 houve notável influência de tecidos adjacentes.

Foi possível verificar correlação (Fig. 10) entre idade e DO e fêmur (0,82) e tibiotarso (0,74) no tratamento com, sendo considerada forte. No tratamento sem, a

correlação de fêmur foi de 0,6928 e de tibiotarso 0,555, correlação esta, considerada moderada. Esse resultado evidencia que a correlação encontrada entre idade e DO não se deve apenas ao desenvolvimento ósseo ao longo do tempo.

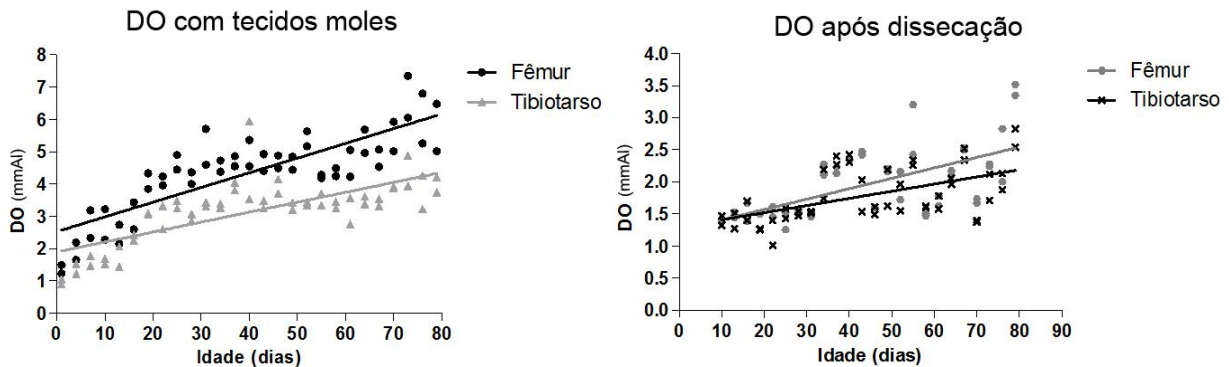


FIGURA 10: Correlação entre idade (em dias) e DO (em mmAl) do fêmur e tibiotarso de codorna-japonesa (*Coturnix japonica*) com a presença de tecidos moles e correlação entre idade e DO de fêmur e tibiotarso de codornas após dissecação dos ossos.

Em estudo densitométrico realizado por Almeida Paz (2006) com tíbias de frangos de corte, a DO, como no presente trabalho, também foi afetada pela idade. Poucos são os trabalhos que utilizam aves menores de 1kg como modelos para estudos densitométricos devido ao pequeno tamanho do animal e dificuldade de contenção. Um estudo com calopsitas foi realizado para verificação da DO avaliando diferentes dietas, utilizando DR (CAMARGO FILHO, 2014), mas a maior parte das pesquisas utiliza o método DEXA pelos motivos já citados.

Pode-se citar como vantagens do DEXA o tempo de execução do exame, que é relativamente pequeno, e conseqüentemente, a contenção do animal; é fácil de utilizar e é seguro em exames de longa duração. Já suas desvantagens são os custos iniciais para instalação, necessidade de imobilização do paciente durante o exame – via anestesia, e tendência de superestimar gordura corpórea quando comparado a análises químicas (HUNTER; NAGY, 2002).

Korine e colaboradores (2014) verificaram a composição corporal de passeriformes migratórios durante seu período de migração utilizando tal tecnologia,

comprovando que o DEXA é um bom método para determinar massa magra e gorda em passeriformes migratórios. É provável que em animais de tamanhos tão pequenos como passeriformes, que possuem desde 10g (SICK, 2001) não sejam bem avaliados pelo método de DR devido à espessura da escada de alumínio, sendo o DEXA e o QCT mais válidos em tais casos. A DO de outros galiformes (perdiz, pavão e tetraz) foi realizada utilizando o método DEXA com sucesso (DIRRIGL *et al.*, 2004).

