



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANA INDIRA BEZERRA BARROS GADELHA

MORFOLOGIA DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS E FETAIS DE EMAS, *Rhea americana*
Linnaeus, 1758

MOSSORÓ
2022

ANA INDIRA BEZERRA BARROS GADELHA

MORFOLOGIA DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS E FETAIS DE EMAS, *Rhea americana*
Linnaeus, 1758

Dissertação apresentada ao Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

G124m Gadelha, Ana Indira Bezerra Barros.
MORFOLOGIA DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS E FETAIS DE
EMAS, Rhea americana Linnaeus, 1758 / Ana Indira
Bezerra Barros Gadelha. - 2022.
75 f. : il.

Orientadora: Moacir Franco de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2022.

1. Desenvolvimento embrionário e fetal. 2.
Avícola. 3. Ratitas silvestres. 4. Microscopia. I.
Oliveira, Moacir Franco de, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ANA INDIRA BEZERRA BARROS GADELHA

MORFOLOGIA DOS ANEXOS EMBRIONÁRIOS E FETAIS DE EMAS, *Rhea americana*
Linnaeus, 1758

Dissertação apresentada ao Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: 25/03/2022

BANCA EXAMINADORA

MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA:32594950459
Assinado de forma digital por MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA:32594950459
Dados: 2022.03.30 21:16:44 -03'00'

Moacir Franco de Oliveira, Prof. Dr.
(UFERSA)Presidente

ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA:91307198368
Assinado de forma digital por ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA:91307198368
Dados: 2022.03.29 09:19:06 -03'00'

Alexsandra Fernandes Pereira, Profa. Dra. (UFERSA)

Membro examinador



Amilton Cesar dos Santos, Prof. Dr. (UNIFEQB)

Membro examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por ser a força e o ânimo que me impulsiona a prosseguir e por sempre estar comigo, quando ninguém mais pode estar. Obrigada Senhor Jesus, sem Ti sei que nada sou.

Agradeço a minha família, em especial ao meu esposo **Lucas Gadelha** por ter sido meu braçodireito nos experimentos e na vida conjugal, por sempre acreditar no meu potencial, ter paciência e cuidar de mim e da nossa casa enquanto eu cuidava do meu mestrado. A minha mãe(**Núbia Bezerra**) que sempre se sacrificou para que não me faltasse estudo e me sustentou quando eu não tinha onde me segurar. Ao meu pai (**Aldo Barros**) por todo incentivo e crença na minha competência e caráter. Aos meus irmãos **Fábio Jr, Alícia e Álvaro**, por todo bom exemplo, incentivo, orações e carinho. Aos meus avós que agora descansam no Senhor, **Júlia Alves** que orava incessantemente pela minha vida, torcia pelo meu mestrado e me dispensava muito amor, e ao meu avô **Raimundo Noberto** que só com o olhar já trazia calma à minha alma, saudades eternas. A toda grande família Bezerra, tios, primas, primos, cunhada (**Adriana Abreu**) e agregados, em especial aos meus sobrinhos, pois o amor deles me deu combustível para seguir: **Júlia, Raul, Bianca, Letícia, Nicolas, Alice e Luiza**. A família **Gadelha** que Deus me deu por meio do matrimônio, sogros (**Jefeson e Almir**), sogras (**Maranda e Núbia**), cunhado (**Matheus**), cunhadas (**Sarah, Roberta Abrantes**), tios (**Olga, Diogo e Joelmir**), por todas as orações, carinho e compreensão dispensados a mim.

Agradeço ao meu orientador **Moacir Franco de Oliveira** por toda orientação, paciência e tempo dedicados a mim durante o mestrado, obrigada por ser essa pessoa de grande coração, o senhor se tornou um exemplo e uma referência para mim de dedicação, profissionalismo e pessoa (humana, caridosa e forte), espero um dia conseguir ser ao menos metade do que és.

Agradeço a professora **Marcelle Araújo** por sempre me estender a mão quando precisei, para mim, um exemplo de profissional humana e assídua.

A **Caroline Freitas**, amiga que ganhei no LABMORFA, por ser prestativa, paciente, defensora, amorosa, presente e excelente companheira de trabalho, muito obrigada por tudo. Sei que você vai alcançar coisas grandiosas. Agradeço a todos os meus colegas do LABMORFA, em especial a **João Augusto** e **Igor Renno** por toda ajuda durante os percalços do mestrado, pelos ensinamentos e por toda paciência para comigo, estou torcendo por vocês. Agradeço também a **Eduardo Vale** pelas boas risadas, a **Radan** e a **Hélio** por todo apoio intelectual a mim dado e a **João Vitor** por toda ajuda na rotina laboratorial. Agradeço

também a **Emanuel Lucas**, constituinte de outro laboratório, mas muito presente, por ter me ajudado a me situar no mestrado.

Agradeço a **Bruno Fernandes** técnico dos laboratórios de microscopia eletrônica de varredura e transmissão pela paciência.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial as minhas amigas **Nayane Batista**, **Andreza Brasil** e **Ayala Vale**, pela amizade, companheirismo, orações e por todas as ajudas sobre assuntos pertinentes ao mestrado. Como também a **Débora Xaxá**, **Nayane Oliveira** e **Priscila Fonseca** por todo apoio emocional.

Agradeço aos professores que aceitaram participar da banca da minha defesa de mestrado, **Alexsandra Fernandes Pereira**, uma excelente professora que tive a oportunidade de conhecer e ser aluna durante o mestrado, tem a minha admiração por seu método de ensino, capacidade e paciência e a **Amilton Cesar Santos** que eu não conheço, mas tenho admiração por sua produção científica. Muito obrigada por disponibilizarem seu tempo e paciência para participarem desta banca.

Agradeço a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro que me permitiu concluir essa jornada.

A **Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)** e ao **Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS)** pela disponibilidade do espaço, materiais e animais para a execução dessa pesquisa.

RESUMO

A ema é uma ratita silvestre com importância científica e grande potencial zootécnico, especialmente se considerado o atual estado de desenvolvimento do setor avícola brasileiro onde pesquisas voltadas ao incremento da produtividade da agropecuária brasileira assumem grande relevância. Estudos com anexos fetais e desenvolvimento embrionário são importantes, pois podem evidenciar informações imprescindíveis ao manejo reprodutivo e nutricional dos animais. O presente estudo foi desenvolvido levando em consideração a ausência de informações sobre a morfologia dos anexos fetais em emas, objetivando-se estabelecer um modelo padrão para os anexos nesta espécie. Ovos de emas foram incubados de zero a 36 dias (3, 6, 9, 12, 15, 21, 24, 27, 30, 33, 36) e foram realizadas as caracterizações macroscópicas e microscópicas dos seus anexos embrionários. Ao término do experimento constatou-se que o padrão de desenvolvimento observado em emas é similar ao de outras aves. Histologicamente observou-se que todos os anexos embrionários possuem camadas de folhetos germinativos: ectoderme, mesoderme e endoderme em sua constituição.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário e fetal. Avícola. Ratitas silvestres. Microscopia.

ABSTRACT

The greater rhea is a wild ratite with scientific importance and great potential and zootechnical value, especially considering the current state of development of the Brazilian poultry sector, where research aimed at increasing the productivity of Brazilian agriculture is relevant. Studies on fetal attachments and embryonic development are important, as they can provide essential information concerning reproductive and nutritional animal management. The present study was developed considering the lack of information on the morphology of fetal attachments in rheas and aiming to establish a standard model for fetal attachments in this species. Rhea eggs were incubated from zero to 36 days (3, 6, 9, 12, 15, 21, 24, 27, 30, 33, 36) and macroscopic and microscopic characterizations of their embryonic attachments were performed. At the end of the experiment, the findings indicate that the development pattern observed in rheas is similar to other birds. Histologically, all embryonic annexes exhibit germ layers, namely the ectoderm, mesoderm and endoderm.

Keywords: Embryonic and fetal development. Poultry. Wild ratites. Microscopy.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Os anexos embrionários de aves, a disposição desses e o início do desenvolvimento embrionário.....	19
Figura 2 - Exemplares de <i>Rhea americana</i> Linnaeus, (1758).....	28
Figura 3 -Incubadora utilizada na para chocagem dos ovos.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEMAS Centro de Multiplicação de Animais Silvestres

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária

CPVSA Centro de Pesquisas Vegetais do Semi-Árido

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICMBio Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN International Union for Conservation of Nature

MET Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV Microscopia Eletrônica de Transmissão

UFERSA Universidade Federal Rural do Semi-Árido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1 Rhea Cultura no Brasil	14
3.2 Morfologia dos órgãos reprodutivos	15
3.3 Desenvolvimento embrionário e anexos embrionários.....	17
3.3.1 Saco vitelínico	19
3.3.2 Âmnio	21
3.3.3 Alantóide	23
3.3.4 Cório	25
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Local de amostragem.....	27
4.2 Animais, bioética e protocolo anestésico.....	27
4.2.1 Animais.....	27
4.2.2 Bioética.....	28
4.2.3 Procedimento anestésico.....	28
4.3 Coleta	29
4.4 Caracterização macroscópica dos anexos fetais.....	30
4.5 Caracterização microscópica dos anexos fetais.....	30
4.5.1 Microscopia de luz.....	30
4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
4.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	32
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE A – ARTIGO 1	42
APÊNDICE B – ARTIGO 2	58
ANEXO A - SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (ICMBio)	72
ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFERSA).....	75

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMIÇÃO: ARTIGO DE REVISÃO.....	76
ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMIÇÃO: ARTIGO PRINCIPAL	77
ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMIÇÃO: ARTIGO COMPLEMENTAR	78

1 INTRODUÇÃO

A ema, *Rhea americana* Linnaeus, 1758 pertence ao Filo Chordata, Classe Aves, Ordem Rheiformes, Família Rheidae e Gênero Rhea, nativas geograficamente da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Uruguai (IUCN, 2016), são consideradas aves de grande porte, e quando adultas podem pesar até 36 kg (SANTOS, 1990).

As emas pertencem ao grupo das Ratitas por isso possuem algumas peculiaridades, tais como, os músculos peitorais pouco desenvolvidos, ausência de quilha no osso esterno, incapacidade de voar, capacidade de separar urina e fezes e ausência da glândula uropigiana. Essas características diferenciam esses animais de outras aves, inserindo-as no grupo das Ratitas (FOWLER, 1991). Por pertencerem ao grupo das Ratitas e apresentarem as características descritas anteriormente, elas também se aplicam aos avestruzes e emus. Santos et al. (2011) justificam a semelhança morfológica desses animais à proximidade evolutiva dessas espécies.

Segundo Thierry et al. (2013) o estudo do desenvolvimento embrionário animal possibilita acesso a informações muito importantes sobre as espécies, tornando possível identificar possíveis problemas no manejo alimentar e alterações comportamentais do animal durante o período de incubação dos ovos, como também, identificar problemas associados à condições ambientais e alterações hormonais ou problemas oriundos de estresse (OUYANG et al., 2012).

Nessa mesma linha de estudo, Almeida et al. (2015) relataram que estudos caracterizando o desenvolvimento embrionário em aves facilitam a aplicação de técnicas de reprodução como a incubação artificial, além de contribuir para o conhecimento da mortalidade embrionária. Considerando ainda o acentuado desenvolvimento do setor avícola nos últimos anos se faz importante a realização de pesquisas que busquem aproveitar de maneira eficiente o período produtivo e reprodutivo das aves, determinando as melhores condições de manejo a fim de evitar prejuízos ao longo do desenvolvimento embrionário (GROFF et al., 2017).

Apesar da relevância das pesquisas feitas desde o desenvolvimento embrionário que são especificadas pelos autores citados, ainda são escassos os estudos sobre os anexos embrionários de emas com idades entre zero a 36 dias de desenvolvimento embrionário e, sobretudo, não se tem registros de estudos sobre as modificações que ocorrem em seus anexos embrionários ao longo do processo de incubação.

Portanto, a finalidade do projeto foi caracterizar os anexos embrionários (âmnio, cório,

alantoide e saco vitelínico) de emas em diferentes dias de incubação natural, mas considerando a faixa entre zero a 36 dias de desenvolvimento embrionário, disponibilizando a comunidade científica informações importantes para incubação artificial até mesmo para a produção em cativeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Descrever a morfologia dos anexos embrionários e fetais de emas, *Rhea americana* Linnaeus, 1758 nos 36 primeiros dias do desenvolvimento embrionário.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Descrever macroscopicamente os anexos embrionários e fetais de emas, considerando a faixa entre 0 e 36 dias de incubação.
- ✓ Descrever com base em técnicas de microscopia de luz convencional, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão os anexos embrionários e fetais de emas, considerando a faixa entre zero a 24 dias de incubação.
- ✓ Descrever morfometricamente os ovos e os embriões de emas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Rhea Cultura no Brasil

Segundo Carrer (2000) no ano de seu estudo, a produção de emas era direcionada a produção de carne no continente europeu, sendo esse um mercado focado na qualidade e sanidade desse produto. O autor também descreveu algumas características dessa carne, tais como: bom perfil lipídico, valor calórico inferior ao encontrado na carne bovina, suína ou de frango, elevado teor protéico, baixo teor de gordura intramuscular, como também o benefício de não transmitir zoonoses parasitárias e boa aceitação do consumidor. Todas as características ressaltadas neste estudo possibilitaram a divulgação da carne de emas também para produtores brasileiros, sendo visto como um produto saudável e como uma nova opção de consumo da carne vermelha.

Em um manual prático denominado Rheacultura - criação de emas, Silva (2001) descreveu práticas de nutrição, reprodução, manejo e enfermidades para com esses animais. Foi relatado que no ano de 2001 a criação de emas em cativeiro despertou interesse dos empreendedores no Brasil, tendo em vista o alto valor comercial de seus subprodutos, tais como, carne, couro, pena, gordura e ovos, pois esses geraram perspectiva de bom lucro.

Conrado et al. (2007) em um estudo de eletroforese das proteínas plasmáticas de emas afirmaram em sua pesquisa que a rheacultura (criação de emas) estava aumentando no Brasil, mas que ainda não existiam informações suficientes sobre a espécie e nem um número satisfatório de médicos veterinários especializados na área. Apesar dessa afirmação, ainda não há estudos recentes que demonstram ou citem informações mais atuais sobre a rheacultura e número de médicos especializados na área no Brasil.

No mesmo ano, Machado et al. (2007) publicaram informações sobre a fauna silvestre no Brasil e seu potencial zootécnico, nessa publicação afirmou-se que animais como a ema, capivara, paca, cutia, cateto e queixada, têm uma excelente aptidão de corte e também

possibilidade de oferecer uma pele diferenciada e de alto valor. Além disso, foi citado que áreas de pesquisa, tais como, nutrição, genética, reprodução e manejo de animais silvestres contribuem para uma melhor qualidade de criação e multiplicação da fauna em cativeiro.

Pereira (2008) em um estudo feito com emas em criatórios da região sul do Brasil alegou que as emas possuem subprodutos de boa qualidade e que a produção das mesmas

acontece em um curto período de tempo, utilizando uma menor área de criação em relação a outras atividades, como por exemplo, a bovinocultura. Devido à necessidade de menos espaço e da rapidez na produção, a criação desses animais pode ser uma alternativa para os produtores rurais que não possuem grandes hectares de terra e que desejam diversificar a produção de sua fazenda.

Em trabalho de revisão Cervi et al. (2016) descreveram as características físicas, químicas e microbiológicas de ovos de ratitas e afirmam que o desenvolvimento comercial da criação desses animais estimulou pesquisadores e criadores a estudarem maneiras mais apropriadas para criação e elevação dos índices zootécnicos desses animais, para assim elevar a qualidade de seus subprodutos, como: ovos, carne, óleos corporais e plumas.

De acordo com Cervi (2018) o Brasil é o país que possui a maior quantidade de emas e a produção de ovos destas pode diversificar atividades agropecuárias, isto quando em concordância com o estipulado pela FAO, a organização institui que a atividade seja executada agro ecologicamente para a sustentabilidade social e ambiental.

Devido a escassez de pesquisas voltadas à rheacultura, não foi possível obter uma atualização maior sobre o tema.

3.2 Morfologia dos órgãos reprodutivos

Em sua tese Goes (2004) descreveu características reprodutivas de emas (*Rhea americana*) criadas em cativeiro no estado de São Paulo, dos 69 animais analisados em estação reprodutiva 44 apresentaram falos grandes e desses apenas 26 em forma de espiral. Foram encontradas diferenças significativas de níveis plasmáticos de testosterona em animais (53,28±18,41ng/ml dentro da estação reprodutiva e 5,57±3,81ng/ml fora da estação reprodutiva) e vários tamanhos de falos, dentro e fora da estação reprodutiva, os animais com maiores níveis de testosterona foram descritos como dominantes por meio de observação comportamental.

Parizzi et al. (2007) descreveram a morfologia do ovário de emas e observaram que as características morfológicas do ovário de emas são resultado do tamanho do ovo produzido por esses animais. Esses observaram que o ovário esquerdo desses animais é bem desenvolvido e sustentado pelo mesovário, já os folículos se apresentaram unidos à superfície ovariana pelo pedúnculo foliar. Histologicamente foi visualizado que a medula é constituída por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos, que o córtex possui células da teca externa e interna. Sob a superfície do ovário observaram epitélio cúbico baixo e sob o tecido conjuntivo

da túnica albugínea epitélio germinativo.

Carvalho (2009) estudou a morfologia macroscópica, microscópica testicular e epididimária em emas e encontrou em seus resultados que a organização e estrutura celular luminal do túbulo seminífero e epididimário da ema mostravam-se semelhantes ao do avestruz, galo doméstico, peru, pato e codorna, porém com algumas diferenças que caracterizaram a espécie. Também notou-se assimetria nas medidas do testículo e epidídimo na qual o direito foi superior ao esquerdo. Os testículos desses animais apresentaram como características o formato cilíndrico, túnica albugínea fina, densa e transparente. O autor também visualizou a influência do ambiente nas características de biometria testicular e epididimária, com magnitude superior no período de estação sexual.

Santos et al. (2011) afirmaram que as emas apresentam semelhança morfológica ao avestruz e aos emús e que isso se dá devido à proximidade evolutiva das espécies. Ressaltando o encontrado por os autores anteriormente citados, esses observaram semelhança morfológica desses animais com outras espécies de aves, também descreveram a morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca da ema, os autores observaram que a cloaca possui três regiões distintas: o coprodeu, o urodeu e o proctodeu e um falo intromitante. A morfologia apresentada se assemelha ao emu e se diferencia do avestruz, já que esse não possui a porção intromitante.

Em relação ao aparelho reprodutivo masculino, Santos et al. (2011) observaram que este é composto por testículo, epidídimo e ductos deferentes com semelhanças anatômicas com as demais aves. O testículo foi descrito como sendo de formato alongado e localizados na região intra-abdominal dorsal, as células desses diferiram em adultos e em animais jovens, já o epidídimo descrito como alongado e fusiforme e o ducto que apresentam-se diferentes com trajeto sinuoso nos adultos e retilíneo nos jovens.

Morais et al. (2012) destacam que o estudo da morfofisiologia sobre a reprodução das aves é relevante, pois permite conhecer a dinâmica reprodutiva dos órgãos genitais de aves domésticas e silvestres. Freneau et al. (2016) realizaram pesquisa sobre os aspectos da espermatogênese e morfologia testicular de emas e observaram que a cápsula testicular é dividida em região epididimal e região testicular, sendo histologicamente a cápsula testicular descrita por ter três camadas de tecido fino: uma de túnica serosa, outra de túnica albugínea e a última de túnica vasculosa, sendo estas descritas da mais externa para a mais interna, respectivamente.

