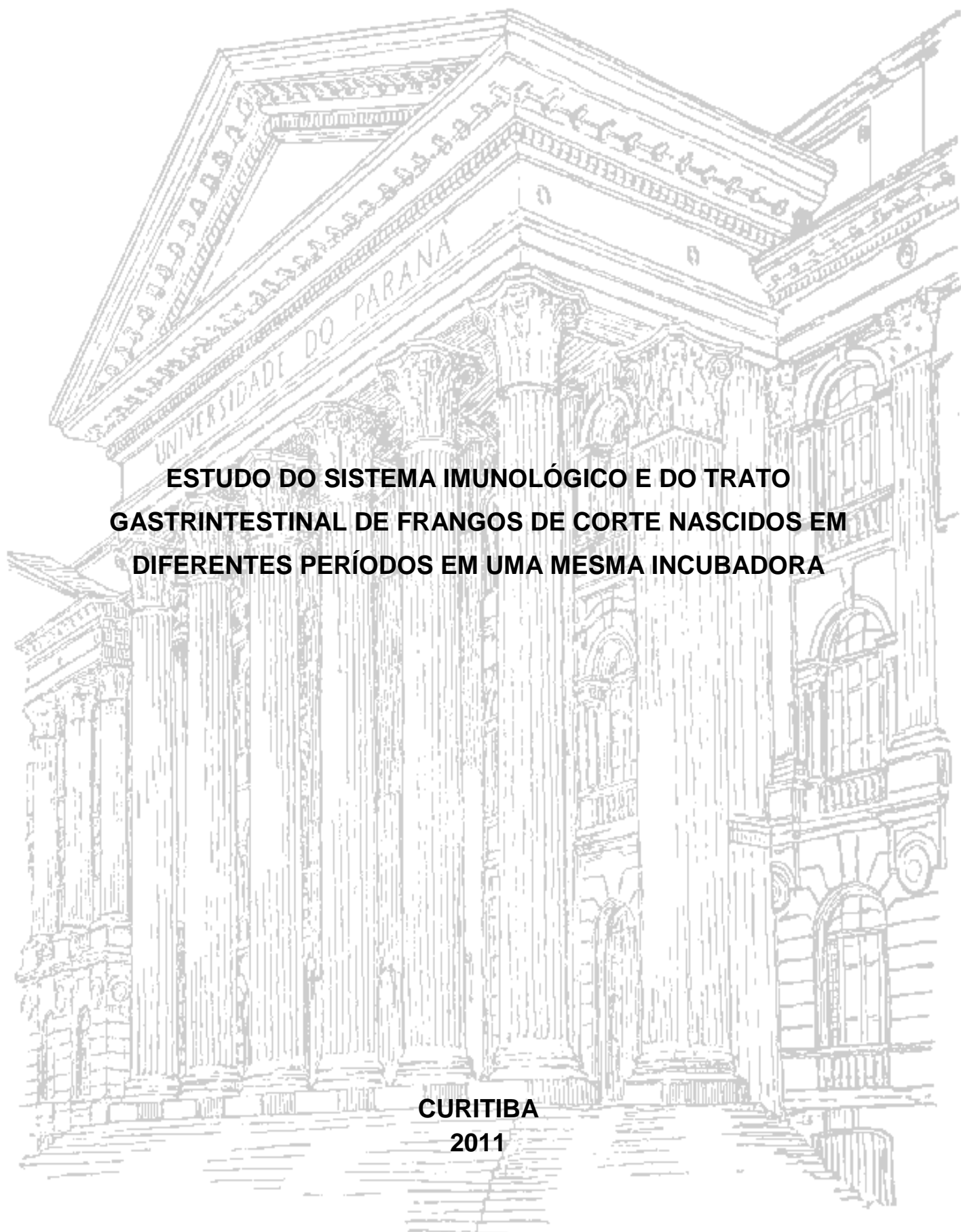


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ESTUDO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO TRATO  
GASTRINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE NASCIDOS EM  
DIFERENTES PERÍODOS EM UMA MESMA INCUBADORA**

**CURITIBA  
2011**



**RICARDO MITSUO HAYASHI**

**ESTUDO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO TRATO  
GASTRINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE NASCIDOS EM  
DIFERENTES PERÍODOS EM UMA MESMA INCUBADORA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Santin  
Co-orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Vitória Fischer da Silva

**CURITIBA  
2011**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

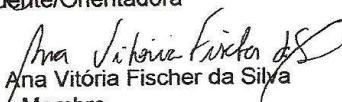


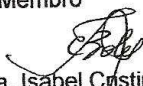
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**ESTUDO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DO TRATO GASTRINTestinal DE FRANGOS DE CORTE NASCIDOS EM DIFERENTES PERÍODOS EM MESMA INCUBADORA**” apresentada pelo Mestrando RICARDO MITSUO HAYASHI declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou o candidato apto para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2011

  
Professora Dra. Elizabeth Santin  
Presidente/Orientadora

  
Professora Dra. Ana Vitória Fischer da Silva  
Membro

  
Professora Dra. Isabel Cristina Boleli  
Membro

*Aos melhores pais do mundo,  
Mário e Glória, meus queridos  
irmãos Yuri, Ani e Júnior, familiares  
e amigos, de coração,  
DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado em mais uma jornada. Obrigado por mais essa etapa profissional e pessoal concluída.

À minha família, meu tudo. Por toda educação, ensinamentos, dedicação e amor incondicional. Pai, Mãe, Irmãos e Batyan, essa vitória é de vocês.

À Universidade Federal do Paraná, ao Curso de Medicina Veterinária e ao Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, pela excelência na minha formação acadêmica e profissional. Meus agradecimentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santin, orientadora, mestre e grande amiga. Obrigado por me guiar desde a graduação e ter acreditado no meu potencial. “O céu é o limite”.

Ao Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da UFPR, minha segunda casa. Em especial, Louise e Maristela, grandes profissionais e amigas. Mariana, Leandro, Leonardo, Larissa, Tatiana, Sâmara, Jean, Adriana, Daniela, Paula, estagiários e todos que já passaram e contribuíram de alguma forma. Sem o apoio e a amizade de vocês jamais teria chegado até aqui.

Aos professores doutores Alex Maiorka, Ana Vitória Fischer da Silva e Geraldo Camilo Alberton. Obrigado pelas orientações e ensinamentos.

A BRF Brasil Foods, por ceder o incubatório da unidade Castro-PR para realização do experimento. Em especial, Hugo Urso e Cláudia Pies, muito obrigado.

A todos os meus amigos, de longa data e da faculdade. Obrigado pela lealdade e amizade eterna.

A Sanex Comércio e Indústria Veterinária, em especial, Marcelo Huber e Anne Japp, pela grande oportunidade profissional oferecida a mim, e pela liberdade para conclusão desse trabalho.

A Capes, pela concessão de bolsa durante a realização do curso de mestrado.

A todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui.

Muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>Resumo Geral</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Lista de ilustrações</b> .....	x
<b>Lista de tabelas</b> .....	xii
<b>Introdução geral</b> .....	13
<b>Capítulo 1 – Desenvolvimento do sistema imunológico em frangos de corte</b> ...	16
Resumo .....	16
Abstract .....	17
O sistema imunológico .....	17
Linfócitos .....	22
Imunoglobulinas .....	25
Resposta imunológica .....	26
Fatores que interferem no desenvolvimento do sistema imunológico .....	28
Jejum pós eclosão .....	28
Estresse .....	30
Matrizes .....	31
Conclusão .....	32
Referências bibliográficas .....	33
<b>Capítulo 2 – Desenvolvimento do trato gastrintestinal de frangos de corte</b> .....	37
Resumo .....	37
Abstract .....	37
Introdução .....	38
Absorção da gema .....	39
Desenvolvimento intestinal no período final de incubação e pós eclosão .....	40
Influência da janela de nascimento e jejum pós eclosão sobre o desenvolvimento intestinal .....	43
Conclusão .....	46
Referências bibliográficas .....	47

<b>Capítulo 3 – Efeito da janela de nascimento sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e presença de células cd3 positivas em pintos de corte.....</b>	<b>49</b>
Resumo .....	49
Abstract .....	50
Introdução .....	51
Material e métodos.....	52
Classificação e incubação de ovos .....	52
Delineamento experimental .....	53
Necropsia, pesagem e colheita de amostras .....	54
Coloração Hematoxilina e Eosina .....	55
Coloração Alcian Blue.....	55
Imunohistoquímica.....	56
Análise estatística .....	57
Resultados .....	58
Discussão.....	67
Conclusão .....	73
Referências bibliográficas .....	74
<b>Considerações finais .....</b>	<b>77</b>

## RESUMO GERAL

O desenvolvimento inicial das aves é de extrema importância, pois vários eventos importantes ocorrem na fisiologia destes animais. Idade da matriz, tamanho e peso do ovo, fatores ligados a manejo e restrição alimentar podem afetar o desenvolvimento do sistema imunológico e gastrointestinal das aves. O objetivo desta dissertação foi revisar importantes aspectos sobre o sistema imunológico e gastrointestinal de frangos de corte, bem como realizar um estudo para avaliar o desenvolvimento de ambos os sistemas em diferentes períodos de eclosão (janela de nascimento) com dois pesos de ovos oriundos de matrizes de mesma idade. Animais que eclodem precocemente e permanecem mais tempo eclodidos dentro do nascedouro parecem ter bom desenvolvimento da mucosa intestinal e uma população de células CD3+ no timo e baço menor que aqueles que eclodem mais tarde. Sugere-se a hipótese de que aves que eclodem mais cedo podem estar aptas ao alojamento antes mesmo da abertura padrão dos nascedouros. Entretanto, maior avaliação deve ser realizada para definir o efeito desse período de espera dentro do nascedouro sobre o desempenho ao longo da vida da ave.