A escada de alumínio em nosso trabalho proporcionou leituras adequadas somente a partir dos 10 dias de idade em *C. japonica*. Isto pode ser justificado pela espessura do primeiro degrau (Tabela 2).

4.6 CONCLUSÃO

Verifica-se que efetivamente a avaliação densitométrica do osso destituído de tecidos moles reflete mais precisamente a característica esquelética, a musculatura neste sentido atua como uma variável de erro. Dentro deste contexto, há certamente muito a ser feito em diversas espécies aviárias.

O conhecimento preciso da densidade óssea poderá permitir estudos relativos a resistência mecânica dos membros e sua capacidade de suportar a massa e seu crescimento, contribuindo para a resolução da problemática dos traumas de transporte em aves finalizadas na indústria avícola de corte.

4.7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA PAZ, I.C.L.; MENDES, A.A.; QUINTERIO, R.R.; VULCANO, L.C.; TAKAHASHI, S.E.; GARCIA, R.G.; KOMIYAMA, C.M.; BALOG, A.; PELÍCIA, K. WESCHELER, F.S.; SCUDELLER, P.S.O.; PICCININ, A. Bone mineral density of tibiae and femura of broiler breeders: growth, development and production. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2006.

ARAÚJO, C.S.S.; ARTONI, S.M.B.; ARAÚJO, L.F.; JUNQUEIRA, O.M.; LOUZADA, M.J.Q.; OLIVEIRA, D. Densidade óssea de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de aminoácidos e cálcio durante a fase final de criação. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 28, n. 2, p. 203-208, 2006.

BERTI, S.A.; SOUZA, P.H.C.; WESTPHALEN, F.H.; WESTPHALEN, V.P.D.; MARTINS, W.D.; IGNACIO, S.A. Estudo radiográfico da densidade óssea mandibular em pixels e milímetros equivalentes. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 49, p. 251-256, 2005.

CAMARGO FILHO, O.B. Influência de diferentes dietas na densidade óssea de calopsitas (*Nymphicus hollandicus*). **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n.3, p.409-420, 2014.

DIRRIGL, F.J.; DALSKY, G.P.; WARNER, S.E. Dual-energy x-ray absorptiometry of birds: an examination of excised skeletal specimens. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, p.313-319, 2004.

FURQUIM, T. A.C.; COSTA, P.R. Garantia de qualidade em radiologia diagnóstica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v.3, n. 1, p. 91-99, 2009.

GENANT, H.K.; BLOCK, J.E.; STEIGER, P.; GLUEER, C.C.; ETTINGER, B.; HARRIS, S.T. Appropriate use of bone densitometry. **Radiology**, v. 170, p. 817-22, 1989.

HARCOURT-BROWN, N. Diagnostic imaging. In: HARCOURT-BROWN, N.; CHITTY, J. **BSAVA Manual of Psittacine Birds**. England: BSAVA, p. 97-106, 2005.

HUNTER H.L.; NAGY T.R. Body composition in a seasonal model of obesity: longitudinal measures and validation of DXA. **Obesity Research**, n.10, p.1180–1187, 2002.

KEALY, J.K.; MCALLISTER, H.; GRAHAN, J.P. **Radiologia e ultra-sonografia do cão e do gato**. 5 ed. São Paulo: Elsevier, 2012. 436p.

KORINE, C.; DANIEL, S.; VAN TETS, I.G.; YOSEF, R. PINSHOW, B. Measuring fat mass in small birds by dual-energy x-ray absorptiometry. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n.3, p.522-529, 2014.

LAUTEN, S.D.; COX, N.R.; BRAWNER, W.R.; BAKER, H.J. Use of dual energy X-ray absorptiometry for noninvasive body composition measurements in clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, n. 62, p. 1295, 1301, 2001.