Oliveira et al. (2018) descreveram a morfologia da bolsa cloacal de emas jovens através de microscopia de luz, eletrônica de transmissão e de varredura, diante disso foi

encontrado em seus resultados que o padrão morfológico da bolsa cloacal das emas diferem do de outras aves anteriormente estudadas, como: pato selvagem, galinha da angola, ganso nativo, peru, codorna japonesa e falcão, pois nessas aves foram observadas pregas em toda a superfície da mucosa interna e em cada prega um aglomerado de lóbulos ou folículos linfoides separados por trabéculas de tecido conjuntivo, já nas emas observou-se a mucosa pregueada composta por lóbulos linfoides, de diversos tamanhos que estão distribuídos isoladamente na lâmina própria como estrutura alveolar. Outra divergência observada foi em relação ao epitélio associado ao lóbulo bursal. nas emas esse foi do tipo pavimentoso simples e nas demais aves não foi observado.

Em um estudo recente Freneau et al. (2021) discutiram a respeito dos aspectos morfológicos da microscopia do epitélio do epidídimo das emas e Rete testis, pode-se observar que ambos se assemelham às de galo, avestruz e codornas japonesas em alguns aspectos. Em relação ao epitélio do Rete testis, os autores relataram ser do tipo cuboidal, pseudoestratificado com células não ciliadas em emas, patos e na maioria dos pássaros, porém diferente do encontrado em avestruz na qual foi verificado um epitélio simples. Em se tratando dos ductos eferentes observou-se uma grande quantidade de cílios o que se assemelhou a avestruzes e codornas, também foi averiguado uma substância amorfa presente em células não ciliadas também descrita em outros estudos com galinhas, codornas e perus. Outros dados que também se assemelham aos encontrados em avestruz foi em relação a proporção volumétrica do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos durante a atividade sexual.

3.3 Desenvolvimento embrionário e anexos embrionários

Riveros et al. (2010) em um estudo na qual analisaram a relação biológica entre o saco vitelínico e o embrião, citam que apesar da maioria das espécies de animais possuírem particularidades quanto ao desenvolvimento inicial, todas desenvolvem uma sequência semelhante: segmentação, clivagem, gastrulação, neurulação e organogênese. Esses também afirmam que para que o desenvolvimento de um indivíduo aconteça são necessárias algumas condições, como: fluabilidade, condições térmicas, químicas e osmóticas que sejam constantes e adequadas de acordo com a espécie.

Björkman (1982) por sua vez relatou que os vertebrados vivíparos só conseguem obter as condições mencionados no parágrafo anterior se desenvolverem as membranas extra embrionárias (cório, âmnio, alantóide e saco vitelínico).

Hincke et al. (2019) ressaltaram a importância dessas membranas em um estudo denominado dinâmica de barreiras estruturais e componentes imunes inatos durante a incubação do ovo aviário, foi percebido que durante o desenvolvimento do embrião as membranas extra embrionárias são elaboradas para apoiar as funções vitais do mesmo, como circulação, digestão e respiração. Relataram também que o aparecimento de membranas extra embrionárias no início da incubação adicionam um maior nível de defesa ao ovo e ao embrião, pois apesar de não existir uma avaliação abrangente do papel dessas estruturas na defesa por estarem envolta no embrião e absorverem compostos da casca, gema e albúmen, possibilitam realocação de defesas moleculares presentes no ovo e a execução de novos sistemas de defesa pelo embrião.

Na mesma linha de pesquisa, Neto et al. (2009) realizaram uma importante colocação na qual ponderam que as informações embrionárias e fetais, descrições morfométricas e macroscópicas das membranas extra embrionárias são tratadas de forma ineficiente e, às vezes, confusa na literatura por isso são necessárias mais investigações sobre o tema.

Até que os anexos embrionários sejam formados uma série de processos ocorrem, o primeiro deles é a fertilização ou fecundação. De acordo com Garcia e Fernández (2012) a fertilização possui diferentes etapas: ativação e encontro de gametas, reação acrossômica, reconhecimento espécie-específica, bloqueio da polispermia, fusão das membranas plasmáticas dos gametas, ativação do metabolismo adormecido, fusão de pró-núcleos e controle da divisão celular. Após a fecundação em aves, mamíferos e répteis, o ovo estaciona-se em metáfase II, porém com a entrada do espermatozoide conclui-se a divisão meiótica, essa é controlada por MPF (complexo formado pela proteína cinase e ciclina que regulam sua atividade catalítica).

Após fecundados, Everaert e Decuypere (2013) discorreram que quando inseridos a incubação em temperaturas entre 37,5 a 37,8°C, umidade relativa de 55 %, viragem e ventilação, os ovos das aves conseguem desenvolver todo o período embrionário. Em frangos, Cesário (2013) pesquisou sobre o desenvolvimento embrionário pré e pós-postura, esse constatou que após o início da gastrulação que ocorre após as primeiras horas de incubação, a linha primitiva é formada. Essa linha cresce e dá origem a mesoderme localizada entre o hipoblasto e o epiblasto, e então os folhetos embrionários se tornam aparentes que são: ectoderme, mesoderme e endoderme, posteriormente os prolongamentos dos mesmos folhetos dão início a formação dos anexos embrionários.

A figura 1 demonstra os anexos embrionários de aves, a disposição desses e o início do desenvolvimento embrionário. Estes anexos são descritos nos seguintes itens.

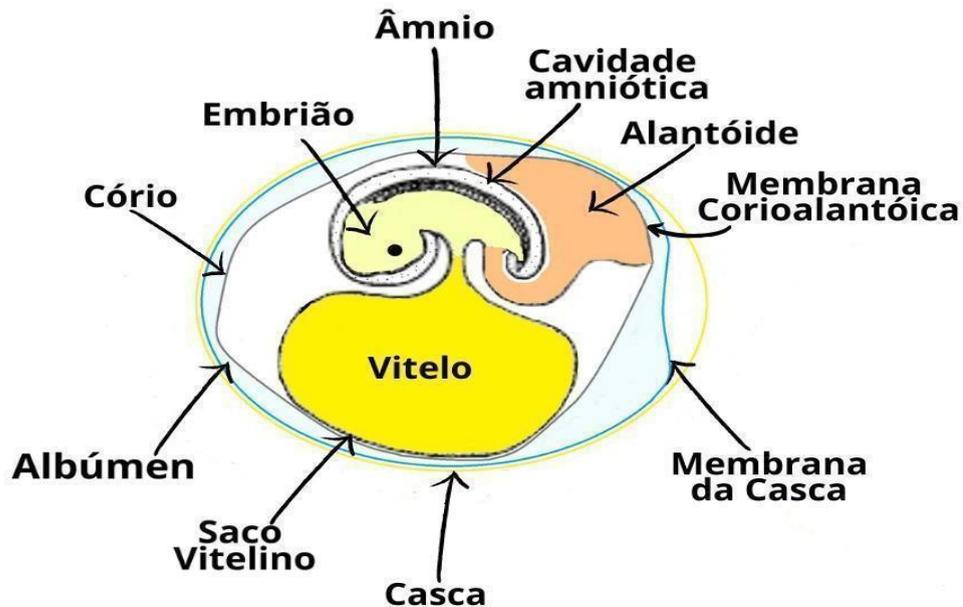


Figura 1 - Os anexos embrionários de aves, a disposição desses e o início do desenvolvimento embrionário.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

3.3.1 Saco vitelínico

Nas aves a primeira membrana a se formar é a do saco vitelino, essa tem a função de estabelecer trocas entre o embrião e a mãe (MOSSMAN, 1987). Monteiro (2017) descreve o mesmo como sendo de origem endodérmica com função principal de reserva nutricional para o embrião. Evolutivamente, a membrana vitelina está presente no ovócito de peixes (GODINHO, 2003), na casca e ganga dos répteis (MENEGHEL, 2008), em aves e em mamíferos (GARCIA e FERNANDES, 2012).

Quando se tratando de comparação da morfologia funcional entre o saco vitelínico de répteis e aves estes que são mais próximos evolutivamente, Blackburn (2020) afirmou que a evolução para o padrão aviário de saco vitelínico envolveu uma dependência maior da digestão extracelular da gema, por isso o desenvolvimento embrionário ocorre de maneira mais rápida do que em répteis.

Segundo Riveros et al. (2010) o saco vitelino do embrião é um anexo presente em todas as espécies de vertebrados e a função de reserva nutricional ocorre devido ao armazenamento e transferência do vitelo, que é o líquido armazenado pelo saco vitelínico designado para atender as exigências nutricionais do embrião até que esse possua outros

mecanismos responsáveis por nutri-los, como por exemplo, cordão umbilical ou placenta verdadeira, em mamíferos. Em aves, o saco vitelínico é a única membrana responsável pela nutrição do pintinho até que este ecloda, outras funções do anexo são: síntese de proteínas, atividade fagocitária, transferência de materiais e hematopoese (formação das primeiras células sanguíneas).

Alguns outros autores também exploraram outras funções do saco vitelínico em aves, tais como, Sugimoto et al. (1999) que visualizaram que as proteínas do albúmen se movem na gema e depois no embrião através da membrana do saco vitelino em frangos, Fairchild et al. (2006) relataram que o saco vitelínico só é completamente absorvido após 14 dias da eclosão, servindo para nutrir o animal mesmo após eclodido o que ocorre não só em frangos, mas também em outras as aves, exceto em aves na qual os filhotes não absorvem todo o saco vitelínico e esse persiste ao longo de toda a vida, como é o exemplo de alguns pássaros. Yadgary et al. (2011) ressaltam a relevância do saco vitelínico em ser o local de produção de células sanguíneas primitivas e síntese de proteínas específicas.

Sophie Réhault-Godbert e Nicolas Guyot (2018) que por sua vez, relataram ser o saco vitelínico incorporado como parte do intestino delgado dos pintos em formação e representa uma estrutura que fornece nutriente e proteção aos pintinhos recém-eclodidos, até que esses possuam seu trato digestivo completo e sistema imunológico funcional.

Hincke et al. (2019) ao utilizarem ovos de galinhas descreveram que a membrana vitelínica forma uma matriz proteica extracelular em torno da gema e do oócito, essa por sua vez fornece uma separação física do albúmen. Segundo os mesmos, a membrana possui camada interna e externa. Na camada interna eles observaram proteínas da zona pelúcida que permitem a adesão de espermatozoides durante a fertilização. Já a membrana externa forma-se após a ovulação no local da fertilização, essa membrana fornece benefícios físicos e proteção molecular para impedir que patógenos atinjam a gema do ovo.

Relatando o processo de incubação de pintinhos de galinha, Kasielk (2020) relatou que esse serve como primeiro órgão respiratório para o embrião, isto devido estar em contato com a superfície interna da membrana da casca. Afirmou também que mesmo após a eclosão o saco vitelínico contém anticorpos maternos e fornece alguma imunidade ao embrião enquanto o sistema imunológico ainda não está completo, já que o mesmo não tem função imunológica ativa.

Apesar de ser considerado um órgão de absorção, Starck (2020) comentou que em aves ele não faz parte nem morfológica e nem funcional do intestino embrionário, e que a absorção da gema acontece na verdade através do endoderma extra embrionário a partir da

atividade fagocítica do mesmo.

Por ser uma membrana com inúmeras funções vem sendo objeto de estudo em pesquisas, Gadelha et al. (2021) em uma revisão de literatura reafirmaram o uso desse por diversos autores em pesquisas relacionadas a eventos hematopoiéticos, como ontogenia do sistema hematopoiético em vertebrados (GUEDES et al., 2014), células tronco, estudos proteômicos e terapia celular (RIVEROS et al., 2010).

3.3.2 Âmnio

Segundo Vanderley e Santana (2015) os animais do filo chordata podem ser encontrados em duas classes: anamniotas (inferiores), compostos pela superclasse Pisces e pela classe Amphibia (superclasse Tetrapoda) e amniotas (superiores), compostos por mamíferos, aves, répteis e anfíbios (superclasse Tetrapoda).

O âmnio compreende a membrana extraembrionária que mantém maior relação com o embrião. Segundo Gris et al. (2002) a membrana amniótica consiste de uma membrana basal densa e matriz estromal avascular. Vanderley e Santana (2015) o definem como um saco membranoso completo pelo líquido amniótico que é formado pelo dobramento da ectoderme e acompanhado pela mesoderme somática. Monteiro (2017) descreve-o como sendo de origem ectodérmica, na qual envolve o embrião e acumula o líquido amniótico, sendo esse o responsável por proteger o embrião contra choques mecânicos e contra micro-organismos.

Vanderley e Santana (2015) também afirmaram que essa classificação é fundamentada devido a necessidade das espécies, pois os animais anamniotas possuem uma reprodução mais simples, já que a postura de ovos ocorre na água, isto quando comparada com os amniotas, como répteis e as aves que possuem postura na terra e por isso necessitam de envoltórios embrionários mais complexos.

Garcia e Fernandez (2012) reafirmaram que para a evolução a presença do âmnio foi relevante, esses comentam que problemas reprodutivos anteriormente manifestados por anfíbios foram solucionados com répteis, pois esses são completamente terrestres e isso foi possível devido ao ovo amniótico, o desenvolvimento desse tipo de ovo foi também importante para aves e mamíferos, descendentes deles.

Em galinhas, algumas funcionalidades do âmnio foram descritas por diversos autores, tais como regulação da concentração de aminoácidos e outras substâncias por meio de mensageiros humorais (PIECHOTTA et al., 1998), absorção de proteínas do albúmen por

meio do líquido amniótico para posterior absorção embrionária (SUGIMOTO et al., 1999). Sugimoto et al. (1999) também afirmaram que o líquido amniótico pode entrar em contato diretamente com o embrião através de um canal aberto na região da cabeça, onde o sistema neural é formado.

Na mesma linha de pesquisa, porém em codornas Yoshizaki et al. (2002) em testes de imunotransferência no âmnio observaram a proteína ovalbumina e presumiram assim que, provavelmente, a principal via de transporte de proteínas do albúmen deve ser albúmen, cavidade extraembrionária, cavidade amniótica, sistema celular intestinal e por fim a gema.

Posteriormente, Dertkigil et al. (2005) relataram que o líquido amniótico é fundamental no desenvolvimento dos sistemas músculo esquelético, gastrointestinal e respiratório fetal das aves. Gonçalves et al. (2013) constatou em galinhas outra importante função do fluido amniótico durante a incubação, segundo os mesmos esse fluido prepara o trato gastrointestinal para receber os nutrientes externos após a eclosão, pois esse é responsável pela primeira refeição do embrião, sendo consumido anteriormente a bicagem interna da casca do ovo e iniciando do 13º dia de incubação ao 18º dia de incubação.

Ainda em relação ao líquido amniótico, Shbailat e Abuassaf (2018) em pesquisa com patos (*Anas platyrhynchos*) observaram que após o vigésimo quarto dia de incubação, esse é completamente absorvido pelo embrião.

Em frangos, segundo Hincke et al. (2019) o fluido amniótico é também reabsorvido direta ou indiretamente pelo embrião para apoiar a aceleração do metabolismo do mesmo durante a fase de crescimento. A explicação dada para tal acontecimento é que o âmnio de frangos não coleta produtos excretores, como ocorre em mamíferos, isto devido ao influxo de proteínas do albúmen que são, posteriormente, absorvidas pelo embrião para apoiar o seu crescimento. Essas proteínas do albúmen são importantes, pois estão associadas ao metabolismo de nutrientes, a resposta imune e ao processo de desenvolvimento das aves. Ressaltando assim, ainda mais a relevância do âmnio e do fluido amniótico as aves.

Hinckie et al. (2019) relataram também que a membrana amniótica representa a última barreira física antes de atingir o embrião, e que a plasticidade dessa membrana é essencial para apoiar a entrada de água desde o início do desenvolvimento e no albúmen durante a segunda metade da incubação.

Outra funcionalidade do âmnio foi dada por Kasielk (2020) que é a de amortecimento enquanto o embrião se desenvolve, esses descreveram que o âmnio possui fibras musculares que evitam que o embrião grude nele até que os músculos embrionários se desenvolvam e desempenhem essa função.

Além do que foi anteriormente citado, quando ocorre a necessidade de vacinação na fase incubatória, Rufino et al. (2018) discorreram que o âmnio é o lugar adequado para a realização das mesmas, isso devido a possibilidade de que essa seja aspirada e digerida para uma assimilação sistêmica mais completa pelo embrião.

O âmnio é uma membrana com potencial em utilização para pesquisas, Gadelha et al. (2021) comentaram em uma revisão de literatura que essa pode ser usada para estimular a cicatrização de lesões epiteliais e oculares, cirurgias vaginais reconstrutivas, reparo de hérnias abdominais, fechamento de pericárdio e prevenção de aderência cirúrgicas (TURNER et al., 2011), como também pode ser utilizada em estudos de engenharias de tecido por possuírem células tronco pluripotentes e mesenquimais (LANGE-CONSIGLIO et al., 2012; FAVARON et al., 2015; CARDOSO et al., 2014).

Os achados corroboram com o relatado por Gao et al. (2012) que testaram em galinhas a potencialidade da diferenciação de células tronco epiteliais amnióticas e visualizaram que essas exibem características de células-tronco multipotentes. Conseguindo então se diferenciar em células semelhantes a ilhotas pancreáticas, osteoblastos, adipócitos e células semelhantes a neurônios, sendo considerados bons candidatos a terapia de transplante celular e engenharia de tecidos.

3.3.3 Alantóide

O alantóide é a membrana extraembrionária que na maioria dos vertebrados vai interagir com o cório para formação de uma placenta. No caso das aves a mesma possui função basicamente de depósito de produtos de excreção. Vanderley e Santana (2015) descrevem que as duas principais funções do alantóide são respiratórias e de armazenamento de produtos de excreção do embrião. Os autores também afirmam que esse é formado a partir de um divertículo da parede ventral do intestino posterior, como um resultado do dobramento caudal e que se apresenta primariamente como um saco e depois se espalha entre as paredes do âmnio e envolve a cavidade amniótica e saco vitelínico.

Já Monteiro (2017) em um livro com o mesmo fim, afirmou que o alantóide é formado a partir do endoderma e que esse em répteis e aves têm função respiratória, pois para executar as trocas gasosas entre o embrião e o meio ele cresce até chegar na casca do ovo. Outra função também descrita para ovíparos é de excreção, devido ao alantóide ser o lugar onde o embrião excretar o ácido úrico, uma última função descrita pelo autor é o auxílio que o alantóide presta

na formação óssea a partir do transporte de cálcio até a casca do ovo. Deeming (2002) estudando a incubação de avestruz descreveu que o líquido alantóide é um resíduo dos rins que em desenvolvimento aumentam a amônia, ureia e ácido úrico.

Outros autores ressaltaram a importância do alantóide, Baggott (2009) o define como um repositório para excreções renais que entram via ducto alantóico da região cloacal do intestino grosso, segundo o autor o alantóide também se expande e preenche o celoma extraembrionário, de modo que sua vascularização mesodérmica é fundida com o cório para formar o corioalantóide e com o mesoderma avascular do âmnio.

Silva et al. (2017) afirmaram que a capacidade de se expandir do alantóide possibilita o aumento da absorção de nutrientes pelas aves. Corroborando com o estudo anterior, Hincke et al. (2019) observaram que os aminoácidos, peptídeos e proteínas resultantes do metabolismo embrionário são secretadas no saco alantóico de onde podem ser reabsorvidos pela membrana corioalantóica. Essa membrana cobre todas as estruturas do ovo, sendo vista como uma segunda barreira física após a casca do ovo durante o desenvolvimento. Também comentaram a respeito da transferência de proteínas intestinais para o saco alantóico, sugerindo que pode acontecer de forma direta por essa via.