**Palavras-chave:** frangos de corte; janela de nascimento; sistema imunológico; trato gastrointestinal.



## **ABSTRACT**

The broilers development is very important after hatching because several events occur in the physiology of these animals. Breeder age, egg weight and size, management factors and food restriction would affect the immune system and the gastrointestinal tract development of birds. The aim of this study was to review some important aspects of the immune system and gastrointestinal tract of broilers, as well as conduct a study to evaluate the development of both systems in different periods of hatching (hatch window) with two eggs weight from breeders with the same age. Animals that hatch earlier and stay longer periods within the hatchery seems to have a regular intestinal mucosa development and low CD3+ cells in thymus and spleen when compared to those hatched later. It can suggest that birds that hatch earlier may be ready for housing before the hatchery opening time. However, further evaluation should be done to define the effect of this period on bird's performance.

**Key words:** broilers; gastrointestinal tract; hatch window; immune system

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Fotomicrografia de jejuno para mensuração de altura de vilos (A), profundidade de cripta (B) e células caliciformes presentes no vilos (C) (aumento de 20x).....	55
Figura 02. Fotomicrografia de timo (A) e baço (B) para identificação de células CD3+ por imunohistoquímica (aumento de 40x).....	56
Figura 03. Desdobramento da interação entre os períodos de janela de nascimento e pesos de ovos sobre a profundidade de cripta no íleo. A-B: comparação entre os mesmos períodos de janela de nascimento. a-b: comparação dentro de cada peso. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).....	61
Figura 04. Desdobramento da interação entre os períodos de janela de nascimento e pesos de ovos sobre a relação vilos/cripta no íleo. A-B: comparação entre os mesmos períodos de janela de nascimento. a-b: comparação dentro de cada peso. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).....	61
Figura 05. Desdobramento da interação entre os períodos de janela de nascimento e pesos de ovos sobre a contagem de células CD3+ no baço. A-B: comparação entre os mesmos períodos de janela de nascimento. a-b: comparação dentro de cada peso. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).....	65
Figura 06. Alterações macroscópicas severas na superfície da membrana coelínea na moela de aves com 16 h JN.....	66
Figura 07. Porcentagem de alterações macroscópicas (ausente, leve ou severo) na superfície da membrana coelínea de aves com diferentes períodos de janela de nascimento.....	67

Figura 08. Fotomicrografias de membrana coilínea de moela nos diferentes períodos de janela de nascimento. A: +32 h JN, caracterizada por membrana compacta e densa; B: 32 h JN, caracterizada por membrana em formação; C: 16 h JN, caracterizada por membrana pouco desenvolvida e glândulas com alto conteúdo muco protéico (aumento de 40x)..... 67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Grupos experimentais com dois pesos de ovos e três períodos de janela de nascimento ou permanência dentro do nascedouro após eclosão.....	55
Tabela 02. Porcentagem de eclosão nos diferentes períodos de janela de nascimento.....	57
Tabela 03. Peso do trato gastrintestinal e gema (g) de animais submetidos a três períodos de janela de nascimento no período padrão de abertura das máquinas.....	57
Tabela 04. Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ), células caliciformes por vilo e relação vilo/cripta no duodeno em pintos de corte.....	58
Tabela 05. Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ), células caliciformes por vilo e relação vilo/cripta no jejuno em pintos de corte.....	59
Tabela 06. Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ), células caliciformes por vilo e relação vilo/cripta no íleo em pintos de corte.....	60
Tabela 07. Número de células CD3+ por imunohistoquímica em timo (100x), baço (100x), duodeno (40x), jejuno (40x) e íleo (40x) em pintos de corte.....	64
Tabela 08. Espessura da membrana coilínea na moela (20x) em pintos de corte.....	66

## INTRODUÇÃO GERAL

A avicultura industrial moderna caracteriza-se por grandes evoluções em genética, nutrição e manejo. As práticas de manejo adotadas pela indústria avícola apresentam uma série de características que podem, potencialmente, revelarem-se desafios adicionais para o desenvolvimento dos frangos de corte. Dentre eles, destaca-se o aproveitamento de ovos férteis e o manejo do processo de incubação. O desenvolvimento inicial das aves (primeira semana de vida) é de extrema importância, pois vários eventos importantes ocorrem na fisiologia destes animais e sua duração pode ter conseqüências que se manifestarão durante toda a vida.

A primeira semana de idade representa no sistema de criação nacional, aproximadamente 15,5% do período de crescimento de frangos de corte. Entretanto, variações no peso esperado para o abate podem fazer com que este mesmo período chegue a representar até 23,5% de seu período de crescimento. Nessa fase pós eclosão, existe a adaptação do animal passando da alimentação a base de gordura (gema) para alimentação exógena (basicamente carboidratos e proteínas).

Durante a primeira semana de vida, observa-se aumento do ganho de peso do trato gastrintestinal superior ao ganho de peso corporal, aumento da área de absorção (devido ao aumento das vilosidades intestinais e polarização dos enterócitos) e aumento da quantidade e atividade das enzimas digestivas.

Na avicultura industrial, existem variações de períodos de eclosão, porém todos os animais são retirados e processados em tempo padrão, dependendo da empresa, linhagem ou máquina de incubação. Somado a isso, há um intervalo de tempo entre o nascimento e o acesso dos pintinhos ao alimento e à água. Este tempo varia de acordo com as condições e o fluxo de produção de cada incubatório.

A demora no acesso aos nutrientes e à água pode afetar o metabolismo dos pintinhos nas primeiras horas de vida, levando a um quadro de desidratação e cetose imediato, podendo levar a queda de desempenho.

Outros fatores como a linhagem de matriz utilizada, a idade no momento da postura e o tamanho do ovo podem também afetar o desenvolvimento inicial. Ovos oriundos de matrizes jovens ou de ovos menores normalmente estão correlacionados, pois naturalmente aves de matrizes mais jovens produzem ovos menores, sendo que animais produzidos a partir destes ovos apresentam menor ganho de peso durante a fase de crescimento e maior taxa de mortalidade, menores vilosidades intestinais ao nascimento e menor capacidade de metabolismo.

O desenvolvimento do sistema imunológico e gastrintestinal do pintinho ocorre desde os primeiros dias de vida embrionária. Em frangos de corte, os dois sistemas parecem ter uma interação permanente e de extrema importância no desempenho da ave. As superfícies mucosas são as principais áreas de contato do organismo dos animais com os agentes presentes no meio ambiente externo. A fisiologia dos dois sistemas apresenta certas analogias. Ambos deverão ser capazes de reconhecer diferentes moléculas, representadas por partículas de alimentos e agentes patogênicos, reagindo adequadamente a cada situação. Enquanto o sistema gastrintestinal, sobretudo o intestino, deve ser capaz de absorver os nutrientes que permitam o desenvolvimento da ave em níveis compatíveis com sua capacidade genética, o sistema imunológico deverá, ao mesmo tempo, proteger o animal sem espoliá-lo dos recursos que deveriam ser destinados a produção.

Desta forma, se torna extremamente importante o entendimento sobre a imunidade e a qualidade intestinal nas primeiras horas de vida. É vasto o conhecimento do jejum pós eclosão, idade de matriz e qualidade de ovo sobre o

desempenho das aves, porém, pouco se sabe sobre o *status* imunitário e a maturidade do intestino em diferentes períodos de eclosão.

O objetivo desta dissertação foi revisar importantes aspectos sobre o sistema imunológico e gastrintestinal de frangos de corte, bem como realizar um estudo sobre o desenvolvimento de ambos os sistemas em animais com diferentes períodos de eclosão (janela de nascimento) com diferentes pesos de ovos. A condução dos experimentos buscou a máxima aproximação possível com as condições reais de campo, proporcionadas pela rotina de uma grande empresa avícola brasileira.

## DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO EM FRANGOS DE CORTE

*(Broilers immune system development)*

**Ricardo Mitsuo Hayashi**

### RESUMO

A moderna avicultura industrial é resultado de intenso trabalho nas áreas de nutrição, manejo e genética ao longo das últimas décadas. O melhoramento e a seleção de linhagens de frangos de corte permitiram ótimos índices de produtividade resultando em animais com grande capacidade de ganho de peso e conversão alimentar. Entretanto, estas aves também se tornaram extremamente sensíveis aos desafios oferecidos pelo ambiente de criação e menos capazes de formar respostas imunológicas adequadas. As últimas horas de incubação e as primeiras horas de vida pós-eclosão são fundamentais para o amadurecimento do sistema imunológico dos pintinhos e as perdas ocorridas nesta fase terão importantes conseqüências durante todo o período de criação dos frangos de corte. O período de jejum pós eclosão, características da matriz, fatores ambientais que levam ao estresse, dentre outros, podem ocasionar atrasos e perdas de grande relevância no desenvolvimento e capacidade funcional do sistema imunológico. A compreensão dos eventos fisiológicos que ocorrem nesta fase da vida das aves pode auxiliar no estabelecimento de práticas que visem reduzir eventuais impactos negativos sobre o desempenho final destes animais.