LOUZADA, M.J.Q.; NOGUEIRA, G.P.; GARCIA JUNIOR, I.R.; CARVALHO, C.A.; DE PAULA, G.A. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbula de coelhos castrados. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, v. 13, n. 1, p. 33-38, 2001.

LOUZADA, M.J.Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W.D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. **RBE- Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998.

LOUZADA, M. J. Q. Densitometria óptica radiográfica na mensuração da densidade mineral óssea de coelhos em crescimento. / *Radiographic absorptiometry for measuring bone mineral density in growing rabbits*. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, Vol. 18, nº 2, 107-110, 2002.

MACWHIRTER, P. Evolução das espécies aviárias. In: TULLY, T.M.; DORRESTEIN, G.M.; JONES, A.K. **Clínica de aves**. São Paulo: Elsevier, p. 1-21. 2010.

MAZESS, R.B.. Measurements of skeletal status by noninvasive methods. **Calcified Tissue International**, v. 28, p. 89-92, 1979.

MAZESS, R.B. On aging bone loss. **Clinical Orthopaedics**, n. 165, p. 239-252, 1982.

MORAIS, S.; TAVANO, O.; MONTEBELLO FILHO, A.; JUNQUEIRA, J.L.C. Estudo comparativo de imagens digitalizadas através de câmeras e de escâner. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 54, n. 2, p. 125-128, 2006.

MURAMOTO, C.; STERMAN, F.A.; FONSECA PINTO, A.C.B.C. Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões metafisária e diafisária do rádio em cães da raça Poodle por meio da Densitometria Óptica Radiográfica. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Sciences**, v. 42, n. 2, p. 89-97, 2005.

NORDIN, M.; FRANKEL, V.H. **Biomecânica básica do sistema musculoesquelético**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 2.

PIETROBELLI, A.; FORMICA, C.; WANG, Z.; HEYMSFIELD, S.B. Dual-energy x-ray absorptiometry body composition model: review of physical concepts. **American Journal of Physiology**, v. 271, n. 6, p. 941-951, 1996.

SICK, H. Passeriformes. In: SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 1997, p. 519.

SILVA, J. H.V.; JORDÃO FILHO, J. COSTA, F.G.P.; LACERDA, P.B.; VARGAS, D.G.V.; LIMA, M.R. Exigências nutricionais de codornas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 775-790, 2012.

SOUZA, P.H.C.; COSTA, N.P.; PUPPIN, A.A.C. Análise óptica da densidade óssea retromolar mandibular por meio de imagens digitalizadas, utilizando simuladores de tecidos moles. **Revista Odonto Ciência**, v. 14, n. 28, p. 27-53, 1999.

SYMMONS, R. Digital photodensitometry: a reliable and accessible method for measuring bone density. **Journal of Archaeological Science**, v. 31, p. 711-719, 2004.

ZOTTI, A.; SELLERI, P.; CARNIER, P.; MORGANTE, M.; BERNARDINI, D. Relationship between metabolic bone disease and bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in the green iguana (*Iguana iguana*). **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 45, n. 1, p.10-16, 2004.

5 ANEXOS

5.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 065/2014, referente ao projeto “Estudo do crescimento ósseo em codorna-japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) utilizando radiografia, histologia e densitometria óssea radiográfica”, sob a responsabilidade de Aline Luiza Konnel, na forma em que foi apresentado (utilização de 90 animais e como grau C de invasividade), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, em reunião realizada dia 12 de dezembro de 2014.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 065/2014, regarding the project “Study of bone growth in quail-Japanese (*Coturnix coturnix japonica*) using radiography, histology and radiographic bone densitometry”, under Aline Luiza Konnel supervision, in the terms it was presented (use of 90 animals and was classified as grade C of invasiveness), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Brazil) during session on December 12, 2014.

Curitiba, 13 de Dezembro de 2014.

Ricardo Guilherme D'Otaviano
de Castro Vilani
Presidente CEUA-SCA

Ananda Portella Félix
Vice-Presidente CEUA-SCA