Para a evolução do modelo de reprodução ovípara para o modelo vivíparo, Hincke et al. (2019) discorrem sobre a importância do alantóide e sobre distinções importantes entre as estruturas extra embrionárias das aves e dos seres humanos, na qual em seres humanos o saco alantóico faz parte do cordão umbilical, por isso a urina é secretada no saco amniótico; já nas aves, o saco alantóide é uma estrutura independente, então os resíduos metabólicos são excretados nesse saco. Também em aves, Kasielke (2020) relatou que os resíduos urinários contidos no fluido alantóico são mantidos em suspensão até perto da eclosão quando a concentração faz com que eles precipitem na forma de filamentos de uratos brancos e opacos.

Em relação a utilização em pesquisas, o alantóide pode ser usado como modelo para isolamento e identificação de vírus pela inoculação de ovos de aves embrionárias livres de patógenos específicos (SPF) (JOSLING, 1998, MARTINS, 2001 e ABOLNIK et al., 2004), como um modelo in vivo de síntese de estrogênio (GILL et al., 1983), além de ser utilizado em conjunto com o cório, descrita no próximo tópico.

3.3.4 Cório

O cório é uma membrana extraembrionária que forma a parede externa dos blastocistos em répteis, aves e mamíferos. Ele é formado pela mesoderme extra embrionária e duas camadas de trofoblasto que envolvem o embrião e as outras membranas, unindo-se com o alantóide para desempenhar função respiratória e se localiza logo abaixo da casca.

Baggott (2009) discorreu em um estudo realizado com frangos que o cório desenvolve-se a partir de tecido contínuo com o âmnio e longe do embrião. Vanderley e Santana (2015) afirmaram que a membrana do cório possui um grande contato com as membranas da casca e por isso mobilizam minerais da casca para a construção do esqueleto e ajudam também na respiração. Essa membrana em um ovo em processo de incubação interage com o alantóide formando a membrana corioalantóide.

De acordo com Woodruff et al. (1931) a membrana corioalantóide é formada pela fusão do cório com a parede externa do saco alantóide e tem sido utilizada em aves por vários pesquisadores num estudo do crescimento de tecidos implantados. Narbaitz (1995) comentou que o interesse da pesquisa sobre a membrana corioalantóide começou, principalmente, devido à necessidade de relacionar as diferentes funções e identificar os componentes moleculares e mecanismos dessa membrana.

Ribatti et al. (2001) em relação ao processo de fusão entre o cório e o alantóide relataram que esse processo é dirigido pelo aumento rápido da vesícula alantóica que ocorre a partir do 4º até o 10º dia de incubação (em frangos), promovendo a fusão dessas estruturas. Em se tratando da funcionalidade da membrana córioalantoide, Baldavira (2017) mencionou que a membrana corioalantóide é crucial para o desenvolvimento do embrião, pois além do transporte de cálcio a partir da casca do ovo, realiza trocas gasosas, equilíbrio ácido-base e reabsorção de eletrólitos a partir da cavidade alantóica, onde se encontram os resíduos urinários.

Kasielk (2020) corroborando com o estudo anterior, afirma ser o corioalantóide o principal órgão respiratório do embrião durante a maior parte da incubação, permitindo a transpiração de oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água de sua densa rede vascular através da casca, também relata que o corioalantóide forma a bolsa de albumina que permite o consumo de albumina pelo embrião através do âmnio e facilita o final do crescimento do mesmo, outra importância do corioalantóide citada pelo autor é o transporte de cálcio, minerais e oligoelementos da casca do embrião para o embrião em desenvolvimento.

Próximo à eclosão, Kasielk (2020) relata que o embrião já ocupa quase todo o tamanho do ovo, exceto da câmara de ar tornando a capacidade de troca gasosa insuficiente aparecendo hipóxia e hipercapnia, o embrião consome os fluídos restantes, a célula de ar começa a ser rebaixada e as membranas internas e externas começam a se separar, o animal começa a bicar quando ocorre a contração dos músculos que fazem com que esse perfure a membrana interna com o bico e a respiração pulmonar se inicia. O que estimula essa bicagem é o aumento de CO_2 e diminuição de O_2 , as contrações diminuem à medida que as trocas gasosas melhoram e então a exposição ao ar e o momento de fricção do embrião, a vasculatura do corioalantóide começa a retroceder em torno da câmara de ar e então no selo umbilical pouco antes da eclosão.

A membrana corioalantóide tem sido utilizada em diversas pesquisas e estudos recentes como o de Abd El Hafez et al. (2021) que utilizaram a membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados livres de patógenos específicos para detecção molecular do vírus da varíola de pombos, através de diferentes técnicas sorológicas e moleculares para isolamento e detecção do vírus os autores detectaram anticorpos neutralizantes em seis das oito amostras e possibilitaram a partir desse isolamento que a cepa egípcia local isolada possa ser utilizada na produção de vacinas para uma estratégia de vacinação.

Gadelha et al. (2021) também citou sua importância em várias pesquisas como em ensaios para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular (OLIVEIRA et al., 2012), para avaliação de efeitos toxicológicos de complexos de rutênio e para avaliar a viabilidade celular das linhagens de células LLC-MK2 (células de túbulo proximal renal de macaca mulata) por meio de teste de viabilidade celular (LIMA, 2019). Outras utilizações também mensuradas na literatura são indução de formação óssea a partir da utilização da membrana corioalantóide de embriões de pinto de galinha de 7 a 8 dias de idade (EKANAYAKE, 1990). Yuha et al. (2014) comentou que por ser uma membrana altamente vascularizada e de fácil acesso tem sido utilizada em estudos das mais diversas áreas, incluindo biologia, oncologia, farmácia e estudos utilizando pesquisas de regeneração de tecido.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de amostragem

O material de estudo coletado que são as membranas extra embrionárias de emas (*Rhea americana*), foram obtidos no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizado a uma altitude de 16 metros da cidade de Mossoró-RN, situada no semiárido do Nordeste brasileiro. Esse centro ocupa uma área de 20 ha e está registrado pelo IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912. A incubação dos animais e os procedimentos de macroscopia e microscopia foram realizados nas dependências da UFERSA.

4.2 Animais, bioética e protocolo anestésico

4.2.1 Animais

A ema é uma ave de grande porte que se destaca dentre as demais por ser uma ave desprovida da capacidade de voar e por isso é comumente denominada de ratita. São onívoras e se alimentam de frutas, sementes, folhas de grandes árvores, lagartos, insetos, entre outros. Dentre os diversos comportamentos apresentados pelas emas destaca-se o fato de que são os machos os responsáveis pela incubação e o cuidado com os filhotes. A mesma pertence ao:

Reino: Animalia

Filo: Chordata Classe: Aves

Ordem: Rheiformes

Família: Rheidae

Gênero: Rhea

Espécie: *Rhea americana* (Figura 02).



Figura 2 - Exemplares de Rhea americana Linnaeus, (1758).

Fonte: CEMAS - UFERSA, (2021).

4.2.2 Bioética

De antemão a execução do experimento proposto, o projeto foi submetido ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) e a Comissão de Ética e Bem Estar no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA, para fins de validação da metodologia e procedimento anestésico e de eutanásia, este foi aprovado e está disponível em anexo.

4.2.3 Procedimento anestésico

Para descrever o desenvolvimento das membranas extra embrionárias os ovos utilizados no processo de incubação natural foram com idade de zero a 36 dias de incubação, abertos pelo polo de posicionamento da câmara de ar com o uso de micro retifica (DREMEL 3000) e em seguida foi inserido um chumaço de algodão embebido com superdosagem de isoflurano (ISOFORINE). Posteriormente, os ovos foram envoltos e cobertos com papel filme (ISULFILME) de modo a conter a concentração do anestésico e garantir a analgesia por até 10 minutos, de modo a garantir o óbito dos animais (Adaptada de GUIDA, 2018). Embriões com menos de 10 dias de incubação foram eutanasiados por hipotermia, sendo mantidos em temperatura menor que 4°C por até 4 horas (Conselho Federal de Medicina Veterinária, CFMV, 2013).

4.3 Coleta

Para caracterizar os anexos embrionários: cório, alantoide, saco vitelino e âmnio. Foram coletados três ovos por dia, afim de incuba-los de 0 a 24 dias com intervalo de 3 dias entre as coletas (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 dias de incubação) para caracterizar microscopicamente os anexos embrionários. Seguidos pela coleta de mais um ovo por dia, com o mesmo intervalo, até 36 dias de incubação (27, 30, 33, 36 dias de incubação), para a caracterização macroscópica dos mesmos. Assim que coletados, os ovos foram higienizados e levados à incubadora - Modelo - Luna 240/Chocmaster, Premium Ecológica LTDA a uma temperatura média de 36,5°C e umidade relativa de 52 a 56%. Desse modo, foi considerado o intervalo de 24 horas como o primeiro dia do processo de incubação. Antes da incubação, cada ovo recebeu uma numeração a base de caneta nanquim e em seguida foram pesados em balança analítica de precisão com divisão 0,0001mg (MARTE®) e obtidas as medidas de comprimento e largura por meio de um paquímetro com divisão 0,001 mm (MITUTOYO®). Os dados foram compilados em uma planilha individual com as informações detalhadas da postura. A figura número 4 ilustra o trabalho de identificação dos ovos.



Figura 3 -Incubadora utilizada na para chocagem dos ovos.

Fonte: CEMAS - UFERSA, (2021).

4.4 Caracterização macroscópica dos anexos fetais

Para a análise macroscópica foram removidos os anexos embrionários (cório, alantóide, saco vitelino e âmnio) e analisados em todas as superfícies: ventral, medial, lateral e dorsal, utilizando uma lupa (ZEISS - 10x), depois de identificadas, as estruturas foram fotografadas, esquematizadas e nominadas segundo nomenclatura adotada pelo Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium (1993). Todos os dados foram comparados na literatura referente a estudos com aves (domésticas e silvestres).

4.5 Caracterização microscópica dos anexos fetais

4.5.1 Microscopia de luz

A fim de realizar a microscopia de luz, fragmentos das membranas extra embrionárias (cório, alantóide, saco vitelino e âmnio) foram coletados e fixados em solução paraformaldeído 4% tamponado com solução de fosfato de sódio 0,1M (PBS) e pH 7,4.

Após fixação foi realizado então os procedimentos de desidratação, diafanização, parafinização, inclusão, microtomia e coloração, conforme a metodologia empregada em técnicas de histologia preconizadas por Junqueira e Carneiro (2013), descritas em ordem:

- a. Identificação: o material foi identificado e colocado no cassete.
- b. Desidratação: os fragmentos foram lavados em água corrente para retirada do excesso de fixador durante 30 minutos e então submetidas a processos de desidratação, as amostras então foram imersas em álcoois de concentração crescentes (70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%) por um período de 30 minutos em cada álcool.
- c. Diafanização: nesse processo, ocorreu dois banhos de xilol por 30 minutos/cada, para total retirada do álcool da amostra.
- d. Parafinização: os fragmentos foram imersos em parafina histológica em estufa a temperatura de 58°C, o primeiro banho em parafina obteve duração de 3 horas e o segundo banho de apenas uma hora.
- e. Inclusão: para a inclusão, foram montados moldes e inserido nesses moldes uma nova parafina em pequena quantidade, então o material e mais parafina foram colocados a fim de cobrir todo o material, resultando na confecção dos blocos histológicos.
- f. Microtomia: após a secagem dos blocos histológicos foi realizada a clivagem na espessura de 5µm de espessura com a utilização de micrótomo, esses fragmentos foram então aderidos

em lâminas de vidro que em seguida foram levados à estufa a 58 °C durante 6 horas para desparafinação.

g. Coloração: a técnica de colorações utilizada foi de Hematoxilina – Eosina (HE).

h. Hematoxilina-Eosina: as lâminas foram inseridas em uma barca de coloração e

i. então imersas em várias cubas, primeiro em uma cuba contendo xilol por 10 minutos, seguida por um outro xilol por mais 10 minutos e em álcoois de 100%, 95%, 70%, respectivamente durante 3 minutos/cada, posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente durante 3 minutos, imersas em hematoxilina durante 5 minutos, mergulhadas rapidamente em álcool ácido e lavadas em água corrente durante 10 minutos. Em seguida as lâminas foram imersas em eosina por 3 minutos, mergulhadas em água destilada, mergulhadas em álcool 95% e 100%, então imersas em álcool 100% por 2 minutos, em álcool/xilol por 2 minutos, em xilol puro por 2 minutos, em um outro xilol por mais 3 minutos e então em mais um outro xilol por 3 minutos, em seguida o material foi retirado para uma secagem natural por 15 minutos e então foram montadas as lamínulas nas lâminas para análise em microscópio de luz.

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os fragmentos das membranas extra embrionárias (cório, alantóide, saco vitelino e âmnio) serão coletados e para serem submetidos à técnica de microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Vegetais do Semi-Árido (CPVSA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, será utilizada a metodologia descrita por Oliveira (2004), representada adiante:

a) Fixação: o material foi fixado em Glutaraldeído 2,5% tamponado com fosfato desódio 0,1M e pH 7,4.

b) Pós-fixação: após a fixação, foi retirado o fixador da placa e com auxílio de uma pipeta e uma seringa com agulha (retirada do fixador com agulha e inserção de nova água com a pipeta), posteriormente os fragmentos de interesse foram lavados três vezes com duração de 5 minutos cada com água destilada para a retirada do excesso do fixador, essa então foi pós-fixados com Tetróxido de Ósmio 0,5% anteriormente diluído em água destilada (1g de tetróxido de ósmio para 50ml de água destilada) de trinta minutos a uma hora, até que o material atingisse a coloração escura desejada.

c) Lavagem: após a obtenção da coloração desejada foi retirado o tetróxido de ósmio e o

material foi lavado três vezes durante 10 minutos cada em água destilada.

d) Desidratação: executada a lavagem iniciou-se a desidratação, os fragmentos foram primeiro imersos em álcool 7,5% duas vezes durante 10 minutos/cada, em seguida em álcool 30% duas vezes de 10 minutos/cada, posteriormente em álcool 50% duas vezes de 15 minutos/cada, sucessivamente em álcool 70% três vezes de 15 minutos/cada, álcool 90% duas vezes de 15 minutos/cada e então em álcool 100% duas vezes de 10 minutos/cada.

e) Ponto Crítico, Montagem e Metalização: por último, o material será seco em aparelho de ponto crítico (Quorum K 850) utilizando gás carbônico, montado em suporte do ponto de amostra (Stub) para metalização com ouro por “sputtering” e observado em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEJA 3 LMU).

4.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise em microscopia eletrônica de transmissão será utilizada para o estudo dos fragmentos do: cório, alantóide, saco vitelino e âmnio de emas (*Rhea americana*) de 0 a 20 dias de desenvolvimento. O processamento das amostras será realizado na UFERSA. O procedimento da microscopia eletrônica de transmissão será executado baseado na metodologia descrita por Oliveira (2004), caracterizados abaixo:

a) Fixação: as amostras coletadas com cerca de 0,5mm² dos anexos fetais serão fixadas em Karnovisk, tamponado com fosfato de sódio 0,1 molar em pH 7,4 a 4°C para fixação.

b) Pós-Fixação: os fragmentos serão lavados três vezes com duração de 5 minutos cada em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,4 e então pós-fixados em solução Tetróxido de Ósmio tamponado com Fosfato de Sódio 0,1M e pH 7,4 durante duas horas. Em seguida cada um dos fragmentos serão lavados três vezes durante 10 minutos cada em água destilada.

c) Contrastação e desidratação: depois da pós-fixação as amostras serão contrastadas utilizando acetato de uranila a 1% durante duas horas, após isso serão desidratados em uma série de álcool etílico (50%, 70%, 90%, 100%) com duas trocas a cada 10 minutos/cada nos dois primeiros álcoois e três de 15 minutos/cada nos dois últimos.

d) Inclusão: finalizada a desidratação os fragmentos serão banhados por 1 hora com Óxido de Propileno e resina Spurr em temperatura ambiente na proporção 1:1, seguido por um banho de 1 hora e 30 minutos em uma proporção de 3:1 de Óxido de Propileno e resina Spurr e então imersos em resina pura por 18 horas em temperatura ambiente, após esse tempoos fragmentos foram novamente imersos em resina pura por 1 hora e postos dentro da estufa a 37°C para embebição, em seguida o material foi colocado em moldes com uma

nova resina para então a obtenção de blocos em estufa de 60°C durante 3 dias até que os blocos estivessem completamente secos.

e) Ultramicrotomia: para serem analisados em microscópio eletrônico de transmissão os fragmentos de interesse serão trimados, primeiro com a realização de cortes semifinos e posteriormente de cortes ultrafinos com auxílio de um ultramicrotomo automático (Ultracut R, Leica Microsystems, Germany). Os cortes semifinos a serem realizados serão de 0,4µm de espessura, após a execução desses, os cortes serão corados em azul de toluidina a 1% para seleção do material com destino a transformação em cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos serão de 0,07 µm de espessura, esses serão contrastados em acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo a 5% para então serem submetidos à análise em microscópio eletrônico de transmissão.

REFERÊNCIAS

ABD EL HAFEZ, M.S.; SHOSHA, EAE-M.; IBRAHIM, S. M. Isolation and molecular detection of pigeon pox virus in Assiut and New Valley governorates. **Journal of Virological Methods**, v. 293, p. 114142, 2021.

ABOLNIK, C. *et al.* Caracterização de um vírus influenza A altamente patogênico do subtipo H5N2 isolado de avestruzes na África do Sul em 2004. **Influenza and other respiratory viroses**, v.3, p.63-68, 2009.

ALMEIDA, M.H.*et al.* Greater rhea (*Rhea americana*) external morphology at different stages of embryonic and fetal development. **Animal Reproduction Science**, v.168, p.43-51, 2015.

BAGGOTT, G.K. Development of extra-embryonic membranes and fluid Compartments. **Biology Research**, v.2, p. 21-26, 2009.

BALDAVIRA, M.C. **Estudo do efeito da beta 2-glicoproteína I no desenvolvimento da rede vascular da rede vascular de membrana corioalantóica de embriões de galinha.** 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Programa de Fisiopatologia Experimental, São Paulo, 2017.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2016-3. 2016. Available at: www.iucnredlist.org.

BJÖRKMAN, N. Placentação. *In*: Dellman H, Broun EM (Ed.). **Histologia veterinária.** Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, p.279-294, 1982.

BLACKBURN, D.G. Morfologia funcional, diversidade e evolução das especializações de processamento de gema em répteis embrionários e aves. **Journal of Morphology**, 2020.

CARDOSO, M, T. *et al.* Uma fonte útil de células-tronco: o âmnio gato e cachorro. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. Supl. 2, pág. 269-274, 2014.

CARRER, C.C. O mercado de avestruz. Anuário 2000 da avicultura industrial. **Gessulli Agribusiness**, v.90, p.68-74, 2000.

CARVALHO, M.F.S. **Estudo de Morfologia Macroscópica, Microscópica Testicular e Epididimária em Emas (*Rhea americana* Linnaeus – 1758) (RHEIDAE)**. Tese - (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal De Goiás, Goiás, 2009.

CERVI, R. C. *et al.* Características físicas, químicas e microbiológicas de ovos de ratitas. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.03, p. 107-116, 2016.