**Palavras-chave:** células imunológicas; jejum pós eclosão; resposta imunológica.



## **ABSTRACT**

The modern poultry industry is result of intense research in areas such as nutrition, genetics and husbandry practices done in the last few decades. The improvement and genetics selection of broilers achieved excellent productivity resulted in animals with great capacity of weight gain and feed conversion. However, these birds have also become extremely sensitive to the challenges offered by environment and less capacity to respond immunologically. The last incubation hours and the first post-hatching are critical to immune system maturation and losses at this period would have important consequences in lifecycle of broiler chickens. Delay access to water and food, breeder characteristics, environmental factors, stress and others, could cause losses in the development and functional capacity of the immune system. The understanding of these events can help to prevent negative impacts on broilers' performance at market age.

**Key words:** fasting period; immune cells; immune response.

## **O SISTEMA IMUNOLÓGICO**

O sistema imunológico das aves é responsável pela formação e desencadeamento de mecanismos que visam proteger o organismo destes animais contra as ameaças representadas por qualquer tipo de agente potencialmente nocivo. Exige-se cada vez mais do sistema imunológico das aves, devido à aplicação de um maior número de vacinações para diferentes tipos de doenças, e de condições ambientais que propiciam o estabelecimento do estresse (desde o manejo de incubação, transporte e a adoção de altas densidades de criação, até o manejo das aves nas granjas).

As aves possuem uma série de particularidades em seu sistema imunológico, as quais as diferenciam dos mamíferos, sob o ponto de vista anatômico e funcional. Estas características próprias incluem estruturas especializadas, ligadas à formação e amadurecimento do sistema imunológico e suas células - como o timo e a bolsa cloacal - e estruturas menos complexas, porém responsáveis por níveis mais primários de defesa, como a pele e as penas. BUTCHER e MILES (2003) classificam estes órgãos e estruturas como componentes de resposta imunológica específica ou inespecífica, de acordo com seu modo de atuação. As denominações natural e adquirida ou inata e adaptativa também são utilizadas (WHITANAGE *et al.*, 2004).

O timo e baço, órgãos do sistema imunológico das aves podem ser classificados em primários, são responsáveis pela formação e diferenciação das células deste sistema. Já os órgãos secundários são aqueles responsáveis pela migração ou agrupamento de células, formando sítios de amadurecimento, diferenciação e atuação: Glândula de Harder, baço, tonsilas cecais, Placas de Peyer. Órgãos imunes secundários começam a desenvolver sua capacidade imunológica na eclosão, e serão capazes de responder efetivamente a um desafio apenas aos 10 dias após a eclosão (YUN *et al.*, 2000).

O timo é um órgão plano e lobulado, localizado na região cervical, próximo do nervo vago e da veia jugular. É considerado o local de desenvolvimento e amadurecimento dos linfócitos T. Quando maduros, movem-se do córtex para a medula, entrando na circulação pelos vasos medulares. Também pode apresentar no timo, uma população de linfócitos B que varia de 5 a 10%, dependendo da idade da ave. O timo fica visível no 5º dia de incubação (DI), e aproximadamente no 6º (DI), células-tronco deixam o saco da gema e começam a colonizar essa área. As

primeiras células com marcadores CD3+ aparecem ao 9° (DI), enquanto que  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  (receptores de linfócitos) são detectados no 12° (DI). Entretanto,  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  aparecem no trato gastrointestinal apenas após a eclosão, bem como os marcadores CD4+ e CD8+. (MAST & GODDEERIS, 1999).

A bolsa cloacal é um órgão exclusivo das aves, com características anatômicas e estruturais marcantes (ERF, 2004). Esta estrutura desempenha papel fundamental no processo de amadurecimento e diferenciação dos linfócitos B (papel desempenhado pela medula óssea em mamíferos). É um saco oco localizado dorsalmente a cloaca, onde internamente possui um córtex e medula, com várias dobras maiores e menores, contendo aproximadamente 10 mil folículos (SCOTT, 2004).

Os linfócitos presentes na bolsa cloacal são expostos a antígenos externos pela proximidade da porção final do intestino. Os primeiros elementos da bolsa aparecem no 4° (DI), e recebem células tronco derivados no saco da gema no 7° (DI). Em contrapartida, a resposta humoral se tornará madura apenas uma semana após a incubação. (MAST & GODDEERIS, 1999)

Uma vez maduros, os linfócitos B circulam pelo sistema cardiovascular e outros órgãos linfóides, prontos para encontrar seus antígenos específicos e executar suas funções (RATCLIFFE, 1989). Mesmo enviando os linfócitos B para a periferia, o sistema imunológico mantém a habilidade de responder a antígenos e produzir imunidade humoral normalmente, uma vez que a bolsa cloacal regride por volta de 14 a 20 semanas de idade. (POPE, 1999).

No desenvolvimento embrionário, o baço é o maior local de produção de granulócitos. Em aves maduras, é um órgão de defesa com grande acumulação de linfócitos e macrófagos, importantes para a resposta contra antígenos (POPE, 1999).

O tecido linfóide associado à mucosa (MALT) é encontrado em diversos locais, como no trato gastrointestinal, trato respiratório e na cabeça.

O sistema GALT (tecido linfóide associado ao intestino) das aves é similar ao dos mamíferos, tendo o mesmo papel como sítio de ocorrência de respostas inflamatórias locais (CALDWELL *et al.*, 2004). Seu desenvolvimento ocorre logo nos primeiros dias de vida, paralelamente ao amadurecimento do sistema gastrintestinal do pintinho. Ondas de colonização da mucosa por populações linfocitárias oriundas do timo e bolsa cloacal ocorrem a partir do 4º dia de vida e intermitentemente a partir daí (BAR-SHIRA e FRIEDMAN, 2005). Esse sistema inclui nódulos de agregados linfóides, como tonsilas cecais, Divertículo de Meckel, Placas de Peyer, e a recente descrita, tonsila esofágica (OLAH, 2003). Muitos linfócitos podem ser encontrados na porção intraepitelial e na lâmina própria no TGI. São em grande maioria, linfócitos T, onde possuem um importante papel de reconhecimento e processamento antigênico. (LILLEHOJ e TROUT, 1996).

A tonsila cecal é o maior sítio do GALT, contendo linfócitos B e T. É um local alternativo de diferenciação de células B e possui importante função de produção de anticorpos e mediação celular (LILLEHOJ, 2000).

Placas de Peyer são áreas densas com acúmulo linfóide, localizadas em várias porções do trato gastrointestinal, principalmente na junção ileocecal. Essas placas parecem ser o maior local de produção de IgA frente a organismos patogênicos. Já o Divertículo de Meckel, resquício do ligamento da gema com o intestino delgado, é um tecido linfóide especializado que contém células B e macrófagos (KOGUT, 2000).

Há dois momentos de maturação do tecido linfóide associado ao intestino em frangos, durante a primeira e segunda semana após a eclosão. (BAR-SHIRA *et al.*,

2003). Observa-se transcrição de IL-2, citocina produzida por linfócito T, e IFN $\gamma$  no 4° (DI), bem como aumento de células com o marcador CD3, expresso por linfócitos T ao longo do segmento intestinal. Aves possuem níveis basais de células CD3+ ao nascimento, mas costumam aumentar a partir dos quatro dias de idade.

Migrações de linfócitos T com marcadores  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ , do timo para o tecido linfóide periférico foram estudados por DUNON *et al.*, (1997). BAR-SHIRA *et al.* (2003) citam que o tempo entre o aparecimento de células CD3  $\gamma\delta$  no intestino e o aumento de IL2 e IFN $\gamma$  sugere que as células necessitam de um período de adaptação para responder ativamente contra antígenos presentes no intestino, produzindo citocinas. LOWENTHAL *et al.*, (1994) observaram que linfócitos de aves com 1 dia de idade, aparentemente maduros, são funcionalmente imaturos e adquirem gradativamente a atividade imunitária.

Em aves adultas, a administração de antígenos protéicos por via oral induz a resposta humoral, não apenas verificada por níveis sistêmicos, mas também no intestino, os quais não são observados em aves imunizadas com menos de 10 dias de idade (BAR-SHIRA *et al.*, 2003). Apesar disso, o tecido linfóide associado ao intestino já possui linfócitos B à eclosão, e a quantidade dessas células aumentam a partir do 4° dia até 2 semanas de idade. A capacidade do intestino de desenvolver resposta humoral contra antígenos aumenta a partir desse período. Esse período de baixa resposta imunológica contra antígenos presentes na dieta é importante para o desenvolvimento de tolerância a antígenos, uma vez que aves não devem responder imunologicamente devido a sua dieta normal (JEURISSEN *et al.*, 1994).