CERVI, R.C. **Caracterização do ovo de ema (*Rhea americana*), qualidade físico-química, microbiológica e proteômica**. Tese (Dotourado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2018.

CESARIO, M. D. Desenvolvimento embrionário pré e pós postura - períodos críticos. *In:* MACARI, M. *et al.* Manejo de incubação.3.ed., Campinas: **FACTA**, v.465, p.47-63, 2013.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de boas praticas para eutanásia em animais**. Brasília: CFMV, 2013.

CONRADO, C. A *et al.* Eletroforese das proteínas plasmáticas em emas (*Rheaamericana*) de diferentes faixas etárias. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1033-1038, 2007.

DEEMING, C. D. Avian Incubation: Behaviour, Environment, and Evolution. **The Auk**, v. 119, p. 1210-1211, 2002.

DERTKIGIL, J. S. M. *et al.* Líquido amniótico, atividade física e imersão em água na gestação. **Revista BrasileiraSaude Materno Infantil**, v. 5, p.403-410, 2005.

EKANAYAKE, Sunetra. **Potenciais diferenciadores de células ectomesenquimais mandibulares derivadas da crista neural do frango (*Gallus domesticus*), com referência especialà cartilagem e ao osso**. 1990.

ELS, H. J.; JOSLING, D. Viruses and virus-like particles identified in ostrich gut contents.

Journal da South African Veterinary Association, v.69, n. 3, 1998.

EVERAET, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. Manejo da Incubação. **FACTA**, p. 31-45, 2013.

FAIRCHILD, D. B. *et al.* Influence of Water Provision to Chicks Before Placement and Effects on Performance and Incidence of Unabsorbed Yolk Sacs. **Poultry Science Association**, v. 15, p.538-543, 2006.

FAVARON, P. O. *et al.* The amniotic membrane: development and potential applications—a review.

Reproduction in domestic animals, v. 50, n. 6, p. 881-892, 2015.

FOWLER, M.E. Comparative clinical anatomy of ratites. **Jornal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, p. 204-227, 1991.

FRENEAU, G. E. *et al.* Aspects of spermatogenesis and microscopic testicular morphology in Greater Rhea, *Rhea americana* (Linnaeus, 1758). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.10, 2016.

FRENEAU, B. N. *et al.* Morphological aspects of epididymal microscopy and rete testis in greater Rhea Americana. **Ciência Rural**, v. 51, 2021.

GADELHA, B. B. I. A. *et al.* Os anexos embrionários das aves: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e54310212498, 2021.

GARCIA, L. M. S.; FERNÁNDEZ, G. C. **Embriologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

GILL, D.V.; ROBERTSON, A.H.; BETZ, W.T. Síntese de estrogênio in vivo pelo embrião de galinha em desenvolvimento (*Gallus gallus*). **Endocrinologia geral e comparativa**, v. 49, n. 2, p. 176-186, 1983.

GODBERT, R,S.; GUYOT, N. Vitellogenesis and Yolk Proteins, Birds. **National Institute of Agronomic Research**, v. 6, p. 278–284, 2018.

GODINHO, P.H.; GODINHO, L. M. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Minas Gerais: Editora PucMinas, 2003.

GOES, A.A.P. **Características reprodutivas de emas machos, criadas em cativeiro no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo, 2004.

GONÇALVES, F.M. *et al.* Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Arch. Zootec**, v.62, p. 45-55. 2013.

GRIS, O.; WOLLEY, D.C.H.; GUELL, J. L. Histologic findings after amniotic membrane in the human cornea. **Ophthalmology**, v. 109, p. 508-12, 2002.

GUEDES, P. T. *et al.* Histological analyses demonstrate the temporary contribution of yolk sac, liver, and bone marrow to hematopoiesis during chicken development. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90975, 2014.

GUIDA, F.J.V. **Descrição dos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário de aves das ordens Anseriformes, Galliformes e Psittaciformes e sua aplicação no embriodiagnóstico de espécies selvagens**. Dissertação (Mestrado em Conservação da Fauna) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2018.

HINCKE, T. M. *et al.* Dynamics of Structural Barriers and Innate Immune Components during Incubation of the Avian Egg: Critical Interplay between Autonomous Embryonic Development and Maternal Anticipation. **Journal of Innate Immunity**, v.11, p. 111-124, 2019.

KASIELKE, Susie. Incubação. **Pássaros criados à mão**, p. 53-73, 2020.

LANGE-CONSIGLIO, A. *et al.* Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 6, n. 8, p. 622-635, 2012.

Lima, N.C.B. **Utilização do ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM) para**

análise do efeito irritante de complexos de rutênio. Trabalho de conclusão de curso Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MACHADO, M.M.T. *et al.* Animais Silvestres e Zootecnia. **Ação Ambiental**, p.29-31, 2007.

MARTINS, N. R. S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 2, p. 97-140, 2001.

MENEGHEL, M. Clase Reptilia. **Sección Zoología de Vertebrados: curso de Biología Animal. [S. l.]**, 2008.

MONTEIRO, A. P. **Histologia e embriologia comparada.** Londrina: Editora e Distribuidora Educacional, 2017.

MORAIS, T.P.R.M. *et al.* Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistemareprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, p.165-176, 2012.

MOSSMAN, H.W. Vertebrate Fetal Membranes: comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities. **MacMillan Press**, p. 319-370, 1987.

NARBAITZ, R. *et al.* Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H⁺- ATPase in two specialized cell types in the chick embryo chorioallantoicmembrane. **Journal of anatomy**, v. 186, p. 245–252,1995.

ASSIS NETO, A. C.A. *et al.* Evolução morfométrica dos anexos embrionários e fetais bovinos obtidos por monta natural, com 10 a 70 dias da gestação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.10, 2009.

OLIVEIRA, F. M. **Placentação em mocós, Kerodonrupestris Wied, 1820.** Tese (Doutorado em ciências) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.

OLIVEIRA, A.G.L. *et al.* Ensaios da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS):

alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, v. 71, n. 1, p. 153-159, 2012.

OLIVEIRA, M.E.R. et al. Morfologia da bolsa cloacal de emas, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.8, 2018.

OUYANG, J.Q. QUETTING, M.; HAU, M. Corticosterone and brood abandonment in a passerine bird. **Animal Behavior**, v.84, p.261–268, 2012.

PARIZZI, C.R. et al. Morfologia do ovário da ema (*Rhea americana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n. 3, 2007.

PEREIRA, S. P. **Sistemas de Produção de Emas (*Rhea americana*) nos Criatórios Comerciais da Região Sul do Brasil**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

PIECHOTTA, R. et al. Impact of exogenous amino acids on endogenous amino compounds in the fluid compartments of the chicken embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.120, p. 325-337, 1998.

RIVEROS, G.C.A. et al. Relação Biológica Entre o Saco Vitelino e o Embrião. **Enciclopédia Biosfera**, v.6, p.1-8, 2010.

RUFINO, J. P. et al. **Bioteχνologias aplicadas à reprodução de aves**. Manaus: EDUA, 2018.

SANTOS, C. T. et al. Morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca da ema (*Rhea americana americana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.430-440, 2011.

SANTOS, E. **Da ema ao beija-flor**. 5. ed. Belo Horizonte: Editora Villa Rica, 1990.

SHBAILAT, S.J.; ABUASSAF, R.A. Transfer of egg white proteins and activation of proteases during the development of *Anas platyrhynchos domestica* embryo. **Acta Biologica Hungarica**, v. 69, p.72-85, 2018.

SILVA, D. M. et al. Investigating proteins and proteases composing amniotic and allantoic

fluids during chicken embryonic development. **Physiology and Reproduction**, v. 96, p.2931-2941, 2017.

SILVA, J.B. Rheacultura : Criação de emas: nutrição, reprodução, manejo e enfermidades. **Agropecuária**, p.144, 2001.

STARCK, J. Matthias. Morfologia do saco vitelino aviário. **Journal of Morphology**, 2020.

SUGIMOTO, Y. *et al.* Ovalbumin in Developing Chicken Eggs Migrates from Egg White to Embryonic Organs while Changing Its Conformation and Thermal Stability. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p. 11030–11037, 1999.

THIERRY, M.A; COUDER, R.Y; RACLOT, T. Elevated corticosterone levels decrease reproductive output of chick-rearing Adélie penguins but do not affect chick mass at fledging. **Conservation Physiology**, v.1, 2013.

TURNER, G, C. *et al.* Validação regulatória pré-clínica de um tendão diafragmático projetado feito com células-tronco mesenquimais amnióticas. **Jornal de cirurgia pediátrica**, v. 46, n. 1, p. 57-61, 2011.

VANDERLEY, S.B.S.C.; SANTANA, H.C.I. **Histologia e Embriologia Animal Comparada**. 2. ed. Fortaleza: Editora UECE, 2015.

WOODRUFF, A.M.; E.W. GOODPASTURE, E.W: The Susceptibility of the Chorioallantoic Membrane of Chick Embryos to Infection with Fowl-pox Virus. **The American Journal of Pathology**, v.7, p. 209-222, 1931.

YADGARY, L.; YAIR, R.; UNI, Z. The chick embryo yolk sac membrane express nutrient transporter and digestive enzyme genes. **Poultry science**, v.90, p.410-416, 2011.

YOSHIZAKI, N. *et al.* Absorption, transportation and digestion of egg white in quail embryos. **Development, Growth & Differentiation**, v. 44, p.11-22, 2002.

YUAN, Y. J. *et al.* Application of the chick embryo chorioallantoic membrane in neurosurgery

disease. **International journal of medical sciences**,v. 11, n. 12, 2014.

APÊNDICE A – ARTIGO 1

Fetal attachment morphology in greater rheas (*Rhea americana americana* Linnaeus, 1758)

Running title: Fetal attachment morphology in greater rheas

¹²³Ana Indira Bezerra Barros Gadelha, ¹Moacir Franco de Oliveira, ²Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa, ¹²⁴João Augusto Rodrigues Alves Diniz, ¹²⁴Igor Renno Guimarães Lopes, ⁵Bruno Caio Chaves Fernandes, ¹Alexsandra Fernandes Pereira, ¹Carlos Eduardo Bezerra de Moura.

¹Postgraduate Program in Animal Science, Federal Rural University of the Semi-Arid, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

²Department of Animal Sciences, Federal Rural University of Semi-Árido, Mossoró, 20 Rio Grande do Norte, Brazil.

³Masters Program in Development and Environment, Federal University of Rio Grande 24 do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

⁴Doctoral Program in Development and Environment, Federal University of Rio Grande 24 do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

⁵Department of phytotechny, Federal Rural University of Semi-Árido, Mossoró, 20 Rio Grande do Norte, Brazil.

Corresponding author: Ana Indira Bezerra Barros Gadelha; Address: Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Postal Address: Avenida Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, postal code 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. Phone: +55 (84) 991032526. Email address: anaindirabezerra@hotmail.com.

Abstract

The greater rhea is a wild ratite with scientific importance and great potential and zootechnical value, especially considering the current state of development of the Brazilian poultry sector, where research aimed at increasing the productivity of Brazilian agriculture is relevant. Studies on fetal attachments and embryonic development are important, as they can provide essential information concerning reproductive and nutritional animal management. The present study was developed considering the lack of information on the morphology of fetal attachments in rheas and aiming to establish a standard model for fetal attachments in this species. Rhea eggs were incubated from zero to 36 days and macroscopic and microscopic characterizations of their embryonic attachments were performed. At the end of the experiment, the findings indicate that the development pattern observed in rheas is similar

to other birds. Histologically, all embryonic annexes exhibit germ layers, namely the ectoderm, mesoderm and endoderm.

Keywords: Fetal attachments; macroscopy; microscopy; ratites.

Introduction

The rhea (*Rhea americana americana*) is a ratite belonging to the Rheidae family and Rhea genus (Sousa et al., 2018). It is distributed throughout different Brazilian regions and displays scientific importance (Costa et al., 2018) and zootechnical value (Torquato et al. 2015). Considering the marked development of the Brazilian poultry sector in recent years, research aimed at understanding the reproductive and productive period of these birds is paramount, favoring better management conditions to avoid losses during the embryonic development process (Groff et al., 2017).

According to Thierry et al. (2013), animal embryonic development assessments promote access to essential information, allowing for the identification of potential possible food management problems and behavioral changes during the egg incubation period, but also aiding in identifying issues associated with environmental condition and hormonal changes or arising from stress, as highlighted by Ouyang et al. (2012).

Fetal attachments represent structures that promote embryonic development, as they provide nutrition, excretion and gas exchange conditions as well as protection support for the developing embryo (Mess et al. 2003). Because of this and easy availability, fetal attachments in birds have been employed as pharmaceutical models (Vargas et al. 2007), utilized in embryology, morphology, biochemistry and physiology studies (Narbaitz et al. 1995) and, furthermore, in neoplasm, angiogenesis (Ribatti et al. 2012) and embryotoxicity (Winter et al. 2013) assessments.

Thus, we aimed herein to describe fetal rhea attachment morphology in an attempt to establish a standard model for the fetal attachments of this species, producing subsidies for anatomo-histopathological and embryo-diagnostic diagnoses of clinical interest.

Materials and methods

Sampling location

Extra-embryonic membrane rhea data were obtained at the Center for the Multiplication of Wild Animals (CEMAS) belonging to the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), located at 16 m asl from the city of Mossoró, RN, in the semiarid region of the Brazilian Northeast (IBAMA No. 14.78912).

Bioethics

Prior to the experiments, the study proposal was submitted and accepted by the Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), license n° 75369-1 and the UFERSA Committee on Ethics and Welfare in the Use of Animals (CEUA), no 32/ 2020), for the purpose of validating the employed methodology and anesthetic and euthanasia procedures.

Anesthetic procedure

To describe the development of extraembryonic membranes, eggs were incubated through an artificial incubation process, maintained at 36.5 °C (± 0.5) and relative humidity ranging between 52 and 56% in a hatchery (Premium Ecológica LTDA), arranged horizontally. Eggs aged from zero to 36 days of incubation were used. They were opened by the positioning pole of the air chamber by means of a microgrinder (DREMEL 3000), followed by insertion of a cotton swab soaked with an overdose of isoflurane (Isoforine®, Cristália Produtos Químicos Farmacêutico LTDA). Subsequently, the eggs were wrapped and covered with PVC film (Wyda®, Alukenti Embalagens LTDA) containing the anesthetic to ensure analgesia and death within 10 minutes. Embryos with less than 10 days of incubation were euthanized by hypothermia, maintained below 4° C for up to one hour (Federal Council of Veterinary Medicine, CFMV, 2013).

Sampling

Fragments of the chorion, allantois, yolk sac and amnion were collected from three eggs of each incubation range (0 to 24 days), with an interval of 3 days between collections (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 days of incubation) and one egg from 27 to 36 days of incubation (27, 30, 33, 36), totaling 28 eggs whose embryonic attachments were described macro and microscopically.

The eggs were collected early in the morning, sanitized and maintained in an incubator (Modelo - Luna 240/Chocmaster, Premium Ecológica LTDA) at an average temperature of $\pm 36.5^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of 52 to 56%, considering the 24-hour interval as the first day of the incubation process.

Macro and microscopic characterization of fetal attachments

Prior to the microscopic analysis, fragments were collected for macroscopic characterizations of extraembryonic structures. To this end, three intervals of three days were considered, analyzing all surfaces (ventral, medial, lateral and dorsal) with a magnifying glass (ESTEK), and photographing, schematizing and naming the structures according to the Handbook of Aviantomy: Nomina Anatomic Avium (1993). All data were compared to the literature referring to birds, both domestic and wild. It is noteworthy that, for this complex process, the opened egg were immersed in water to allow for structure movement without damage.

Light Microscopy

Fragments were fixed in PBS-buffered 4% paraformaldehyde for 72 hours. Subsequently, the materials were dehydrated in a series of increasing alcohols (70%, 90%, 95%, 90%, 95%, 100% and 100%) for 30 minutes at each concentration and later cleared and stained employing two Xylol baths for 30 minutes each. The fragments were then paraffinized with histological paraffin (Bandeirante Química Ltda) (two baths, one for six hours and the other for one hour) and then embedded in paraffin. Finally, 5 μ -thick sections were obtained, adhered to glass slides and left in an oven at 60°C for 4 hours, for subsequent staining in hematoxylin and eosin (HE) according to Tolosa et al. (2003). The slides were analyzed under a Leica ICC50 HD light microscope and images were obtained using the LAS EZ Ink program.

Scanning electron microscopy (SEM)

Fragments of the yolk sac, chorion, allantois and amnion of eggs at 12, 18, 24 of incubation and 39 days (shell+chorioallantois) after animal birth were used for this assessment. The fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered with 0.1 M PBS and pH 7.4. After fixing, the fragments were washed with PBS buffer, post-fixed with 1% osmium tetroxide buffered with 0.1M PBS and pH 7.4 from 30 minutes to one hour and washed with distilled water (three baths of 10 minutes each). They were then dehydrated in an increasing alcohol series (50%, 70%, 90% and 100%), twice for 15 minutes at each concentration. Finally, drying was performed employing a critical point device using carbon dioxide (QUORUM® K850, England) followed by mounting on supports (Stub) and metallization by gold sputtering for scanning electron microscope assessments on a LEO VP 435- Carl-Zeiss equipment (Oberkochen, Germany).

Transmission electron microscopy (TEM)

For the ultrastructural analysis, fragments measuring about 0.5mm² were collected from the yolk sac, chorion, allantois and amnion, at 18 days of incubation and fixed in 2.5% glutaraldehyde buffered with 0.1 M PBS and pH 7.4. After fixing for 72 h, the samples were washed three times in PBS buffer for 10 minutes and post-fixed in PBS-buffered osmium tetroxide for 2 h. They were then washed three times with 0.1 M PBS buffer solution at pH 7.4 for 10 minutes followed by distilled water for 15 minutes and dehydration by immersion in an increasing series of ethyl alcohol (50%, 70%, 80%, 90%, 100%, with three changes every 15 minutes). Subsequently, they were bathed with propylene oxide for 10 minutes, immersed in a mixture of propylene oxide and Spurr resin in a 1:1 ratio for one hour and 1:3 for an hour and a half and then immersed in pure Spurr resin for 12 hours and included in pure resin to obtain sample blocks, maintained in an oven at 60 °C for 72 h. Later, 0.4 µm-thick semi-thin sections were obtained for material selection and 0.0 µm ultra-thin sections were stained with 2% uranyl acetate and 0.5% lead citrate for analysis under a Morgagni268D transmission electron microscope (FEI Company, Netherlands; Mega View III Camera, Solf Imaging, Germany).

Results

Macroscopic aspects

The embryonic rhea development ages investigated herein indicate a marked interaction dynamism between the four extraembryonic membranes, including in relation to the shell membrane with the incubation process progression. The first fetal attachment, the yolk sac, was formed at three days of incubation (Figure 1A). This small circular structure displays peripheral vascular formations originating from the embryo, represented by a vein and an artery that follow until the periphery of the allo and branch out to form a vascular area covering the embryo. At this age, the amnion, a thin translucent structure in the form of an avascular pouch surrounding the embryo, was also observed.

At six days of incubation (Figure 1B), the yolk sac exhibits an increase in vascularization and four large branches emerge from the embryo. The amnion displays greater vascularization expansion and evidence, apparently originating from its interaction with the allantois. The latter forms a vascular disc, arranged at the upper pole of the bud.

At 9 days of incubation (Figure 1C), extraembryonic membrane vascularization originates from an evagination that projects from the urachus, represented by the allantoid diverticulum, which during its development gives rise to two large vessels, which gradually ramify and vascularize the amnion and yolk sac. The amnion at this age is highly vascularized, with a noticeable presence of fluid forming a pouch in which the embryo is immersed. At this age, the presence of the chorion is noticeable, comprising a thin and translucent layer already in contact with the allantois, although this visualization was only possible after structure manipulation during the analyses.

On the 12th day of incubation (Figure 1D), the amnion expands but the amniotic fluid volume is apparently lower, as the membrane maintains a direct relationship with the developing embryo compared to the previous phases. The allantois, therefore, is significantly expanded and its vessels display higher caliber and become intensely branched, easily differentiating between arteries and veins. At this age, an interaction between the allantois and the chorion is also evident, forming the chorioallantoic membrane. Large contact areas between all fetal membranes are observed, with the allantois playing the most significant role given the large number of vessels, even when compared to the yolk sac, which is simply a yolk storage structure. On the 15th day of incubation (Figure 1E), the umbilical allantoic vessels are larger and display increasing ramification, easily differentiating them from other membranes.

At 18 days of development (Figure 1F), a significant increase in the size of the embryo and an increase in the amount of amniotic fluid can be seen. Dorsally to the embryo, there is a vascular connection between the amnion, the allantois and the yolk sac, age when there is a greater supply of amniotic vessels to ensure the effective exchange of substances for the embryo. The allantoic vascular network becomes more branched and developed, vascularizing the yolk sac and also involving the albumen as a way of increasing exchange areas. The vitelline vessels surround the entire yolk mass begin emitting a network of vessels in a circular fashion. The allantoid vessels are arranged under the yolk mass by juxtaposition. At this age, the allantois appears to display its maximum development, as in its upper portion it also connects directly to the amnion.

At 21 days of incubation (Figure 2G), the yolk sac is richly vascularized, almost completely superimposed by the allantois and its wrinkled appearance indicates that the yolk is being absorbed. At this age, the chorioallantoic membrane is in close contact with the shell membrane, suggesting gas and mineral element transport from the shell.

At 24 days (Figure 2H), the allantoic and vitelline vessels are quite turgid and their network organization suggests that they function as traction structures for the yolk mass to the interior of the coelomic cavity when they retract along the incubation process. At this age, four vessels are evident from the urachus, two arteries and two veins, one larger, which move laterally when touching the yolk mass, branching out over it and emitting small caliber vessels under a very thin membrane containing the yolk.

On the 27th day of incubation (Figure 2I), the chorionic membrane, previously transparent, becomes easily observed, becoming relatively white as a result of complete interrelation with the allantois. At this age, a high concentration of uric acid deposit is noted when compared to previous phases. The yolk sac becomes more reduced due to the embryo absorption process.

On the 30th day of incubation (Figure 2J) the vitelline arteries and veins move to the left of the fetus, becoming even larger, moving together until they become inserted into the yolk mass, then becoming small caliber vessels arranged in a circular shape. The chorioallantoic membrane reaches its maximum shell membrane adhesion degree at this stage.

Finally, on the 33rd day of incubation (Figure 2K), a high adhesion to the allantoic vessels is noted under the vitelline membrane, in close association with the chorioallantoic membrane. The arteries and veins become slightly contorted. Finally, at 36 days of incubation (Figure 2L), the embryo has already perforated the membrane complex represented by the chorioallantoic membrane and the shell membrane at the air chamber region. After removing these structures, the yolk sac was identified as already completely absorbed, resulting in embryo survival. It is noteworthy that rheas may hatch between 36 and 42 days of incubation, depending on the hatchery or ambient temperature.

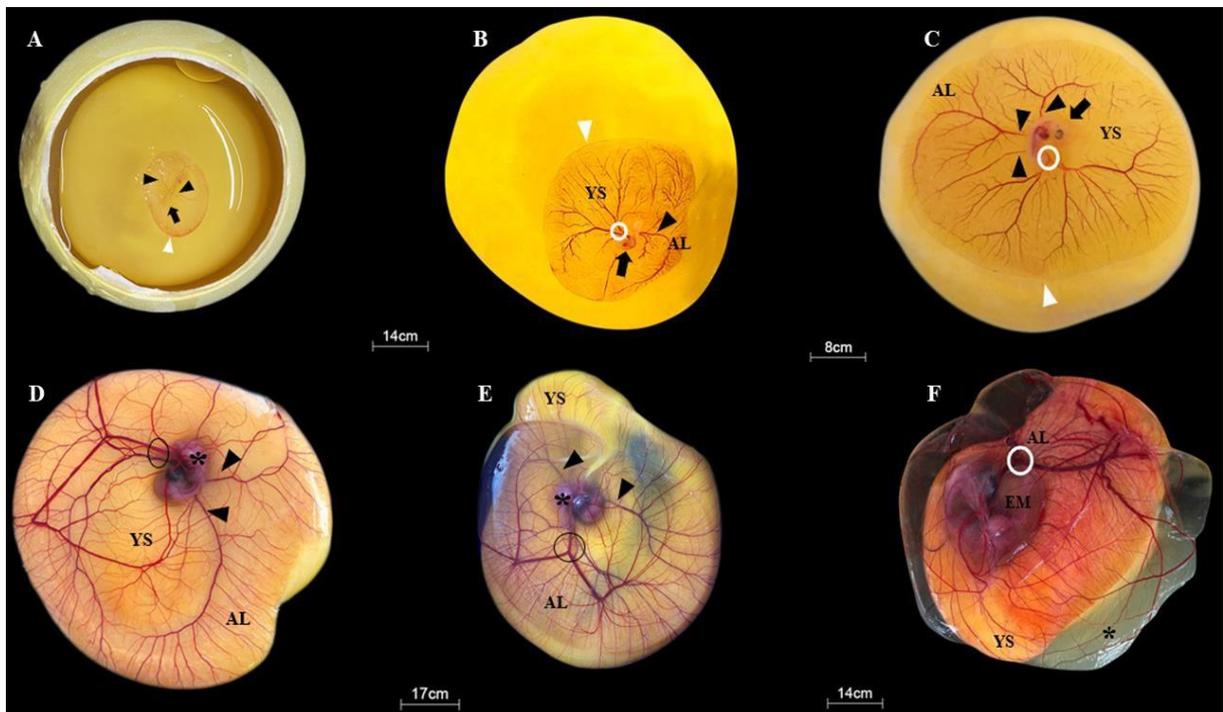


Figure 1. Greater rhea embryonic attachments. A: three days of incubation. B: six days of incubation. C: nine days of incubation. D: 12th day of incubation. E: 15th day of incubation. F: 18th day of incubation. Photo A: black arrowhead: vitelline right omphalomesenteric and left omphalomesenteric arteries, black arrow: amnion, white arrowhead: sinus terminalis. Photo B: black arrowhead: left omphalomesenteric artery, circle: right omphalomesenteric artery, black arrow: amnion, YS: yolk sac area, AL: allantoic area, white arrowhead: sinus terminalis. Photo C: black arrowhead: omphalo-mesenteric arteries, circle: urachus, AL: allantoic area, YS: yolk sac area, white arrowhead: sinus terminalis. Photo D: black arrowhead: omphalomesenteric arteries, circle: urachus, YS: yolk sac area, AL: allantoic area, * black: embryo. Photo E: black arrowhead: omphalo-mesenteric arteries, circle: urachus, YS: yolk sac area, AL: allantoic area, * black: embryo. Photo F: Circle: urachus, EM: embryo, AL: allantoic area, YS: yolk sac area, * black: albumen. Bars: 14cm, 5cm, 9cm, 17cm, 14cm, 15cm.

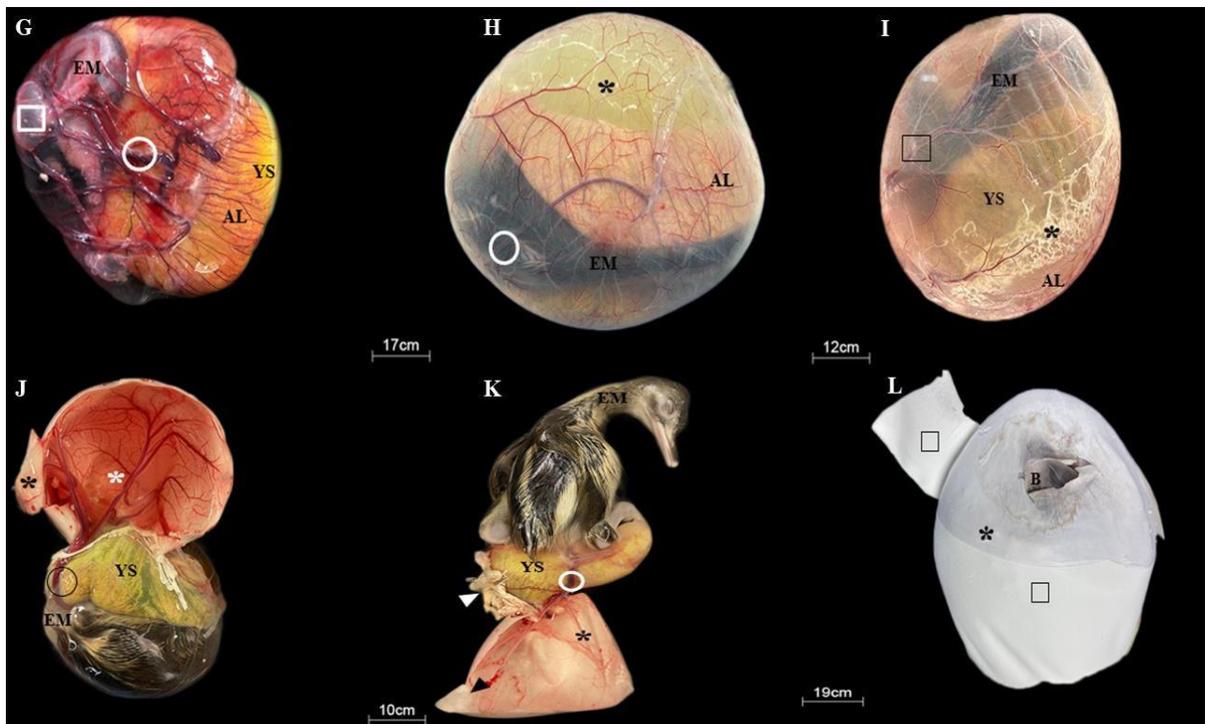


Figure 2. Greater rhea fetal attachments. G: 21st day of incubation. H: 24th day of incubation. I: 27th day of incubation. J: 30th day of incubation. K: 33rd day of incubation. L: 36th day of incubation. Photo G: white circle: urachus, white square: bubble to indicate that there is another layer under the other attachments: the chorion, AL: allantoic area, YS: yolk sac area, EM: embryo. Photo H: white circle: vessels coming from the urachus, AL: allantoic area, * black: yolk from yolk sac to be absorbed, EM: embryo. Photo I: black square: illustrating that there is a membrane covering the other appendages, the corium, AL: allantoic area, * black: uric acid, YS: yolk sac area, EM: embryo. Photo J: EM: embryo, black circle: urachus, YS: yolk sac area, * white: area of contact between chorion+allantois and shell membrane, * black: shell membrane. Photo K: EM: embryo, circle: urachus, YS: yolk sac, white arrowhead: uric acid, black arrowhead: shell membrane, * black: area of contact between the chorion, allantois and shell membrane. L: * black: chorion, * black square: shell membrane, B: greater rhea beak. Bars: 17cm, 12cm, 10cm, 10cm, 19cm, 10cm.

Fetal attachment microscopy analyses

Yolk Sac

The rough endoplasmic reticulum in the yolk sac is well developed (Figure 3E) and the cytoplasm contained numerous lipid droplets of varying size with a vesicular aspect very similar to that of cytoplasmic organelles (Figure 3F). The presence of myelin figures is also observed (Figure 3D) in which the nucleus occupies almost the entire cytoplasmic volume.

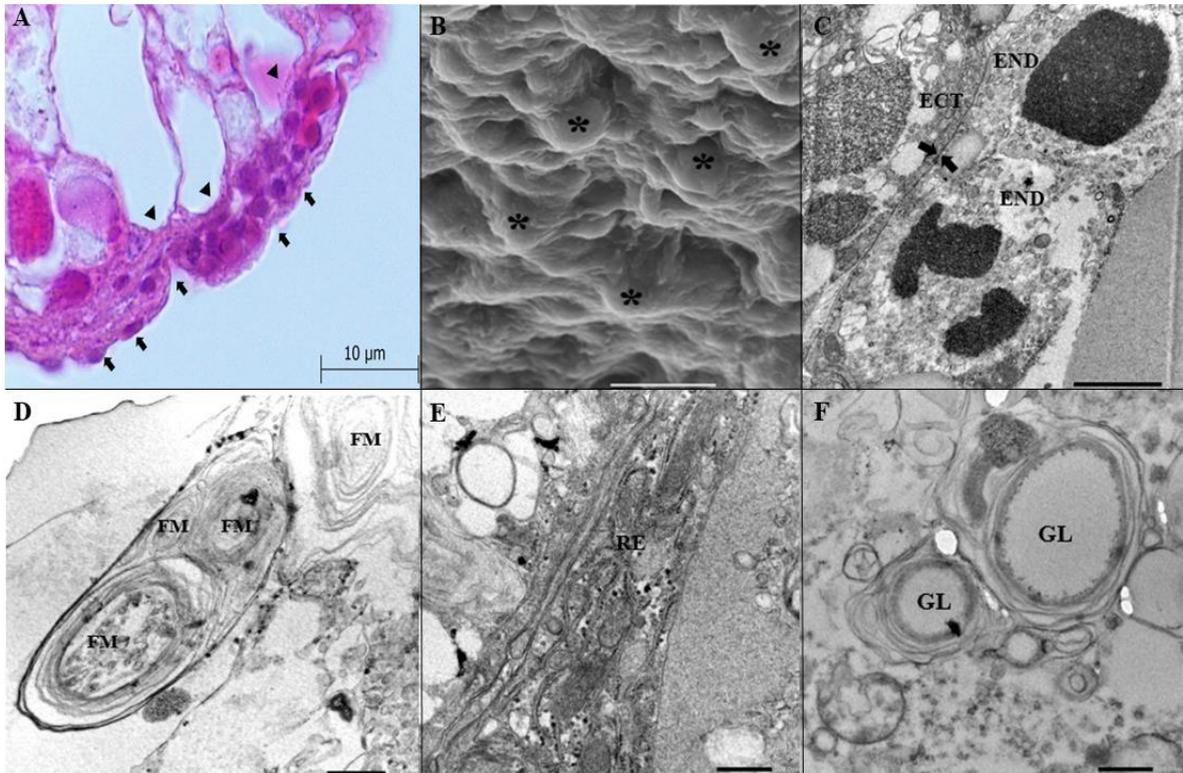


Figure 3. Greater rhea yolk sac. A: yolk sac under light microscopy at 12 days of incubation, B: yolk sac under scanning electron microscopy at 12 days of incubation, letter C, D, E and F: yolk sac under transmission electron microscopy at 18 days of incubation. A: black arrow: ectoderm, black arrowhead: endoderm. B: * endodermal cells. C: arrows (cell boundaries), ECT: ectodermal cell, END: endodermal cells. D: FM (myelin figure). E: ER (endoplasmic reticulum rough). F: GL (lipid droplets). Bar: 10 μ m, 20 μ m, 2 μ m and 500 nm.

Amnion

Histologically, the amnion is represented by the three embryonic layers (ectoderm, mesoderm and endoderm). The ectoderm is made up of a stratified epithelium composed of cubic cells, while the endoderm is made up of a squamous epithelium comprising a double layer of cubic cells and the mesoderm, of loose connective tissue. Blood vessels are also observed in the latter (Photo 4A). The SEM analysis indicated cells polygonal shape epidermal cells interspersed with numerous blood vessels (Figures 4B and 4C). The TEM analysis of the amnion of rheas at 18 days of embryonic development indicated fibroblast cells with elongated nuclei and the presence of microfilaments in the mesoderm (Figure 4E). The cytoplasmic membrane exhibits projections suggesting the occurrence of transport activities given the presence of lipid vesicles and small electron-dense vesicles observed at the edge of the endoderm (Figure 4F).

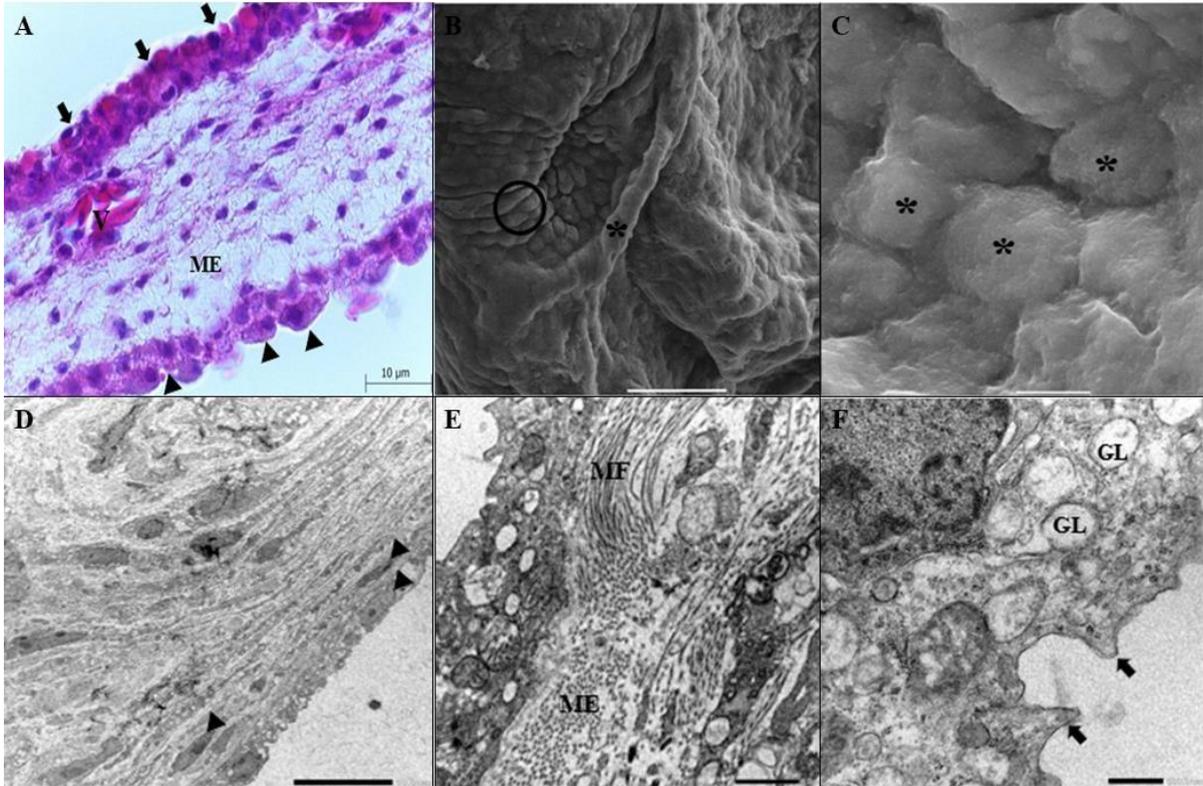


Figure 4. Greater rhea amnion. A: light microscopy amnion at 24 days of incubation, black arrow: ectoderm, black arrowhead: endoderm, V: blood vessels, ME: mesoderm. B: scanning electron microscopy at 24 days of incubation, * blood vessel, circle (villi). C: scanning electron microscopy at 18 days of incubation, * (epidermal cells). D: transmission electron microscopy at 18 days of incubation, arrowhead: fibroblast cells. E: transmission electron microscopy at 18 days of incubation, MF: microfilaments, ME: mesoderm. F: transmission electron microscopy at 18 days of incubation, GL: lipid droplets, arrows: microvilli. Bar: 10µm, 50µm, 5µm, 10µm, 1µm, 500nm.