O tempo de desenvolvimento da resposta humoral durante os primeiros dias de vida torna a ave muito dependente da imunidade passiva, passada pela matriz. Os anticorpos IgM e IgA do fluido amniótico, correspondente ao colostro em

mamíferos, são ingeridos pelo embrião. (ROSE *et al.*, 1974). Os anticorpos IgG são encontrados no saco da gema e são absorvidos do final da incubação até o período pós eclosão. (KOWALCZYK, 1985). O jejum pós eclosão pode diminuir a absorção de imunoglobulinas pode resultar em imunidade inadequada ou insuficiente (VARGAS *et al.*, 2009).

### **Linfócitos**

Os linfócitos das aves são classificados em células T e B. Estas células são morfológicamente muito semelhantes às dos mamíferos (MORGULIS, 2002).

O papel dos linfócitos é reconhecer e atuar contra agentes agressores internos ou externos. Estão presentes no intestino em número relativamente pequeno ao nascimento, mas este número aumenta após o 4<sup>o</sup> dia de idade, resultado de novas ondas de migração do timo e bolsa cloacal (BAR-SHIRA & FRIEDMAN, 2005).

O mecanismo através do qual os linfócitos efetuam o reconhecimento dos antígenos é diferente entre as células B e T. Enquanto os linfócitos B produzem imunoglobulinas (moléculas expressas em sua superfície, de alta especificidade e capazes de reconhecer agentes antigênicos íntegros), os linfócitos T necessitam de componentes auxiliares para atuar contra agentes agressores, as células apresentadoras de antígenos (APC's). Estas células expressam em sua superfície moléculas denominadas complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Nos mamíferos, as moléculas do MHC são divididas em duas classes: I e II. Nos frangos, estas moléculas são chamadas B-F e B-L. Existe ainda outro tipo de MHC nos frangos, chamado B-G, de função pouco conhecida e sem similares nos mamíferos. Novas técnicas de detecção identificaram a presença deste tipo de molécula e os

genes que as codificam em outras populações celulares além dos linfócitos dos frangos, como trombócitos, células do estroma da bolsa cloacal, timo e tonsilas cecais. Esta descoberta sugere que estas MHC das aves são tão complexas quanto às dos mamíferos (classe I e II), além de desempenharem um papel fundamental na seleção de linfócitos B na bolsa e na capacidade de formação de respostas imunes com maior variabilidade (SALOMONSEN *et al.*, 1991; ZEKARIAS *et al.*, 2002). Os linfócitos T podem ser classificados ainda em outras subpopulações, segundo a função que desempenham dentro do mecanismo de resposta imunológica. Para que sejam capazes de reconhecer os antígenos, estas células expressam em suas membranas alguns receptores moleculares. São estes receptores que possibilitarão a ligação entre os linfócitos T e a combinação formada pelas moléculas do antígeno e as MHC. Esta ligação será o sinal que irá desencadear os eventos da resposta imunológica, com a liberação das citocinas pelos linfócitos. As moléculas dos receptores de linfócitos (TCR) dos frangos são divididas em  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$ . Existem outros tipos de moléculas expressas nas superfícies dos linfócitos, denominadas determinantes celulares (CD). O CD3 é expresso por todos os linfócitos em sua origem, e permanecem durante toda a vida da célula, sendo o antígeno de superfície em comum dos linfócitos T (BARUA e YOSHIMURA, 2004; CHEESEMAN *et al.*, 2004). O CD4 é expresso por linfócitos com funções auxiliares (linfócitos T auxiliares), e tem afinidade por moléculas MHC B-L. O CD8 liga-se a moléculas MHC B-F. As células  $\alpha\beta$  parecem ter ação estimulante sobre a atividade das células  $\gamma\delta$ , através da liberação de IL-2 (MORGULIS, 2002; ZEKARIAS *et al.*, 2002).

Os linfócitos T auxiliares (helpers) são responsáveis pela secreção de citocinas que ativam os mecanismos de defesa executados pelos macrófagos, responsáveis pela eliminação de agentes previamente fagocitados. Têm um

importante papel na imunidade adquirida, tanto em aves quanto em mamíferos. Expressa tipicamente em sua membrana o CD4 (CHEESEMAN *et al.*, 2004). Uma vez ativadas, multiplicam-se e sofrem diferenciação, tornando-se células de memória e células T efectoras (ERF, 2004).

Os linfócitos T citotóxicos expressam tipicamente em sua membrana o marcador CD8 e interagem com o MHC B-F. Mediante reconhecimento deste MHC ligado a epítomos em qualquer célula infectada, causará a lise desta célula. A isto chamamos resposta celular, contra vírus principalmente (CHEESEMAN *et al.*, 2004).

Os linfócitos B produzem os anticorpos, moléculas envolvidas na resposta imunológica humoral que atuam impedindo a invasão das células por antígenos externos ou internos. Nas aves, são produzidos no fígado do embrião, no saco vitelínico e na medula óssea na fase inicial da incubação. Em seguida, migram para um órgão exclusivo do sistema imunológico das aves – a bolsa cloacal - onde sofrem amadurecimento e diferenciação por até dez semanas. Logo, partem para colonizar outros órgãos, como o baço e a glândula de Harder (BUTCHER e MILES, 2003). Na bolsa cloacal ocorre um fenômeno denominado conversão gênica, o qual permite aos linfócitos B produzirem uma gama mais variada de anticorpos, expressos em sua superfície. Nos mamíferos, a variabilidade na produção de imunoglobulinas é determinada por modificação dos genes das células precursoras dos linfócitos B na medula óssea (MEHR *et al.*, 2004).

### **Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas são moléculas de natureza protéica, possuem alta especificidade e são divididas em três diferentes tipos: IgA, IgM e IgG. A IgG das aves possui maior peso molecular que seu correspondente em mamíferos e possui



algumas características próprias. Durante algum tempo foi chamada IgY, sendo considerada a molécula precursora das IgG's e IgE's dos mamíferos (MORGULIS, 2002). O volume de IgG obtida de um único ovo é muito maior do que aquele possível de ser obtido do soro de coelhos ou outras cobaias em uma semana de colheitas (CHUI *et al.*, 2004).

As imunoglobulinas surgem em média 4 a 5 dias após a exposição do sistema imunológico ao antígeno. Sua duração no organismo é variável, sendo mais fugaz para as IgM's (cerca de 10 a 12 dias) e mais persistente para as IgG's (de 20 a 25 dias). As IgA's são responsáveis pela imunidade "local", estando presente nas mucosas e secreções. As IgG's são as imunoglobulinas mais importantes para o sistema imunológico e para a monitoria de seu "status", já que a maioria dos testes laboratoriais busca quantificar esta classe de moléculas (BUTCHER & MILES, 2003).

Segundo Morgulis (2002), a conversão gênica, que ocorre na bolsa cloacal, torna os linfócitos B das aves capazes de produzir uma grande variedade de anticorpos. De outra forma, somente algumas poucas variações poderiam ser efetivadas (uma vez "sensibilizada" por um determinado antígeno, uma célula B é capaz de produzir anticorpos específicos para este antígeno, bem como todas as células que sua divisão vier a gerar).

Para atuar, os anticorpos unem-se diretamente à molécula de antígeno para a qual possuem a informação, ou desencadeiam a atividade do sistema complemento, induzindo a formação de grandes aglomerados moleculares não solúveis. As células fagocitárias possuem sítios receptores específicos para a porção constante das imunoglobulinas. Unem-se a estes sítios para facilitar a destruição de antígenos já identificados e "imobilizados" pela ligação com as porções variáveis da estrutura dos anticorpos.

O sistema complemento é composto por proteínas complexas, produzidas no fígado e presentes no plasma. Podem ser ativadas através de duas vias: a via clássica e a alternativa. Uma vez ativadas, exercem seu papel dentro do sistema imunológico desencadeando reações de natureza enzimática, que geram outras substâncias importantes para a formação da resposta imunológica. Na via clássica, a ativação das proteínas do sistema complemento se dá pela ligação de uma proteína denominada C1 do complemento com a porção exposta da imunoglobulina já aderida a um antígeno. A via alternativa ocorre sem que haja a necessidade da formação do complexo antígeno-anticorpo. Existem moléculas presentes na resposta imunológica que são capazes de ligar-se ao complemento por si mesmas, ativando seqüência de eventos equivalentes (MORGULIS, 2002).

### **Resposta imunológica**

É a capacidade do organismo em reagir a agentes estranhos (KOUTSOS e KLASING, 2001). Vários fatores podem influenciar a resposta imunológica, incluindo as variações genéticas de isolados distintos de uma mesma espécie de patógeno e da genética da própria ave (MORRIS *et al.*, 2004). Para o seu desencadeamento, o organismo das aves conta com uma série de componentes celulares e não celulares, os quais, por sua vez, são capazes de produzir um número muito grande de substâncias responsáveis pelas mais diversas funções.