Allantoid

The allantoids of rheas at all analyzed ages, like the amnion, is represented by three germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm). The ectoderm is formed by multiple layers of cubic cells, the mesoderm, of loose connective tissue interposed with blood vessels, and the endoderm, of simple squamous cells containing intercellular spaces at all ages (Figure 5A). The SEM assessments indicated venules and arteries in the allantoids at 12 days of incubation, in addition to a plexus of capillaries with different vascular densities between the intervessel orifices (Figure 5B). At 24 days of incubation, the endodermal cells EXHIBIT a pyramidal shape (Figure 5C). The TEM investigation indicated fibroblasts (Figure 5E), many granules suggestive of the presence of glycogen granules (Figure 5D and 5E), many blood capillaries, some pericytes between the capillaries (Figure 5D) and mesenchyme (Figure 5E) in the allantoids of rheas at 18 days of incubation. Rough endoplasmic reticulum was also abundant (Figure 5F).

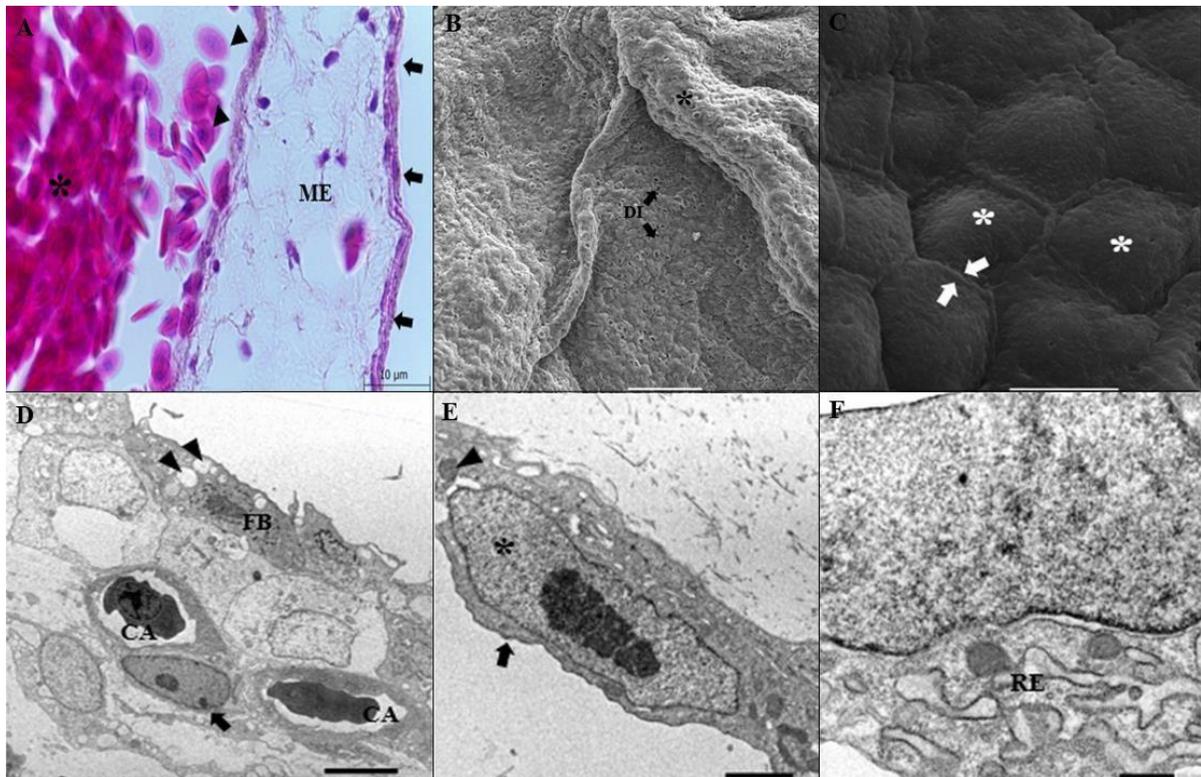


Figure 5. Greater rhea allantois. A: light microscopy at 24 days of incubation, black arrow: ectoderm, black arrowhead: endoderm, *: blood vessels, ME: mesoderm. B: scanning electron microscopy at 18 days of incubation, DI: intervessel distances, * black (artery). C: scanning electron microscopy at 18 days of incubation, * white (endodermal epithelial cells), white arrows: cell boundaries. D: transmission electron microscopy at 18 days of incubation, FB: fibroblast, black arrowhead: glycogen granules, CA: blood capillary, arrow: pericyte. E: transmission electron microscopy at 18 days of incubation, black arrow: microvilli, * black: fibroblast, black arrowhead: glycogen granules. F: transmission electron microscopy at 18 days of incubation, RE: rough endoplasmic reticulum. Bar: 10µm, 100µm, 10µm, 5µm, 2µm, 500nm.

Chorioallantois + chorion + shell membrane

At 39 days of incubation, the chorioallantoic membrane is completely adhered to the shell membrane, making it appear vascularized. The light microscopy assessment indicated that the chorioallantoic membrane is made up exclusively of collagen fibers. The ectoderm, mesoderm and endoderm are distinguishable in the chorion, with the ectoderm and endoderm formed by a stratified cubic epithelium and the mesoderm represented by loose connective tissue. The presence of blood vessels is noted in the chorionic membrane (Figure 6A). The allantoic portion of the membrane is made up of a stratified squamous type epithelium and a layer of loose conjunctiva nature still connects the two membranes. Many blood vessels are noted. The SEM investigation demonstrated collagen fibers and calcium deposits in the shell membrane (Figure 6B). At 27 days of incubation, the chorioallantoic membrane contains

blood vessels and the shell membrane, parallel fibers (Figure 6C). The fragments of the chorioallantoic membrane together with the shell membrane at 39 days of incubation contain numerous oval cells in the subepithelial layer of the chorion, whereas numerous elongated epithelial cells were observed in the subepithelial layer of the allantois. Blood vessels and fibroblast-like cells make up the connective tissue of the mesoderm (Figure 6D). The TEM indicated that, separately, the chorion contains blood capillaries, blood vessels, pericytes, basal cells (Figure 6E) and epithelial trabeculae (Figure 6F).

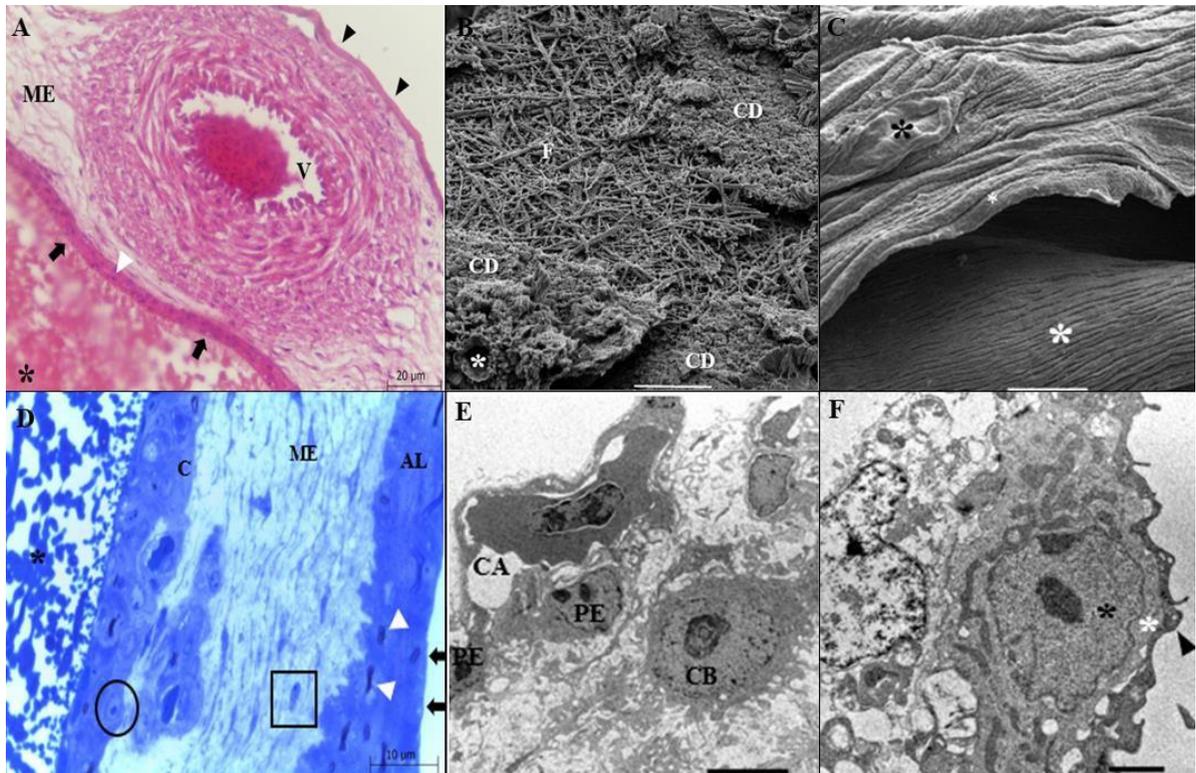


Figure 6. Greater rhea chorioallantois + chorion + shell membrane at different ages. A: chorioallantois + shell membrane of rheas at 39 days of incubation, * black: fibers from the shell membrane, V: (blood vessels), ME: mesoderm, black arrow: ectoderm, white arrowhead: ectodermal cells, black arrowhead: endoderm. B: chorioallantois + shell membrane at 39 days of incubation, containing collagen fibers (F), pores (*) and calcium deposits (DC). C: chorioallantois+shell membrane at 28 days of incubation: *black: blood vessels, *white: membrane of the shell with collagen fibers. D: Transmission electron microscopy, semi-thin sections of the chorioallantoic membrane shell membrane at 39 days of incubation, * black (shell membrane), C: chorionic area, black circle: chorionic epithelial cells, ME: mesenchyme,mesoderm, black square: fibroblasts, white arrowhead: subepithelial layer of the allantois, AL:allantoic area, white arrowhead: allantoic epithelial, black arrow: allantoic ectoderm. E: transmission electron microscopy of the chorion at 18 days of incubation, CA: blood capillary, PE: pericytes, CB: basal cell. F: transmission electron microscopy of the chorion at 18 days of incubation, epithelial trabecula, *black: covering cell, * white: basement membrane, black arrowhead: endothelial lining. Bar: 20µm, 200µm, 50µm, 10µm, 5µm and 2µm.

Acknowledgements

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Financial Code 001) for the masters degree scholarship granted to the Postgraduate Program in Animal Science (PPGCA-UFERSA).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest

References

Baggott GK. 2009. Development of extra-embryonic membranes and fluid compartments. *Avian Biology Research*, 2: 21-26.

Bellairs R. 1963. Differentiation of the yolk sac of the chick studied by electron microscopy. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 11: 201-225.

Blackburn DG, Lestz LL, Barnes MS, Appiah FA, Bonneau LJ. 2019. Ultrastructural analysis of the yolk processing pattern in embryonic pond slider turtles (*Trachemys scripta*: Emydidae). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 332(6): 187-197.

Blackburn DG. 2020. Morfologia funcional, diversidade e evolução das especializações de processamento de gema em répteis embrionários e aves. *Journal of Morphology*.

Carter MA. 2012. Evolution of Placental Function in Mammals: The Molecular Basis of Gas and Nutrient Transfer, Hormone Secretion, and Immune Responses. *Physiol Rev*, 92: 1543– 1576.

Costa HS, Araújo JHN, Bezerra FVF, Rebouças CEV, Menezes DJA, Moura CEB, Oliveira MF. 2018. Macroscopic Anatomy and Brain Vascularization in the Greater Rhea (*Rhea americana americana*). *Acta Scientiae Veterinariae*, 46: 8.

Oliveira, M. F. D. 2004. Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied, 1820. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.

Davidson FI. 1997. *Um estudo descritivo e experimental da formação de dobra amniótica no embrião de frango*. Tese de Doutorado.

Djonov V, Schmid M, Tschanz AS, Burri PH. 2000. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circulation research*, 86 (3): 286-292.

Ferner K, Mess A. 2011. Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. *Fisiologia Respiratória e Neurobiologia*, 178: 39-50.

Gadelha AIBB, Sousa ACFC, Diniz JARA, Moura CEB, Assis Neto AC, Oliveira, M F. 2021. Os anexos embrionários de aves: revisão de literatura. *Research, Society and Development*, 10(2):1-10.

Gao Y, Pu Y, Wang D, Zhang W, Guan W, Ma Y. 2012. Isolation and biological characterization of chicken amnion epithelial cells. *European journal of histochemistry*, 56(3): 33.

Groothuis PG, Koks CA, Goejj AF, Dunselman GA, Arends JW, Ever JL. 1998. Adesão do endométrio humano ao revestimento epitelial e matriz extracelular de amnion in vitro: um estudo microscópico eletrônico. *Reprodução humana (Oxford, Inglaterra)*, 13(8): 2275-2281.

Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49-92.

Holbrook KA, Odland GF. 1980. Regional development of the human epidermis in the first trimester embryo and the second trimester fetus (ages related to the timing of amniocentesis and fetal biopsy). *Journal of Investigative Dermatology*, 74(3): 161-168.

Hoshi H, Mori T. 1971. The fine structure of the chorionic epithelium of chick embryo. *Arch.Histol. Jap*, 33: 45-58.

Kaviani A, Guleserian K, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. 2003. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *Journal of the American College of Surgeons*, 196(4):592-

597.

Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. 2001. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *Journal of pediatric surgery*, 36(11): 1662-1665.

Kim YK, Blackburn DG. 2015. Ultrastructure of the Fetal Membranes of the Oviparous Kingsnake, *Lampropeltis getula* (Colubridae) as Revealed by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Morphology*, 276(12), 1467-1481.

Lambson RO. 1970. An electron microscopic study of the entodermal cells of the yolk sac of the chick during incubation and after hatching. *American Journal of Anatomy*, 129 (1): 1-19.

Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-rekowska B, Djonov V. 2016. Dynamics of the developing chick chorioallantoic membrane assessed by stereology, allometry, immunohistochemistry and molecular analysis. *PLoS One*, 11(4): 1-23.

Mess A. 2003. Evolutionary transformations of chorioallantoic placental characters in Rodentia with special reference to hystricognath species. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 299: 78-98.

Mitchell EB, Johns J. 2008. Avian hematology and related disorders. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 501-522.

Mobbs IG, Mcmillan DB. 1981. Transport across endodermal cells of the chick yolk sac during early stages of development. *American Journal of Anatomy*, 160(3): 285-308.

Mortola JP. 2009. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 153:359-377.

Narbaitz R, Bastani B, Galvin NJ, Kapal VK, Levine DZ. 1995. Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H (+)-ATPase in two specialised cell types in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Journal of*

anatomy, 186: 245.

Ouyang JQ, Quetting M, Hau M. 2012. Corticosterone and broodabandonment in a passerine bird. *Animal Behavior*, 84: 261–268.

Packard MJ. 1980. Ultrastructural morphology of the shell and shell membrane of eggs of common snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Journal of Morphology*, 165(2): 187-204.

Rangan SRS, Sirsat SM. 1962. A estrutura fina da membrana corio-alantóide normal do embrião de galinha. *Journal of Cell Science*, 3(61): 17-23.

Ribatti D. 2012. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. In: Cardiovascular development. *Humana Press*, 843: 47-57.

Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncalli L, Burri PH, Djonov V. 2001. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 264 (4): 317-324.

Rosslenbroich B. (2014) Reproduction. In: On the Origin of Autonomy. History, Philosophy and Theory of the Life Sciences. *Springer Science & Business Media*. p 123-130.

Sheng G. 2010. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. *International Journal of Developmental Biology*, 54: 1033-1043.

Sousa RP, Monteiro HMDA, Bezerra DDO, Soares LLDS, Assis Neto AC, Rici RE, Junior CMA, Carvalho MA. 2018. Morphogenesis of the rhea (*Rhea americana*) respiratory system indifferent embryonic and foetal stages. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38:154-166.

Starck JM. 2020. Morphology of the avian yolk sac. *Journal of Morphology*, 282(7): 959-972. Stewart JR, Blackburn DG. 1988. Reptilian placentation: structural diversity and terminology. *Copeia*, 1988:838–851.

Thierry Ma, Couder RY, Raclot T. 2013. Elevated corticosterone levels decrease reproductive output of chick-rearing Adélie penguins but do not affect chick mass at fledging.

Conservation Physiology, 1: 1-12.

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, Freitas Neto AG. 2003. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2nd ed. Barueri SP: Editora Manole Ltda.

Torquato JL, Sousa JBF, Queiroz JPAF, Costa LLM. 2015. Termografia infravermelha aplicada a emas (*Rhea americana*). *J Anim Behav Biometeorol*, 3: 51-56.

Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F. 2002. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 62(2): 273-282.

Vargas A, Zeisser-labouebe M, Lange N, Gurny R, Delie F. 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 59: 1162-1176.

Winter V, Elliot JE, Letcher RJ, Williams TD. 2013. Validation of an egg-injection method for embryotoxicity studies in a small, model songbird, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Chemosphere*, 90: 125–131.

Yuan YJ, Xu K, Wu W, Luo Q, Yu JL. 2014. Application of the chick embryo chorioallantoic membrane in neurosurgery disease. *International journal of medical sciences*, 11(12): 1275.

APÊNDICE B – ARTIGO 2

Morphometric greater rhea egg and embryo assessments

Morfometria de ovos e embriões de emas

Abstract: The aim of this study is to assess the correlation between morphometric meu egg and embryo measurements, and to correlate these measurements individually. Eighteen embryos were analyzed and width (head, body and eyes), length (cephalo-caudal, body, beak, eye, humerus, tibio-tarsus, wing, head) and weight were determined at different ages (9, 12, 15, 18, 21, 24). Eighteen eggs of the respective embryos were also measured (width, length and weight) for each analyzed age. Statistically significant moderate and strong correlations were observed among the obtained egg and embryo measurements, while no statistically significant correlations were observed when comparing eggs and embryos.

Keywords: *Rhea americana americana*; morphometry; eggs; embryos.

Resumo: O objetivo deste estudo é avaliar a correlação entre as medidas morfométricas do ovo e o embrião de emas, assim como correlacionar essas medidas individualmente. Dezoito embriões foram analisados e mensurados a largura (cabeça, corpo e olhos), comprimento (céfalo-caudal, corpo, bico, olho, úmero, túbio-tarso, asa, cabeça) e peso, sendo estes três para cada idade mensurada (9, 12, 15, 18, 21, 24) e dezoito ovos dos respectivos embriões também foram mensurados (largura, comprimento e peso) para cada idade analisada. Observou-se correlações estatísticas significativas moderadas e fortes nas mensurações realizadas nos ovos e também naquelas de embrião e correlações estatísticas não significativas quando comparados ovos e embriões.

Palavra- chave: *Rhea americana americana*; morfometria; ovos; embriões.

1. Introduction

Morphometric parameter assessments are relevant in the egg grading process and influence egg quality (FAROOQ et al., 2001), also contributing to knowledge on embryo reproductive fitness and growth (ONAGBESANET al., 2007). Besides being important regarding embryo development, physical egg characteristics are decisive for successful incubation (POPOOLA et al., 2015)

Embryonic development measurements in birds may indicate problems associated to feeding management and behavior during incubation, associated with environmental factors and/or hormones (THIERRY et al., 2013), also enabling the understanding the differentiation of precocial and altricial individuals (SPEAKE and WOOD, 2005).

Several studies have reported on the morphometry and morphological differentiation of bird eggs and embryos. External morphological embryo characterizations have been performed in ratites, such as ostriches (GEFEN AND AR, 2001), emus (NAGAI et al., 2011) and greater rhea (ALMEIDA et al., 2015), as well as other birds, such as Japanese quails (AINSWORTH et al., 2010) and chickens (HAMBURGUER and HAMILTON, 1992). Egg characterizations have been reported for chickens (Deshi, viz, Cobb-500, RIR, ISA Brown, ISA White and Fayoumi, Sonali) and other birds (i.e., geese, ducks, pigeons, doves, and quail) (KABIR et al., 2012). Correlations have also been noted, such as between egg and chick weight in emus (DI CAMPOS et al., 2005).

Rheas attract significant zootechnical interest in some countries, such as Uruguay, as they are the source several products, such as meat, eggs and feathers, among others. Increasing rhea production has boosted the interest in developing research related to this species (GADELHA et al., 2020). Data on potential correlations between morphometric greater rhea egg and embryo measurements may contribute with information of interest to the commercial production of these animals. In this context, this study aimed to evaluate these

potential correlations.

2. Material and Methods

All experiments were conducted at the Federal Rural University of the Semi-arid Region (UFERSA), from April 2020 to September 2021, employing animals from the Wild Animal Multiplication Center (*Centro de Multiplicação de Animais Silvestres*, CEMAS) located at 16 m a.s.l. in the city of Mossoró, RN, located in the semi-arid region in Northeastern Brazil. The measurement methodology is quantitative, translated into numbers by mathematical techniques (PEREIRA et al., 2018).

Egg morphometry was determined according to DI CAMPOS et al. (2005) and KABIR et al. (2012), with adaptations. Weights were determined using a digital scale (CASTELLMAQ) and length and width, employing a digital pachymeter (MITUTOYO®). Embryo measurements comprised: weight, obtained on precision analytical scales (MARTE®), width (body, eye and head) and length (cephalocaudal, body, beak, eye, humerus, tibio-tarsus, wing, head), using a digital pachymeter (MITUTOYO®) or with the help of a string when structures were reduced pachymeter measurements were not possible. Embryo measurements were determined according to BROWNE (2006), ALMEIDA et al., (2015), GAMALLO et al., 2016 and BRAND et al., (2016), with adaptations.

A 3x3 (3 eggs/3 embryos) factorial design was employed, comprising six treatments, three replicates per treatment and adaptations birds in each replicate. Three eggs of each age (9, 12, 15, 18, 21, 24) were weighed, measured and placed under artificial incubation conditions in a Luna 240 incubator (Chocmaster, Premium Ecológica Ltda.) at an average temperature of 36.5°C and relative humidity of 52 to 56%, considering the 24-hour interval as the first day of the incubation process. When reaching the desired age for evaluation, the eggs were viewed under an ovoscope to confirm their fertilization and then opened by the air chamber positioning pole using a micro grinder (DREMEL 3000). A cotton swab soaked with

an overdose of isoflurane (ISOFORINE) was then inserted for euthanasia. The eggs were then wrapped with film paper (ISULFILME) in order to contain the anesthetic concentration and ensure analgesia for up to 10 minutes to guarantee animal death. Embryos with less than 10 days of incubation were euthanized by hypothermia, maintained below 4 °C for up to 4 hours (CFMV, 2013).

The data are expressed as means, standard deviation, minimum, maximum and coefficient of variation values using the Minitab version 16.0 statistical software (State College, PA: Minitab). After verifying parametric assumptions, statistical differences between the evaluation days for the different investigated variables were obtained by a One Way ANOVA followed by the Tukey test when the data exhibited a parametric distribution, while non-parametric variables were evaluated by the Kruskal-Wallis test. Pearson's correlation test and linear regressions were applied to verify potential relationships between the investigated variables. A significance level of 5% was established for all statistical analyses.

3. Results and Discussion

At nine days of incubation, eye pigmentation, an area corresponding to the heart in the thoracic region and the presence of sprouts of the thoracic and pelvic limbs could be observed, as well as a body conformation in the shape of the letter "C" (Figure 1A). At twelve days of embryonic development, the neck, beak, and wings were easily identified, as well as the pelvic limbs, which are very distinct from the body, and a larger eyeball projection, indicating the cranial region (Figure 1B). The jugular vein was also identified.

At fifteen days, the eyes were more prominent, and digits were visible (Figure 1C). At eighteen days, small sized feathers under the dorsal embryo region were verified, in addition to beak structure differentiation (rhinotheca and gnatheca), eyelids and external ears (Figure 1D). At twenty-one days of incubation, the embryos exhibited bodies almost completely covered in feathers and complete nail formation (Figure 1E). At twenty-four days of

development, the embryos were completely covered in feathers, more prominent wings, and more characteristic feet features for the species (Figure 1F).

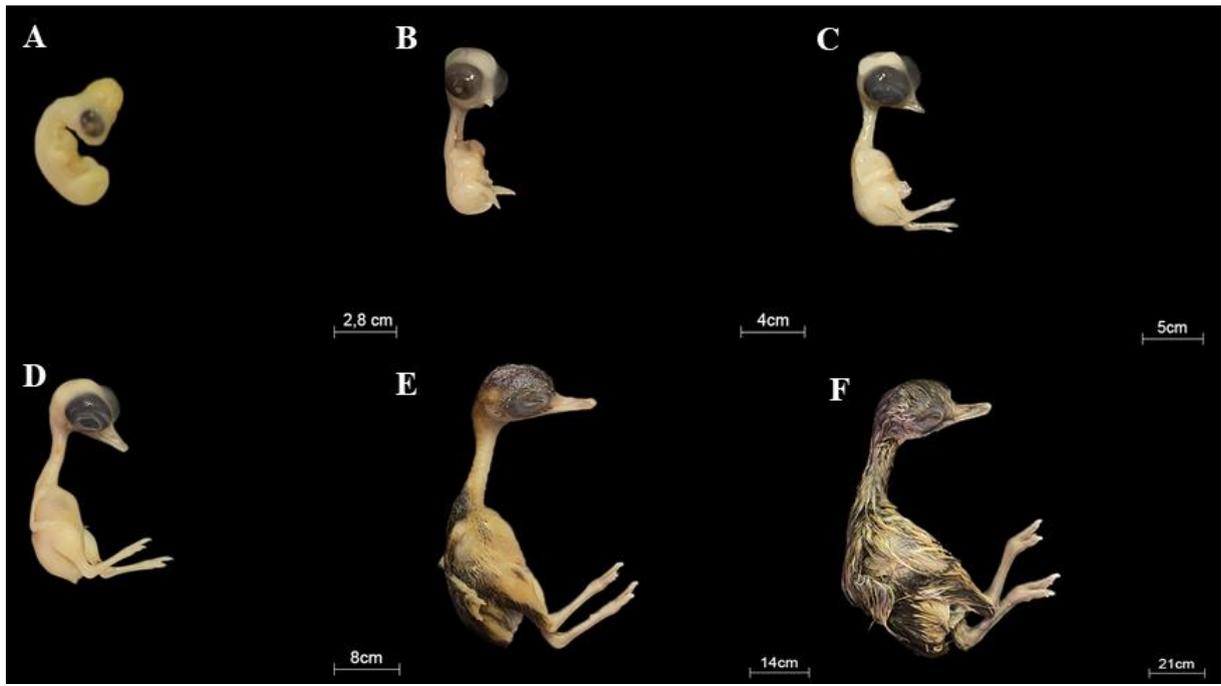


Figure 1. Greater rhea embryos at different incubation days. A, greater rhea embryo at 9 days of incubation (bar: 2.8cm); B, greater rhea embryo at 12 days of incubation (bar: 4cm); C, greater rhea embryo at 15 days of incubation (bar: 5cm); D, greater rhea embryo at 18 days of incubation ((bar: 8cm); E, greater rhea embryo at 21 days of incubation (bar: 14cm); F, greater rhea embryo at 24 days of incubation (bar: 18cm).

ALMEIDA et al. (2015), reported similar results in a study on greater rheas, but noted that 6-day-old embryos already exhibited a flexion in the shape of the letter "C" and that 9-day-old embryos already presented an interdigital membrane. Furthermore, the presence of feather follicles in the thoracic region was visualized at twelve days of incubation by those authors, which is only reported herein at 18 days of incubation, although the authors carried out their tests at 37.5 °C and a relative humidity of 45%.

BRAND et al. (2017) reported similarities with the present study when investigating ostriches. For example, the appearance of ocular pigmentation was noted after 7 or 8 days of incubation, and the development of the interdigital membrane was identified at fourteen days.

HAMILTON (1952) indicate that these findings begin to be observed between 70 and 72 h in domestic fowl.

Embryo morphometric measurements differed from each other as each structure developed (Table 1). Statistically significant variations were noted between the cephalo-caudal length of animals at 9 days of incubation compared to animals at 18 days and between 15 and 21 days of incubation.

Statistical differences between the ages of 9 and 18 days for emu embryo body widths were noted, any difference was observed regarding beak development between the ages of 12 and 15 days. Eye length was statistically different only between the ages of 9 and 12 days of incubation. Head widths were statistically different at 9 and 24 days of incubation, while head length was different only at 24 days compared to all analyzed ages. Humerus length was statistically different only at 18 days when compared to the other ages.

Tibio-tarsus length exhibited no statistical difference only between the ages of 21 and 24 days. Wing lengths were statistically different at all studied ages, except between 15 and 18 days. Embryo weights (Table 1) were statistically different at 15 and 18 days of incubation compared to the other investigated ages.

Table 1. Greater rhea embryo measurements, expressed as means \pm standard deviations.

Variables	Period						p-value (ANOVA)
	09 days	12 days	15 days	18 days	21 days	24 days	
Cephalo-caudal c	14.21 \pm 3.68d	24.21 \pm 2.83c	34.51 \pm 0.79cb	46.05 \pm 3.81b	81 \pm 4.41 ^a	97.54 \pm 10.47 ^a	<0.001*
Body l	5.46 \pm 1.09d	10.29 \pm 2.54c	12.05 \pm 0.32c	15.34 \pm 1.46bc	22.9 \pm 4.47ab	31.13 \pm 0.92 ^a	<0.001*
Nozzle c	-	2.15 \pm 0.11d	4.45 \pm 0.65d	14.57 \pm 1.17c	22.47 \pm 0.85b	32.35 \pm 3.12 ^a	<0.001*
Eye c	3.13 \pm 0.58c	6.35 \pm 0.43b	10.03 \pm 0.92a	12.15 \pm 0.27a	13.79 \pm 1.11a	12.31 \pm 2.88 ^a	<0.001*
l-eye	3.88 \pm 0.52d	7.53 \pm 0.68d	12.06 \pm 0.24c	14.74 \pm 0.89b	18.62 \pm 0.58a	18.08 \pm 1.48 ^a	<0.001*
Head l	6.71 \pm 1.6d	10.34 \pm 0.69c	13.28 \pm 1.31cb	15.75 \pm 1.22b	15.87 \pm 0.47b	21.24 \pm 3.19 ^a	<0.001*
Head c	8.23 \pm 1.03c	11.9 \pm 0.76c	15.27 \pm 1.87b	15.44 \pm 1.06b	18.87 \pm 2.25ba	24.39 \pm 2.18 ^a	<0.001*
Humerus c	-	8.3 \pm 1.36c	8.13 \pm 0.69c	11.62 \pm 1.13b	15.89 \pm 0.48a	17.65 \pm 2.16 ^a	<0.001*
Tibio-Tarsus c	-	12.67 \pm 1.25d	21.59 \pm 1.0 c	35.64 \pm 4.02b	59.06 \pm 2.12a	75.84 \pm 17.84 ^a	<0.001*
Wing c	-	-	7.31 \pm 0.72c	17.06 \pm 6.64cb	23.02 \pm 7.59b	28.59 \pm 1.67 ^a	<0.001*

Weight	0.44 ± 0.14d	1.8 ± 0.07d	4.26 ± 0.38c	9.84 ± 0.58b	42.01 ± 12.39 ^a	61.0 ± 12.13 ^a	<0.001*
--------	--------------	-------------	--------------	--------------	----------------------------	---------------------------	---------

a,b,c Means followed by different letters in rows indicate statistical difference (p<0.05 - Tukey). The letter "c" followed by structure names represents length and "l" represents width. Blank spaces represent undeveloped structures.

GEFEN and AMOS AR (2001) reported a significant difference in cephalocaudal length at 20 days of embryonic development when morphometrically analyzing ostrich embryos between 8 and 40 days of embryonic development. They also indicated no statistical differences concerning the tibio-tarsus length, whereas wing length and beak length differences were noted at 32 and 36 days of embryonic development and at 24, 34 and 36 days of embryonic development, respectively. Regarding embryo weight the authors reported statistically significant differences at 14, 20 and 26 days of development.

ALMEIDA et al. (2015) observed that cephalocaudal growth in greater rhea is reduced after the fifteenth day of incubation, while other parameters, such as tibia-tarsus, humerus and beak length, exhibit a linear growth. The authors also indicate that embryo weight exhibits an exponential increase throughout antigenic development, with insignificant variations from the 5th to the 15th day, increasing considerably from the 15th day until the 27th. GAMALLO et al. (2016) analyzed duck embryos at 8 days of embryonic development and reported that weights of embryos of the same age exhibit variations.

DANCEY and REIDY (2006) report Pearson correlation values of $r = 0.10$ to 0.30 as indicative of a weak relationship, $r = 0.40$ to 0.6 , moderate, and $r = 0.70$ to 1 , a strong relationship. Considering this scale, no morphometric correlations observed herein were weak., eye length and humerus and tibia-tarsus correlations, as well as wing and weight and wing length and head width correlations, were moderate, and the remaining correlations were strong (Table 2).

Table 2. Correlation values between greater rhea embryo morphometric variables.

Variables	Cef C	Color l	Bic c	Eyes c	Eyes l	Cab l	Ume c	Tibia T	The c	Pes
Body l	0.964*	1								
Nozzle c	0.979*	0.950*	1							
Eye c	0.808*	0.758*	0.724*	1						

I-eye	0.909*	0.878*	0.893*	0.920*	1					
Head l	0.861*	0.902*	0.855*	0.789*	0.884*	1				
Humerus c	0.949*	0.906*	0.950*	0.652*	0.878*	0.770*	1			
Tibio-Tarsus c	0.972*	0.921*	0.972*	0.681*	0.908*	0.780*	0.961*	1		
Wing c	0.830*	0.872*	0.875*	0.582*	0.769*	0.639	0.851*	0.802*	1	
Weight	0.944*	0.895*	0.935*	0.628*	0.792*	0.750*	0.943*	0.960*	0.748*	1
Head c	0.941*	0.938*	0.914*	0.792*	0.896*	0.891*	0.870*	0.924*	0.743*	0.865*

The "*" followed by the values of each variable represent statistical significance. Cef_C = Cephalo-caudal length; Color l: Body width; Bic c: Beak length. Eyes l: Eye width, Cab l: Head width, Ume c: Length of humerus, Tibio T: Length of tibio-tarso, As c: Wing length, Pes: Weight, Head c: Head length.

Our findings corroborate RICKLEFS et al. (1998), who reported significant correlations between bird growth rates and size. KASHMIRI AND VATSALYA (2012) reported that beak and leg length (tibio-tarsus) correlated strongly with embryo weight in Japanese quails, aiding in age at incubation assessments during embryonic development. BRAND et al. (2017) discussed that this information is useful for estimating embryo age and identifying incubation timing issues, which can result in low hatchability.

As the detected correlation values were significant, a regression equation was applied. Each day cephalic-caudal values increased by 5.701 cm, body width by 1.614 cm, beak, by 2,614 cm, eye length by 0.6699 cm, eye width by 1.019 cm, head width by 0.8733 cm, humerus by 0.8826 cm, tibio-tarsus by 5.429 cm, wings by 2.327cm, weight by 4.086 g, and head length by 0.9703 cm (Table 3).

Table 3. Regression values of the different greater rhea embryo morphometric variables.

Variables	Regression equation	R	R ²	Standard Error
Cephalo-caudal c	y = -44.47 + 5.701 x days	0.96*	0.92	8.80
Body l	y = -10.43 + 1.614 x days	0.94*	0.89	2.94
Nozzle c	y = -31.85 + 2.614 x days	0.98*	0.95	2.47
Eye c	y = -1.429 + 0.6699 x days	0.88*	0.76	1.96
I-eye	y = -4.325 + 1.019 x days	0.96*	0.92	1.51
Head (d.biparietal) l	y = -0.545 + 0.8733 x days	0.94*	0.87	1.77
Head c	y = -0.326 + 0.9703 x days	0.94*	0.88	1.86
Humerus c	y = -3.568 + 0.8826 x days	0.93*	0.85	1.59
Tibio-Tarsus c	y = -57.319 + 5.429 x days	0.95*	0.90	8.21
Wing c	y = -26.38 + 2.327 x days	0.87*	0.74	4.74
Weight	y = -47.52 + 4.086 x days	0.87*	0.75	12.26

r = Coefficient of association; R²= Coefficient of determination; * Statistical significance (p<0.05). The letter "c" followed by the structure names represents length and the "l" represents width.

ALCEL et al. (1995) reported that guinea fowl exhibited a weight increase of 3.31g

per day of incubation and a 3.83 mm increase in beak length/day applying regression equations. ALMEIDA et al. (2015) reported that weight gains of 9 g and a 0.6 cm increase in cephalo-caudal length per day of incubation from 5 to 27 days in greater rhea. BRAND et al. (2017) stated that eye size in ostriches increases faster than beak length during incubation, reaching 16.2 mm on day 28, while beak length continues to develop until hatching, at 42 days.

Egg morphometric measurements may vary due to several factors, such as sanitary conditions, feeding or animal age. Therefore, we decided to evaluate emu egg morphometry and weights. Greater rhea eggs between nine and 24 days were not statistically different regarding width, length or weight at any of the evaluated ages (Table 4), although significant weight loss with incubation development was expected.

Table 4: Greater rhea egg measurements, expressed as means \pm standard deviations.

Variables	Period						p-value (ANOVA)
	09 days	12 days	15 days	18 days	21 days	24 days	
Width	85.47 \pm 0.92 ^a	86.72 \pm 2.01 ^a	88.89 \pm 1.03	80.73 \pm 1.68 ^a	86.61 \pm 2.98 ^a	84.69 \pm 5.55 ^a	0.155
Length	119.79 \pm 3.37 ^a	120.07 \pm 6.42 ^a	123.42 \pm 3.1 ^a	116.61 \pm 7.98 ^a	122.84 \pm 2.77 ^a	120.27 \pm 5.7 ^a	0.669
Weight	508.67 \pm 5.03 ^a	508.67 \pm 39.5 ^a	557.67 \pm 30.75 ^a	500.33 \pm 77.78 ^a	520 \pm 33.15 ^a	515 \pm 68.83 ^a	0.759

a,b,c Means followed by different letters in rows indicate statistical difference ($p < 0.05$ - Kruskal-Wallis).