A resposta imunológica pode ser classificada em primária e secundária, cada qual com suas características próprias. Assim, a resposta do tipo primária apresenta baixa especificidade, capacidade limitada de modos de ação e baixo desenvolvimento de memória, enquanto a resposta do tipo secundária age de maneira inversa, complementando a anterior (MORGULIS, 2002; BUTCHER e

MILES, 2003). A resposta do tipo primária envolve a participação de componentes celulares (fagócitos e células NK), barreiras físicas (pele, muco) e proteínas (sistema complemento). A resposta secundária envolve linfócitos e atuação de anticorpos.

De acordo com os mecanismos envolvidos a resposta imunológica pode ser classificada ainda em celular (mediada por células) e humoral (mediada por imunoglobulinas). A resposta imunológica celular tem papel vital como primeira linha de defesa contra os microorganismos agressores, mas também exerce ação fundamental no desenvolvimento da resposta secundária ou humoral (apresentação de antígenos pelos macrófagos, liberação de citocinas para ativação de linfócitos B e outras).

Embora a resposta imunológica humoral envolva vários componentes do sistema imunológico do animal, é possível que ocorra de modo passivo, através da ação de imunoglobulinas ou mesmo de linfócitos B originários de outro organismo, como no caso da imunidade materna, em que os anticorpos da mãe promovem a proteção da progênie por um determinado tempo (MORGULIS, 2002).

## **FATORES QUE INTERFEREM NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO**

### **Jejum pós eclosão**

Na avicultura moderna, existe um intervalo entre o nascimento e o primeiro acesso à água e alimento, chamado de jejum pós eclosão. Este lapso de tempo é muito variável entre as empresas, dependendo de fatores como o manejo implantado no incubatório, o manuseio aplicado aos pintinhos (seleção, sexagem, vacinações), as condições de transporte e a distância até as granjas (DIBNER *et al.*,

1998). Este intervalo coincide justamente com o momento em que vários eventos importantes ocorrerão no organismo destes animais e sua duração pode ter conseqüências que se manifestarão durante toda a vida das aves.

O desenvolvimento do sistema imunológico e sistema gastrointestinal do pintinho ocorrem desde os primeiros dias de vida embrionária. De fato, em frangos de corte, os dois sistemas parecem ter uma interação permanente e de extrema importância para o desempenho produtivo destas aves.

As superfícies mucosas são as principais áreas de contato do organismo dos animais com os agentes presentes no meio ambiente externo. A presença do alimento no intestino favorece a maturação e diferenciação dos enterócitos, acelerando sua capacidade de digestão e absorção, ao mesmo tempo em que, pela flora bacteriana presente em seu conteúdo estimula a migração e a diferenciação de células dos órgãos primários do sistema imunológico para os sítios linfocitários presentes no trato gastrointestinal (GALT). (BAR-SHIRA & FRIEDMAN, 2005).

Enquanto a resposta imunológica celular é inata e pode ser estimulada pela presença do alimento no intestino, a resposta humoral nos primeiros dias de vida depende principalmente da absorção das imunoglobulinas maternas depositadas no ovo e absorvidas pelo pintinho no final do período de incubação e início da vida pós-eclosão. DIBNER *et al.* (1998) constataram que o conteúdo da gema não possui valor nutricional significativo para o pintinho em seus primeiros dias de vida, sendo, no entanto, fonte importante de compostos mais nobres, que devem ser utilizados de outra maneira (fosfolipídios e imunoglobulinas) (MAIORKA *et al.*, 2006). Portanto, a composição quantitativa e qualitativa do ovo e a demora no acesso ao alimento exógeno após o nascimento poderiam ser capazes de interferir no desempenho final e na capacidade imunológica dos frangos de corte.

O trabalho de NATHAN *et al.* (1977) demonstrou que períodos de jejum de 24 e 48 horas pós-eclosão foram capazes de reduzir a capacidade das aves em responder a estímulos feitos com a administração de bacterina inativada contra *E. coli* e hemácias de carneiro (SRBC), em avaliações através de testes de hemaglutinação indireta e soroaglutinação, respectivamente. As aves que não tiveram acesso ao alimento e à água apresentaram ainda marcante perda de peso corporal e menor peso de órgãos do sistema imunológico, como a bolsa cloacal e timo, além de menor contagem de leucócitos no sangue.

FRIEDMAN *et al.* (2003) afirmam que o jejum pós-eclosão pode, além de comprometer o desenvolvimento do trato digestivo, retardar o amadurecimento do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). Aqueles autores citam que, embora existam ainda muitas questões a serem elucidadas a respeito da ontogenia e modo de ação deste tecido, sua importância para as aves na fase inicial de sua vida é indiscutível. O acesso ao alimento no mais curto período de tempo possível garante maior tolerância aos antígenos, melhor capacidade de resposta imunológica e melhor desenvolvimento do trato digestivo.

VARGAS *et al.*, (2009) apresentaram que os títulos séricos de anticorpos contra a vacina de doença de Newcastle (NDV) foram mais baixos em pintinhos submetidos a 12 horas de jejum pós eclosão quando comparados aqueles que consumiram água e alimento logo após a eclosão. Estes dados claramente mostram que o atraso no consumo de alimento dos animais pode diminuir a absorção da gema e conseqüentemente a passagem da imunidade passiva da mãe para o pintinho. Semelhante a esses resultados, NNADI *et al.* (2010), observaram que aves com jejum de 72 h apresentaram menor titulação de anticorpos para NDV, porém,

sem diferenças em desenvolvimento e função de órgãos do sistema imunológico comparadas a aves alimentadas.

### **Estresse**

Estresses ambientais são comuns durante todo o ciclo de vida da ave e influencia diretamente o sistema imunológico, predispondo a doenças. O conceito de estresse, definido por DOHMS e METZ (1991), como uma resposta adaptativa contra ameaças à homeostase animal. Pode ocorrer por estímulos internos (psíquicos, fisiológicos) ou externos (ambiente). Alguns fatores de estresse podem afetar o sistema imunológico diretamente, como temperaturas inadequadas na incubadora, sala de processamento ou transporte, luz (ultravioleta, por exemplo), qualidade do ar (amônia, formaldeído), agentes infecciosos e contaminantes ambientais. (DIETERT *et al.*, 1994).

A exposição das aves a temperaturas extremas pode causar grande impacto na resposta imunológica das aves, na qual o calor ou frio em excesso, geralmente tem efeito imunossupressor, principalmente na hipersensibilidade basófila cutânea, proliferação linfocitária e alguns efeitos na resposta humoral. (REGNIER e KELLEY, 1981). O mecanismo pelo qual o calor modula a imunidade é em parte devido a indução de proteínas do choque térmico sobre linfócitos, heterófilos e macrófagos (DIETERT *et al.*, 1994), enquanto o estresse causado pelo frio suprime a concentração plasmática de corticosterona e aumenta níveis dos hormônios da tireóide. (HANGALAPURA *et al.*, 2004). SANTIN *et al.*, (2003) mostraram que animais submetidos a diferentes variações de temperaturas durante a incubação e na primeira semana de vida (alojamento) não apresentaram diferenças de títulos vacinais contra a Doença de Newcastle (NDV) e Doença de Gumboro (IBDV).

A corticosterona liberada pode levar a atrofia do tecido linfóide no timo, bolsa cloacal, baço, bem como supressão de resposta humoral e celular. (EDENS *et al.*, 1983). Em altas concentrações, corticosterona pode atrofiar o timo e bolsa cloacal por apoptose. (ROGAUSCH *et al.*, 1999).

### **Matrizes**

A idade da matriz pode afetar a composição, o tamanho, a taxa de eclosão e o peso dos ovos e dos pintinhos ao nascimento. Matrizes mais velhas produzem ovos maiores, mais pesados e com maior peso relativo de gemas. O peso dos pintinhos nas duas primeiras semanas de vida é menor em lotes nascidos de ovos de matrizes mais jovens (TONA *et al.*, 2004).

Entre os fatores que podem afetar parâmetros fisiológicos e de produção destes animais estão a nutrição recebida pela mãe, o que influencia o tamanho e a composição dos ovos, fatores ambientais, qualidade dos ovos relacionada ao tempo e às condições de estocagem (BRAKE, 1995).

GRINDSTAFF *et al.* (2005), trabalhando com codornas (*Coturnix japonica*), constataram que uma dieta mais pobre em proteínas provocou a redução do tamanho e do número dos ovos em um dado período de tempo, mas não foi capaz de reduzir o nível de transferência de imunoglobulinas G (IgG) aos ovos.

GROOTHUIS *et al.* (2006), trabalhando com ovos de aves marinhas (*Larus ridibundus*), observaram que fatores ambientais, como a densidade da colônia, ou maior nível de infestação por parasitas, também podem afetar a composição dos ovos, incluindo a concentração de imunoglobulinas, testosterona e antioxidantes. Outros fatores, como a ordem de oviposição e o peso corporal das fêmeas também podem alterar alguns destes parâmetros. Entretanto, os autores não encontraram

relação entre o peso das fêmeas e a concentração de IgG na gema dos ovos ao longo de uma seqüência de postura.