DI CAMPOS et al. (2005) reported that the best measurement for egg size in ratite birds is weight. Subsequently, ALVARENGA et al. (2008) stated that egg size is strongly related to growth and survival of early birds, such as in emu eggs. In this regard, LÁBAQUE (2006) discusses that egg size reflects the amount of embryo reserves, leading to greater hatching chances.

Despite these studies, ALVARENGA et al. (2008) concluded that there is no relationship between ostrich egg weight and the development of ostrich chicks until the 15th day of life, differing from that reported for precocial birds, such as passeriform birds, turkeys and domestic chickens (GÖTH and EVANS, 2004).

POPOOLA et al. (2015) selected a total of 150 eggs, 30 for each different investigated

avian species (chicken, turkey, quail, guinea fowl and bush duck), assessing weight (g), length (cm) and diameter (cm), also analyzed herein. The authors reported that turkey eggs are the heaviest, albeit statistically similar to chicken and bush duck eggs, while quail egg weights were significantly different from guinea fowl eggs. Guinea fowl and quail egg lengths were significantly different from each other. Concerning egg diameter, bush duck and chicken eggs were similar, but turkey eggs were significantly larger, presenting the largest diameter in relation to the other species, while quail eggs presented the smallest diameter compared to the other species, with a statistically significant difference.

Herein, a moderate significant correlation was observed between length and width, while a strong significant correlation between weight and width and between weight and length were observed, in agreement with DANCEY and REIDY (2006).

Table 5: Correlation values between the egg morphometry variables analyzed herein.

Variables	Width	Length	Weight
Width	1.0		
Length	0.612*	1.0	
Weight	0.730*	0.902*	1.0

* represents statistical significance.

DI CAMPOS et al. (2005) obtained similar results to those reported herein by our group for rheas, indicating a positive correlation between egg weight, length and width, as well as between egg length and width, but did not classify correlation strengths.

The egg and respective embryo morphometric variables analyzed herein were also correlated, albeit with no statistical significance, including a negative correlation between caudal cephalad length and the egg. Similarly, a weak positive correlation was found when correlating this variable to egg width and weight. Regarding embryo body width, no positive correlations between egg weight, width and length, as well as for embryo beak length, eyes, humerus, tibia-tarsus and wings, were observed. Other variables, such as embryo eye width, head width, head length and weight were negatively correlated to egg length and a weak positive correlation was observed between egg width and weight (Table 6).

Table 6. Correlation values between morphometric embryo and egg variables.

Variables	Egg length	Egg width	Egg weight
Cephalo-caudal length of embryo	-0.166	0.063	0.022
Width of embryo body	-0.212	-0.051	-0.055
Embryo beak length	-0.229	-0.036	-0.007
Embryo eye length	-0.139	-0.034	-0.058
Embryo eye width	-0.207	0.051	0.006
Head width (d.biparietal) of embryo	-0.207	0.117	0.081
Length of the humerus of the embryo	-0.289	-0.061	-0.170
Tibio-tarso length of the embryo	-0.304	-0.075	-0.073
Embryo wing length	-0.259	-0.322	-0.357
Embryo weight	-0.143	0.046	0.022
Embryo head length	-0.049	0.084	0.041

* Statistically significant ($p < 0.05$).

According to RIBEIRO et al. (2008), chick weight during hatching is directly related to egg weight and associated to better development, as this may represent a more developed embryo or a more developed yolk sac, enabling greater survival ability before the start of exogenous feeding. However, weight, width and length were not correlated significantly in our study with the greater rhea embryo development during the incubation phase. On the other hand, DI CAMPOS et al. (2005), who investigated correlations between these variables and chick birth weight, reported that egg weight is not a selection trait in greater rhea. Nevertheless, this does not seem to be the case, as larger and heavier eggs are expected to produce larger and heavier chicks.

4. Conclusions

Egg morphometry parameters (width, length and weight) were not statistically correlated with embryo morphometric measurements concerning length (cephalocaudal, body,

beak, eye, humerus, tibio-tarsus, wing, head), width (head, eye and body) or weight.

However, egg measurements exhibited moderate and strong significant correlations when compared to each other. Furthermore, strong correlations between the analyzed variables in embryos were also noted.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Acknowledgments

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, code 001), for financial support and to Universidade Federal Rural do Semi-Árido, for support.

Authors' Contribution

All authors contributed equally to the design and writing of the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript and approved the final version.

References

AINSWORTH, S.J.; STANLEY, R.L.; EVANS, D.J.E. Developmental stages of the Japanese quail. *J. Anat.* v. 216, p. 3–15, 2010. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01173.

ALMEIDA, M.H.; SOUSA, P.R.; BEZERRA, O.D.; OLIVINDO, G.F.R.; DINIZ, N.A.; OLIVEIRA, C.S.; FEITOSA, T.L.M.; FORTES, M.A.E.; FERRAZ, S.M.; CARVALHO, P.K.Y.; MENEZES, A.J.; CARVALHO, M.A.C.M. Greater rhea (*Rhea americana*) external morphology at different stages of embryonic and fetal development. *Animal Reproduction Science*, p.9, 2015. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.09.007.

ALVARENGA, A.B.B.; BOERE, V. O tamanho do ovo não prediz o desenvolvimento físico de avestruzes (*Struthio camelus*) aos quinze dias de idade. *Ciencia rural*, v. 38, p. 802-806, 2008. DOI: 10.1590/S0103-84782008000300033.

ANCEL, A.; LIESS, S.; GIRARD, H. Embryonic development of the domestic guinea fowl (*Numida meleagris*). *Journal of Zoology*, v.235(4), p.621–634, 1995. DOI:10.1111/j.1469-7998.1995.tb01773.

BRAND, Z.; CLOETE, S. W. P.; MALECKI, I. A.; BROWN, C. R. Ostrich (*Struthio camelus*) embryonic development from 7 to 42 days of incubation. *British poultry science*, 58(2), 139-143, 2017. DOI: 10.1080/00071668.2016.1259529.

BROWNE, J.T; STAGING KAKI. (Himantopus novaezelandiae) Embryos Using Embryonic Morphological Features. **Wildlife Management Report**, n.197, 2006.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de boas praticas para eutanásia em animais (Conceitos e procedimentos recomendados. Comissão ética, bioética e bem-estar animal)**. Brasília: CFMV, 2013.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre, Artmed, 2006.

DI CAMPOS, M.; CARVALHO, D.; BRAGA FILHO, C.; VILELA, R.; MATOS, S.; HOLMER, KR. Estimativa de correlações entre medidas morfométricas, peso do ovo e peso de filhotes de emas criados em cativeiro. Estimativa de correlações entre medidas morfométricas, peso do ovo e peso de filhotes de emas criados em cativeiro. **Cienc. Rural [online]**, v.35, n.3, p.678-683, 2005. DOI: 10.1590/S0103-84782005000300031.

FAROOQ, M.; MIAN, M.A.; ALI, M.; DURRANIM F.R.; ASQUAR, A.; MUQARRAB, A.K. Egg traits of Fayoumi bird under subtropical conditions. **Journal of Agriculture**, n.17, p.141-145, 2001.

GADELHA, A. I. B. B.; ARAUJO, S.M.; OLIVEIRA, F.M.; BATISTA, V.N.; SILVA, L.N.; RICARTE, F.R.A.; SOUZA, R.E.J.; SILVA, M.F.Y.; COSTA, L.D.I. Fatores climáticos e comportamentais de emas (*Rhea americana*, Linnaeus, 1758) alimentadas com diferentes dietas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2018. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.8324.

GAMALLO, J. P. M.; ESPERE, G.; CARILLO, D. M. C.; BLANES, D. N.; ABUDA, F. G.; LABARDA, H. J.; JUMAWAN, J. C. Evaluation of antiangiogenic property of *Ocimum basilica* ethanolic leaf extract by using duck embryo chorioallantoic membrane (cam) assay and its morphometric analysis. **International Journal of Herbal Medicine**, v.4, p.22-26, 2016.

GEFEN, E.; AR, A. Morphological description of the developing ostrich embryo: a tool for embryonic age estimation. **Israel J. Zool**, v. 47, p. 87–97, 2001. DOI: 10.1560/H2T8-1H2U-81H1-P5XY.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 12.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 467p.

GÖTH, A.; EVANS, C. S. Egg size in Australian brush-turkey *Alectura lathami* hatchlings predicts motor performance and postnatal weight gain. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v.82, p.972-979, 2004. DOI: 10.1139/z04-070.

HAMBURGER, G.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Dev. Dyn.** v. 195, p.231–272, 1992. DOI: 10.1002/aja.1001950404

HENDRICKX, A.G.; HANZLIK, R. Developmental stages of the bob-white quail embryo (*Colinus virginianus*). **Biol. Bull.** v. 129, p. 523–531, 1965. DOI: 10.2307/1539730.

KABIR, A.M.; ISLAM, S.M.; DUTTA, K.R. Egg morphometric analyses in chickens and some selected birds. **Univ. j. zool.** Rajshahi Univ. v. 31, p. 85-87, 2012. DOI: 10.3329/ujzru.v31i0.15439

KASHMIRI, L.A.; VATSALYA, V. Quantitative and morphological measures may predict growth and mortality during prenatal growth in Japanese quails. **International Journal of Poultry Science**, v.11, p.556– 564, 2012. DOI:10.3923/ijps.2012.556.564

LABISKY, R.F.; OPSAHIF, J.F. A Guide to Aging of Pheasant Embryos. Biological Notes. Ohio State University, **Columbus**, OH, 1958. DOI: 10.5962/bhl.title.15129.

MURRAY, J.R.; VARIAN-RAMOS, C.W.; WELCH, Z.S.; SAHA, M.S. Embryological staging of the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. **J.Morphol.** v.274, p.1090–1110, 2013. DOI: 10.1002/jmor.20165.

NAGAI, H.; MAK, S.; WENG, W.; NAKAYA, Y.; RAJ LADHER, R.; SHENG, G. Embryonic development of the Emu, *Dromaius novaehollandiae*. **Dev.Dyn.** v.240, p.162–175, 2011. DOI: 10.1002/dvdy.22520

OLEA, G.B.; SANDOVAL, M.T. Embryonic development of *Columba livia* (Aves: Columbiformes) from altricial-precocial perspective. **Revista Colombiana de Ciências Pecuarias**, v.25, p.3–13, 2012.

ONAGBESAN, O.; BRUGGEMAN, V.; DESMIT, L.; DEBONNE, M.; WITTERS, A.; TONA, K.; EVERAERT, N.; DECUYPERE, E. Gas exchange during storage and incubation of Avian eggs: Effects on embryogenesis, hatchability, chick quality and post-hatch growth. **World's Poultry Science Journal.** v. 63, p. 557-573, 2007. DOI: 10.1017/S0043933907001614.

PEREIRA, S.A.; SHITSUKA, M.D.; PARREIRA, J.F.; SHITSUKA, R. **Metodologia da pesquisa científica**. 1º Edição, Santa Maria: UFSM, NTE, 2018, 119p.

PISENTI, J.M.; SANTOLO, G.M.; YAMAMOTO, J.T.; MORZENTI, A.A. Embryonic development of the América kestrel (*Falco sparverius*): external criteria for staging. **J. Raptor Res.** v.35, p. 194–206, 2001. DOI: 10.13140/2.1.3153.6324.

POOLA, M.A.; ALEMEDE, C.I.; AREMU, A.; OLA, S.I. Morphometric Parameters of whole egg and Egg Yolk of five Nigerian Domesticated Avian Species. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v.8, p.41-45, 2015. DOI: 10.9790/2380-08334145.

RIBEIRO, T.C.; MOREIRA, P.C.; OLIVEIRA, J.P. et al. Influência do peso, à incubação, na eclodibilidade de ovos de avestruz. **Estudos - Goiânia**, v. 35, n. 3, p. 501-516, 2008.

RICKLEFS, R.E.; STARCK, J.M. Embryonic growth and development. In: Starck, J.M., Ricklefs, R.E. (Eds.), *Avian Growth and Development. Evolution Within the Altricial–Precocial Spectrum*. **Oxford University Press**, Oxford, p. 31–58, 1998.

SPEAKE, B.K.; WOOD, N.A.R. Timing of incorporation of docosahexaenoic acid into brain and muscle phospholipids during precocial and altricial modes of avian development. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 141, p.147–158, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2005.02.009.

THIERRY, A.M.; BRAJON, S.; MASSEMIN, S.; HANDRICH, Y.; CHASTEL, O.; THIERRY, R. Decreased prolactin levels reduce parental commitment, egg temperatures, and breeding success of incubating male Adélie penguins. **Horm. Behav.** v.64, p.737–747, 2013. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.06.003.

ANEXO A - SISTEMA DE AUTORIZAÇÃO E INFORMAÇÃO EM BIODIVERSIDADE (ICMBio)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75369-1	Data de Emissão: 03/06/2020 10:03:50	Data da Revalidação*: 03/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Indira Bezerra Barros Gadelha	CNPJ: 067.304.654-00
Título do Projeto: Os anéis fósseis de amas (Fosses amoniticas, Linnaeus, 1758)*	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de dados	06/2020	06/2022

Equipe

#	Nome	Função	CNPJ	Nacionalidade
1	MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA	Orientador e coordenador	325.940.504-50	Brasileira
2	Ana Caroline Freitas Casiano de Sousa	Auxiliar, realizar trabalho de iniciação científica.	061.199.543-30	Brasileira
3	CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA	Colaborador	036.973.594-31	Brasileira
4	Alexandre Rodrigues Silva	Colaborador	702.962.543-27	Brasileira
5	Alexsandra Ferraz de Paula	Colaborador	913.071.983-88	Brasileira
6	Hugo Alexandre de Oliveira Rocha	Colaborador	761.118.304-40	Brasileira

Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato de autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DARTAS das espécies, as condições para realização das coletas e o uso de infraestrutura de unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando de viagem de legislação vigente, ou quando de investigação, orientado ou base descrição de informações relevantes que subsidiarem a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos de legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para as fins previstas na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 12/2015, no que se refere esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou específicos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou educativas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo realizadas por pessoas naturais ou jurídicas estrangeiras, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças litológicas de cultura nativa e cultura popular, presentes e passadas, sobite por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, é utilizado ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão seguir por protocolos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar método de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condições in situ.
7	Esta autorização NÃO isenta o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde está realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou condutor de área dentro das terras de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0753690120200603

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75369-1	Data da Emissão: 03/06/2020 10:03:50	Data da Revalidação*: 03/06/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Indira Bezerra Barros Gadelha	CPF: 067.304.654-09
Título do Projeto: Os anuros felais de águas (Rheas americana; Linnaeus, 1758)	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Observações e ressalvas

#	Este documento não dispensa o cumprimento de legislação que dispõe sobre acesso e componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, desenvolvimento e desenvolvimento tecnológico. Veja outras informações em www.gov.br/gestgen .
---	--

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	UFERSA	Mossoró-RN	Catinga	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex situ (fora da natureza)

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtd.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Rheas americana	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Áves)	Ovos

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Abaixo do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio de página do Sisbio/ICMBio na internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0753690120200603

Página 2/3

**ANEXO B – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
(CEUA/UFERSA)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Mossoró, 21 de julho de 2020.

PARECER 32/2020

Certificamos que o projeto intitulado “OS ANEXOS EMBRIONÁRIOS DE EMAS Rhea americana Linnaeus, 1758”, sob a responsabilidade de Moacir Franco de Oliveira, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião no dia 21 de julho de 2020.

Vigência do Projeto	Julho de 2020 a julho de 2022
Espécie/linhagem	Rhea americana americana
N. de Animais	24
Peso/idade	Embriões de 0-21 dias
Sexo	Indeterminado
Origem	CEMAS

Emanuelle Fontencle Rabeo
Emanuelle Fontencle Rabeo
Coordenadora CEUA-UFERSA

ANEXO C – COMPROVANTE DE SUBMIÇÃO: ARTIGO DE REVISÃO

Research, Society and Development, v. 10, n. 2, e54310212498, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12498>

Os anexos embrionários de aves: revisão de literatura

The embryarian annexes of birds: literature review

Los anexos embriarios de las aves: revisión de la literatura

Recebido: 30/01/2021 | Revisado: 05/02/2021 | Aceito: 19/02/2021 | Publicado: 28/02/2021

Ana Indira Bezerra Barros Gadelha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7541-1646>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: anaindirabezerra@hotmail.com

Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5883-9704>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: carolfreitas04@outlook.com

João Augusto Rodrigues Alves Diniz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5329-9059>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: joao-diniz15@hotmail.com

Carlos Eduardo Bezerra de Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7960-5373>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: carlos.moura@ufersa.edu.br

Antonio Chaves de Assis Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6260-661X>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: antonioassis@usp.br

Moacir Franco de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6269-0823>

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Brasil

E-mail: moacir@ufersa.edu.br

Resumo

Para que os vertebrados vivíparos, incluindo as aves que possuem seu desenvolvimento embrionário dentro do ovo tenham condições de sobreviver no período embrionário, esses necessitam de anexos embrionários (âmnio, cório, alantoide e saco vitelínico). Apesar de ser um assunto relevante, ainda não havia levantamento literário que demonstrasse a disposição, formação, função, utilização em linhas de pesquisa e aspectos específicos desses anexos nas mais diversas aves, tendo isso em vista, o objetivo dessa revisão é fazer esse levantamento. Assim, a mesma apresenta um estudo de pesquisa bibliográfica do tipo qualitativo com características descritivas e forneceu informações que auxiliam na compreensão de vários mecanismos durante a formação do embrião e o progresso do desenvolvimento dentro do ovo, como perspectiva futura espera-se que essa pesquisa sirva de impulso para que novas pesquisas na área sejam desenvolvidas que possam também promover o desenvolvimento científico.

Palavras-chave: Aves; Desenvolvimento embrionário; Anexos extraembrionários.

Abstract

In order for viviparous vertebrates, including birds that have their embryonic development inside the egg, to be able to survive in the embryonic period, they need embryonic attachments (amnion, corium, allantois and yolk sac). Despite being a relevant subject, there was still no literary survey that demonstrated the disposition, training, function, use in lines of research and specific aspects of these annexes in the most diverse birds, having this in mind, the purpose of this review is to make this survey, the review presents a qualitative type study of bibliographic research with descriptive characteristics and provided information that helps to understand various mechanisms during the formation of the embryo and the progress of development within the egg, as a future perspective this research is expected to serve as a boost so that new research in the area is developed that can also promote scientific development.

Keywords: Birds; Embryonic development; Extraembryonic attachments.

ANEXO D – COMPROVANTE DE SUBMIÇÃO: ARTIGO PRINCIPAL

 Anatomical Record

 Home

 Author

 Review

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to
Anatomical Record

Manuscript ID
AR-22-0094

Title
Fetal attachment morphology in greater rheas (*Rhea americana americana* Linnaeus, 1758)

Authors
GADELHA, ANA
Franco de Oliveira, Moacir
Sousa, Ana Caroline
Diniz, João
Lopes, Igor Renno Guimarães
Fernandes, Bruno
Pereira, Alexandra
Moura, Carlos Eduardo

Date Submitted
13-Mar-2022

ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMIÇÃO: ARTIGO COMPLEMENTAR

☰ Ciência Rural

🏠 Home

✍ Author

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Ciência Rural

Manuscript ID
CR-2022-0142

Title
Morphometric greater rhea egg and embryo assessments

Authors
GADELHA, ANA
Oliveira, Moacir
de Sousa, Ana
Rodrigues Alves Diniz, João Augusto
Lopes , Igor

Date Submitted
14-Mar-2022