## **CONCLUSÃO**

Conhecer o funcionamento e o desenvolvimento do sistema imunológico dos animais é fundamental para manter o homeostase durante o maior tempo de vida possível. Sabe-se que em condições de repouso o sistema imunológico utiliza muito pouco os recursos orgânicos, porém uma vez ativado, desvia muito destes recursos e desta forma interfere com a produtividade dos animais. Entender como a ave se desenvolve e responde imunologicamente a certos fatores no final da incubação e após a eclosão é fundamental para para que se possa estabelecer alguns padrões de manejo e práticas que visem à proteção destes animais.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAR-SHIRA, E. and FRIEDMAN, A. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v.60(2), p.42-50, 2005.
- BAR-SHIRA, E. *et al.* Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Developmental and Comparative Immunology*, v.27, p.147-157, 2003.
- BARUA, A., YOSHIMURA, Y. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). *Poultry Science*, v.83, p.997-1002, 2004.
- BRAKE, J. T. Pontos importantes de manejo no incubatório para uma boa eclosão. In: CONFERÊNCIA APINCO'95 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. Anais. Curitiba: FACTA, 1995. p.33-50.
- BUTCHER, G.D., MILES, R.D. Avian immune system. *Veterinary Medicine – Large Animals Clinical Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*. VM74, 2003.
- CALDWELL, D.J., DANFORTH, H.D., MORRIS, B.C., AMEISS, K.A. and MCELROY, A.P. Participation of the intestinal epithelium and mast cells in local mucosal immune responses in commercial poultry. *Poultry Science*, v.83, p.591-599, 2004.
- CHEESEMAN, J.H., KAISER, M.G., LAMONT, S.J. Genetic line effect on peripheral blood leukocyte cell surface marker expression in chickens. *Poultry Science*, v.83, p.911-916, 2004.
- CHUI, L.W., KING, R., CHOW, E.Y.W., SIM, J. Immunological response to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in chickens. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.68, p.302-308, 2004.
- DIBNER, J.J. KNIGHT, C.D., KITCHEL, M.L., ATWELL, C.A., DOWNS, A.C., IVEY, F.J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *Journal of Applied Poultry and Research*, v.7, p.425-436, 1998.
- DIETERT, R.R., GOLEMBOSKI, K.A. AND AUSTIC, R.E. Environment-immune interactions. *Poultry Science*, v.73, p.1062-1076, 1994.
- DOHMS, J.E. and METZ, A. Stress – mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v 30, p.89-109, 1991.
- DUNON, D. *et al.* Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *Journal Experimental Medicine*, v.186, p.977-988, 1997.
- EDENS, F. W. *et al.* Grouping in japanese quail. Supression and humoral immunity. *Poultry Science*, v.62, p.2479-2485, 1983.

- ERF, G.F. Cell-mediated immunity in poultry. *Poultry Science*, v.83, p.580-590, 2004.
- FRIEDMAN, A., BAR-SHIRA, E. and SKLAN, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World's Poultry Science Journal*, v.59, p.209-219, 2003.
- GRINDSTAFF, J.L., DEMAS, G.E. and KETTERSON, E.D. Diet quality affects egg size and number but does not reduce maternal antibody transmission in Japanese quail *Coturnix japonica*. *Journal of Animal Ecology*, v.74, p.1051-1058, 2005.
- GROOTHUIS, T.G.G., EISING, C.M., BLOUNT, J.D., SURAI, P., APANIUS, V. DIJKSTRA, C. & MÜLLER, W. Multiple pathways of maternal effects in black-headed gulls eggs: constrain and adaptative compensatory adjustment. *Journal Compilation*, v.23, p.23-27, 2006.
- HANGALAPURA, B.N., NIEUWLAND, M.G., BUYSE, J., KEMP, B. AND PARMENTIER, H.K.. Effect of duration of cold stress on plasma adrenal and thyroid hormone levels and immune responses in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science*, v. 83, p.1644–1669, 2004.
- JEURISSEN, S. H. M. *et al.* Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poultry Science Review*, v.5, p.183-207, 1994.
- KOGUT, M. H. Cytokines and prevention of infectious disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, v.29, p.395-404, 2000.
- KOUTSOS, E.A., KLASING, K.C. Interactions between the immune system, nutrition and productivity of animals. In *Recent Advances in Animal Nutrition 2001*, Nottingham University Press, p.173-190, 2001.
- KOWALCZYK, K. *et al.* Quantification of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology*, v.54, p.755-768, 1985.
- LILLEHOJ, H. S. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases*, v.44, p.408-425, 2000.
- LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical Microbiological Review*, v.9, p.349-360, 1996.
- LOWENTHAL, J. W. *et al.* Development of the T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunology and Cell Biology*, v.72, p.115-122, 1994.
- MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M.S.F.A. Adaptações pós-eclosão em frangos. *Ciência Rural*. v.36(2), p.701-708, 2006.
- MAST, J.; GODDEERIS, B.M. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.70, p.245-256, 1999.
- MEHR, R., EDELMAN, H., SEHGAL, D. and MAGE, R. Analysis of mutational lineage trees from sites of primary and secondary ig gene diversification in rabbits and chickens. *Journal of Immunology*, v.172, p.4790-4796, 2004.

MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: Macari, M. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. cap. 18, p.231-245, 2002.

MORRIS, B.C. Danfort, H.D., Caldwell, D.J., Pierson, F.W. and McElroy, A.P. Intestinal mucosal mast cell immune response and pathogenesis of two *Eimeria acervulina* isolates in broiler chickens. Poultry Science, v.83, p.1667-1674, 2004.

NATHAN, D.B., HELLER, E.D. and PEREK, M. The effect of starvation on antibody production of chicks. Poultry Science, v.56, p.1468-1471, 1977.

NNADI, P.A.; EZE, P.C.;EZEMA, W.S. Influence of delayed feeding on the performance, development and response of immune system to newcastle disease vaccination in chickens. International Journal of Poultry Science, p.669-674, 2010

OLAH, I.; NAGY, N.; MAGYAR, A.; PALYA, V. Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. Poultry Science, v.82, p. 767-770, 2003.

POPE, C.R. Lymphoid system. In: Avian histopathology, 2<sup>nd</sup>Ed. C. Riddel, Ed. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA. pp 18-34.

RATCLIFFE, M. J. H. Development of the avian B-lymphocyte lineage. Critical Reviews of Poultry Biology, v.2, p.207-234, 1989.

REGNIER, J.A. AND KELLEY, K.W. Heat- and cold-stress suppresses *in vivo* and *in vitro* cellular immune responses of chickens. American Journal of Veterinary Research, v. 42, p. 294–299, 1981.

ROGAUSCH, H. *et al* Norepinefrine stimulates lymphoid cell mobilization from the perfused rat spleen via-b-adrenergic receptors. American Journal of Physiology, v.276, p. R724-R730, 1999.

ROSE, M. E. *et al*. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. European Journal Immunology, v.4, p.521-523, 1974.

SALOMONSEN, J., DUNON, D., SKJODT, K., TORPE, D., VAINIO, O. AND KAUFMAN, J. Chicken major histocompatibility complex-encoded B-G antigens are found on many cell types that are important for the immune system. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 88, p.1359-1363, 1991.

SANTN, E.; MAIORKA, A.; POLVEIRO, W. J. C.; PAULILLO, A. C.; LAURENTIZ, A. C.; BORGES, S. A.; FISCHER DA SILVA, A. V. Effect of environmental temperature on immune response of broilers. Journal of Applied Poultry Research, v.12, p.247-250, 2003.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity in poultry. Poultry Science. v.83, p.574-579, 2004.

TONA, K., ONAGBESAN, O., DE KETELAERE, B., DECUYPERE, E. and BRUGGEMAN, V. Effects of age of broiler breeders and egg storage on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight and chick post-hatch growth to forty-two days. Journal of Applied Poultry Research, v.13, p.10-18. 2004.

VARGAS, F., BARATTO, T., BONA, T., MAIORKA, A., & SANTIN, E. 2010 Apr 15. Two different breeder ages and two periods of post-hatching fasting on immunity of broilers. Archives of veterinary science [Online] 14:3. Disponível: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/15358>

WITHANAGE, G.S.K., KAISER, P., WIGLEY, P., POWERS, C., MASTROENI, P., BROOKS, H., BARROW, P., SMITH, A., MASKELL, D. and MCCONNELL, I.. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Infection and Immunity, v.72, p.2152-2159, 2004.

YUN, C.H. Intestinal immune responses to coccidiosis. Developmental and Comparative Immunology, v.24, p.303-324, 2000.

ZEKARIAS, B., TER HUURNE, A.A.H.M., LANDMAN, W.J.M., REBEL, J.M.J., POL, J.M.A., and GRUYS, E. Immunological basis of difference in disease resistance in the chicken. Veterinary Research, v. 33, p. 109-125, 2002.

## DESENVOLVIMENTO DO TRATO GASTRINTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE

### *(Broilers gastrointestinal tract development)*

Ricardo Mitsuo Hayashi

#### Resumo

Nas aves, o período de transição de embrião para o estágio pós eclosão é crítico para o desenvolvimento de todos os sistemas, o que torna imprescindível a utilização de formas de manejo que possam melhorar e evitar queda no desempenho durante todo o ciclo de vida. Desde embrião, o desenvolvimento funcional desse sistema envolve produção de secreções digestivas, crescimento e desenvolvimento celular da mucosa intestinal (enterócitos, caliciformes, enteroendócrinas) constituindo os vilos, bem como o desenvolvimento do sistema imunológico integrado ao intestino. Alguns fatores podem interferir no desenvolvimento dessas células, como o atraso no acesso ao alimento e água. . A compreensão dos eventos fisiológicos que ocorrem nesta fase da vida das aves pode auxiliar no estabelecimento de práticas que visem reduzir eventuais impactos negativos sobre o desempenho final destes animais.

**Palavras-chave:** eclosão; jejum pós eclosão; mucosa intestinal

#### ABSTRACT

In broilers, the transition from embryo to the stage after hatching is critical for the development of all systems, which is essential to improve and prevent decline in performance. Since embryo stage, the functional development of this system involves production of digestive secretions, development of the intestinal mucosa (enterocytes, goblet cells and enteroendocrine) constituting villi and microvilli, as well

as the gut associated lymphoid tissue. Some factors may affect the development of these cells, such as delays in access to food and water. The understanding of these events can help to prevent negative impacts on broilers' performance at market age.

**Key words:** fast; hatch; intestinal mucosa

## INTRODUÇÃO

Nas aves, o período de transição de embrião para o estágio pós eclosão é crítico para o desenvolvimento de todos os sistemas, pois é nesse período que ocorre a formação e desenvolvimento celular em larga escala da mucosa intestinal (enterócitos, caliciformes, enteroendócrinas), produção de algumas enzimas, crescimento da microbiota intestinal, e adaptação para dieta exógena

Durante o desenvolvimento embrionário, os nutrientes são supridos pelo ovo e, após a eclosão, esses animais iniciam a utilização de nutrientes procedentes de dietas relativamente complexas. Essa mudança de forma de alimentação exige um período de adaptação celular e enzimática no trato gastrintestinal da ave. A primeira semana de vida da ave tem grande importância no processo de maturação, no qual o tamanho relativo do intestino e a produção enzimática são otimizados.

Para que esse sistema possa processar as dietas da melhor maneira possível durante toda a vida da ave, a mucosa intestinal deve apresentar características estruturais morfofisiológicas adequadas. Os processos de absorção são dependentes de mecanismos de transporte que ocorrem na membrana das células epiteliais da mucosa, sendo dessa forma, a integridade destas de vital importância, já que é a via de entrada dos nutrientes para o desenvolvimento da ave.

Compreender como se inicia o desenvolvimento do sistema gastrintestinal das aves, seus componentes e quais os fatores que o afetam se tornam fundamentais

para manter a qualidade intestinal e um bom desempenho, garantindo retorno econômico da atividade avícola.

### **Absorção da gema**

A eclosão dos pintinhos determina uma mudança no processo de obtenção de nutrientes dos animais. Durante a incubação, a obtenção de energia e nutrientes é feito através da gema, um alimento rico em lipídios, mas pobre em proteínas e carboidratos.

A composição média de um ovo fértil é de 58,5% de albúmen, 31% de gema, 10,5% de casca e anexos e uma pequena fração de carboidratos (VIEIRA e MORAN, 1999). Os teores relativos na proporção de água e proteína, bem como os níveis totais de lipídios, tendem a aumentar nos ovos de matrizes mais velhas (MAIORKA, 2002). O albúmen de ovos de fêmeas mais jovens possui maior densidade, o que é atribuído por BRAKE (1995) a dietas com uma concentração de proteínas usualmente mais alta na fase inicial do período de postura. Segundo este autor, um albúmen mais denso seria responsável por desenvolvimento mais lento do embrião, por dificultar a difusão do oxigênio, o qual é utilizado na obtenção de energia a partir de lipídios.

Durante o período de desenvolvimento embrionário até a eclosão os lipídios da gema são diretamente transportados para a circulação por endocitose (SKLAN, 2005). Após a eclosão, a absorção do conteúdo da gema pode ser feito tanto pela membrana do saco vitelínico quanto pelo divertículo de Meckel, sendo digerido e absorvido pelo trato intestinal. NOY e SKLAN (2001) observaram que a passagem do conteúdo da gema para o trato intestinal é maior quando o animal recebe alimentação do que quando se mantém em jejum. Os mesmos autores afirmam que

essa diferença ocorre devido à presença física do alimento, aos movimentos peristálticos do trato intestinal e/ou devido a uma pressão negativa com a cavidade abdominal, estimulando assim a passagem do conteúdo via intestinal. Uma vez na cavidade intestinal, os movimentos antiperistálticos do intestino fazem com que este conteúdo retorne as porções anteriores do trato intestinal. Entretanto, alguns autores consideram que o acesso ao alimento exógeno pode retardar a absorção da gema (MAIORKA, 2002).

Apesar de, no momento da eclosão o pintinho já estar apto a consumir alimentos, seu trato intestinal ainda não está maduro e plenamente desenvolvido. O trato gastrintestinal, apesar de estar anatomicamente completo no final do período de incubação, sofre sensíveis alterações morfo e fisiológicas, que preparam a ave para o consumo e utilização de alimentos (MAIORKA, 2002).

### **Desenvolvimento intestinal no período final de incubação e pós eclosão**

Durante os últimos dias de incubação, o trato gastrintestinal é um dos órgãos que mais cresce de tamanho e proporção, compondo cerca de 1% do peso do embrião aos 18 dias de incubação para 3,5% no momento da eclosão (UNI *et al.*, 2003). O aumento do peso intestinal pode ser descrito pelo desenvolvimento dos vilos. Segundo os mesmos autores, aos 15 dias de incubação observam-se apenas vilos rudimentares. Aos 17 dias de incubação, é possível observar um grupo de vilos maiores e em formato de peras (V1) e um grupo de vilos pequenos e afilados (V2); durante os 18 e 19 dias de incubação estes vilos crescem de tamanho; aos 20 dias formam-se outro grupo de vilos menores (V3) e ao momento da eclosão, os vilos do grupo V1 e V2 dobram de tamanho, enquanto os vilos do grupo V3 aumentam cerca de 50% de tamanho. Esse crescimento rápido na fase final de incubação pode estar



relacionado à ingestão do líquido amniótico que ocorre no décimo nono dia de incubação.

Além do aumento das vilosidades intestinais, no final do período de incubação é possível observar aumento da atividade de enzimas da borda em escova. UNI *et al.*, (2003) descreveram um aumento da atividade das enzimas sucrase-isomaltase e aminopeptidase e dos transportadores Na<sup>+</sup>K ATPase e Na-Glicose transportador – 1 entre os 19 e 21 dias de incubação. Após a eclosão, mantém-se o rápido desenvolvimento do trato gastrintestinal.

Os enterócitos que apresentam núcleo centralizado e sem formação de borda em escova no momento da eclosão ganham polaridade, aumentam de tamanho, porém não de espessura, e passam a mostrar a borda em escova após 24 horas (GEYRA, UNI e SKLAN, 2001a). As vilosidades intestinais também continuam aumentando de tamanho e de volume até atingirem um platô entre 5 e 10 dias de idade, dependendo da região do intestino (duodeno, jejuno ou íleo). (UNI *et al.*, 2000a). GEYRA, UNI e SKLAN (2001a) descrevem que nas primeiras 24 horas após a eclosão, os enterócitos adquirem polaridade e uma membrana em borda em escova. O segundo período envolve a hipertrofia, que é expressa basicamente por aumento no tamanho das células. No duodeno e jejuno esse processo de diferenciação é separado. A hipertrofia do jejuno ocorre entre 72 e 144 horas pós-eclosão enquanto no duodeno esse processo se estende até às 216 horas. Pequena hipertrofia foi observada no íleo.

As criptas, que no momento da eclosão apresentam-se pequenas e com poucas células se invaginam rapidamente, aumentam o número de células e aumentam a proporção em relação ao número de vilos (UNI *et al.*, 2000a), Esse

aumento no número e volume de criptas seria responsável pela formação de enterócitos necessários para o crescimento das vilosidades.

Segundo UNI, NOY e SKLAN (1999), em perus, o aumento de peso do intestino após a eclosão é superior ao aumento do tamanho deste órgão. Esse aumento de peso seria então relacionado não apenas ao crescimento dos órgãos em extensão, mas também ao crescimento local dos órgãos, através do crescimento das vilosidades e das criptas intestinais conforme descritos acima. Animais recém-eclodidos apresentam praticamente todas as células da cripta e do vilos com caráter proliferativo (GEYRA, UNI e SKLAN, 2001a).

Durante a migração dos enterócitos das criptas até o ápice das vilosidades estas adquirem funções diferenciadas para a digestão dos alimentos, inclusive a expressão de enzimas (UNI, GANOT e SKLAN, 1998). UNI, NOY e SKLAN (1999) em perus, observaram correlações positivas entre a atividade enzimática (por grama de mucosa) e o número de enterócitos por vilosidade e o peso vivo do animal.

Segundo MANEEWAN e YAMAUCHI (2005), os vilos mais longos estão presentes em frangos com maior atividade de amilase no conteúdo intestinal. PLUSKE *et al.* (1996) observaram uma correlação negativa entre a absorção de glicose e profundidade de cripta. Segundo estes autores, essa correlação negativa se explica quando uma maior profundidade de criptas está relacionada a uma maior produção de enterócitos, maior quantidade de enterócitos imaturos na vilosidade e conseqüentemente, uma menor produção de enzimas.

A produção de enzimas mantém a curva ascendente observada nos dois últimos dias anteriores a eclosão. UNI *et al.* (1998), em frangos, observaram um aumento na produção de sucrase, maltase e aminopeptidase de 2 a 4 dias após a eclosão.

### **Influência da janela de nascimento e jejum pós eclosão sobre o desenvolvimento intestinal**

Apesar de pintinhos, ao nascimento, apresentarem uma reserva energética no saco vitelínico, essa reserva não é suficiente para suprir a necessidade energética de manutenção dos animais nem mesmo durante o primeiro dia de vida (DIBNER *et al.*, 1998). Além disso, o conteúdo do saco vitelínico é composto de nutrientes como fosfolipídios, colesterol e imunoglobulinas que seriam mais úteis ao desenvolvimento animal se absorvidas e utilizadas como tal, e não como fonte de energia. Desta forma, o fornecimento de uma fonte de nutrientes exógeno o mais cedo possível serviria como uma forma de “economizar” essa fonte de nutrientes presentes na gema.

A influência do jejum pode começar até mesmo antes da retirada dos pintos do nascedouro do lote de pintinhos eclodir. Comercialmente, um lote de pintinhos somente é retirado do nascedouro quando a maioria estiver eclodida. Esse intervalo entre o início e o final da eclosão dos pintinhos forma-se a janela de nascimento. Desta forma, fatores como uniformidade de peso dos ovos, estocagem, capacidade de difusão de oxigênio pela casca, linhagem, sexo, entre outros, podem influenciar no período de eclosão dentro do nascedouro. Segundo CAREGHI *et al.* (2005) a perda de peso durante este período é de aproximadamente 0,18g/hora de jejum. Ainda segundo o mesmo autor, ao contrário do que se poderia imaginar, essa demora no fornecimento de alimento aos animais é mais prejudicial para pintinhos que eclodem mais tarde do que para pintinhos que eclodem no início da janela de nascimento, tanto considerando a idade cronológica (horário do saque da máquina) como a idade biológica (horário real de nascimento) uma vez que o aumento no período de estocagem atrasa a eclosão dos animais. Segundo CHISTENSEN *et al.*

(2001) a estocagem de ovos antes do início da incubação prolonga o platô de consumo de oxigênio pelo embrião, fazendo com que aumente o período de hipóxia e a necessidade de prover energia através do metabolismo anaeróbico, período esse em que ocorre a bicagem do ovo. Esse aumento do período de hipóxia faz com que se reduza a quantidade de glicogênio cardíaco, muscular e hepático durante o período de pré bicagem e a eclosão. Desta forma, a habilidade de produzir e metabolizar carboidratos é crucial para a sobrevivência do embrião (CHISTENSEN *et al.*, 2001).

O atraso a alimentação pode causar danos a algumas células da mucosa intestinal, como as caliciformes, responsáveis pela secreção glicoprotéica com função protetora, transportadora e seletiva. Quanto maior o jejum, menor o número de enterócitos e aumento na densidade de células caliciformes produzindo e secretando mucina ácida e neutra para a superfície dos vilos do jejuno e íleo (GEYRA, UNI e SKLAN, 2001b)

Eventos fisiológicos como o jejum, estresse, hipóxia, radiação, oxidações entre outros, podem levar a morte celular programada, denominada apoptose. Pode ser uma resposta genética programada, mas pode ser minimizado ou acentuado por diferentes fatores. Segundo MAIORKA *et al.* (2001), jejum hídrico e/ou de ração após a eclosão, ocorre aumento na densidade de vilos intestinais de pintos machos. Em casos de jejum prolongado, as células epiteliais passam a apresentar grandes vacúolos autofágicos lisossomais, caracterizando morte celular, com aumento da taxa de extrusão e conseqüente redução na altura dos vilos (YAMAUCHI *et al.*, 1996)

GEYRA, UNI e SKLAN (2001), observaram que o jejum entre 0 e 48 horas após eclosão acarretou diminuição na profundidade de criptas no duodeno e jejuno,

o número de criptas por vilos, a área dos vilos e a taxa de migração de enterócitos, além de acarretar uma redução no peso entre 48 e 144 horas após eclosão. GONZALES *et al.* (2003) observaram redução no tamanho de vilosidades e peso de intestino às 18 e 36 horas em aves mantidas em jejum durante 18 horas após o alojamento. Entretanto, não observaram variação nos níveis de linfócitos B e na relação entre heterófilos e linfócitos aos 21 e 42 dias de idade, caracterizando que os animais em questão não estavam em estresse após o jejum e a realimentação.

Durante a fase de alimentação após jejum, a recuperação histológica parece ser induzida pela absorção enteral de nutrientes. Ao realimentar animais com nutrientes isolados (proteína, carboidratos e/ou gordura) os autores observaram que “cada nutriente sozinho é insuficiente para ativar a recuperação histológica das vilosidades”, apesar de se observar um peso maior um dia após a realimentação em animais que consumiram proteína em comparação àqueles que consumiram gordura e carboidratos (MANEEWAN e YAMAUCHI, 2005). VIEIRA e MORAN (1999) observaram que animais mantidos em jejum por 24 horas após a eclosão apresentaram menor peso vivo ao alojar, menor peso e porcentagem de gema, menor peso vivo aos 21 dias e menor peso de carcaça, porém sem variação no rendimento de carcaça do que animais que receberam ração imediatamente após a eclosão.

NOY e SKLAN (2001) descreveram baixa absorção de glicose e metionina no momento da eclosão. Segundo os mesmos autores essa baixa absorção poderia estar relacionada a presença de gema no trato intestinal (formando uma micela hidrofóbica que dificultaria a absorção), ou a baixa concentração luminal de sódio (necessário para ativar co-transportadores e a bomba de sódio e potássio). Os mesmos autores observaram que após dois dias, animais que receberam ração

apresentavam maior absorção de glicose e metionina que animais que se mantiveram em jejum. Entretanto, após mais dois dias recebendo alimentação, ambos apresentavam a mesma taxa de absorção de metionina e glicose.

BOLELI *et al.* (2002) relataram correlação positiva entre o jejum pós eclosão e o sexo dos animais. Os autores verificaram que pintos machos e fêmeas respondem de forma diferente a períodos longos de jejum pós eclosão. Pintos machos apresentam maior porcentagem de vilos com perda de epitélio e exposição de tecido conectivo, mostrando-se mais sensíveis do que as fêmeas.

## **CONCLUSÃO**

As últimas horas de vida intra-ovo e as primeiras da fase pós-eclosão são importantes para a vida do frango de corte e encerram uma série de eventos que influenciarão seu desempenho final. Algumas situações habituais de manejo, como o a demora no acesso ao primeiro alimento e água tornam-se desafios, os quais, se mal conduzidos, podem resultar em perdas importantes. Entender como os fatores externos podem afetar os mecanismos de desenvolvimento do trato gastrintestinal é fundamental para que se possam estabelecer padrões de manejo e práticas que visem à proteção destes animais contra tais efeitos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAKE, J. T. Pontos importantes de manejo no incubatório para uma boa eclosão. In: Conferência Apinco'95 de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 33-50, Curitiba, 1995.

BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura funcional do trato digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte. Jaboticabal, FUNEP/UNESP, p.75-98, 2002.

CAREGHI, C.; et al. The effects of the spread of hatch and interaction in delayed feed access after hatch on broiler performance until seven days of age. Poultry Science. v. 84, p. 1314-1320, 2005.

CHISTENSEN, V. L.; et al. Egg storage effects on plasma glucosa and supply and demand tissue glycogen concentration of broiler embryos. Poultry Science. v. 80, p.1729-1735, 2001.

DIBNER, J.J.; et al. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. Journal of Applied Poultry Research. v.7, p. 425-436, 1998.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. British Journal of Nutrition, v. 86, p. 53-61, 2001a.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. Poultry Science, v. 80, p. 776-782, 2001b.

GONZALES, E.; et al. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. Poultry Science, v. 82, p. 1250-1256, 2003.

MAIORKA, A. et al. Effect of feed and/or water withdrawal on intestinal mucosa development in broiler chicks after hatching. Poultry Science, v.80, p.393, 2001.

MAIORKA, A. Efeitos da idade da matriz, do jejum, da energia da ração e da glutamina sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal e atividade enzimática do pâncreas de pintos de corte. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

NOY, Y.; SKLAN, D. Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. Poultry Science, v. 80, p. 1490-1495, 2001.

PLUSKE, J.R. et al. Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. British Journal of Nutrition, v. 76, p. 409-422, 1996.

SKLAN, D. Development of Defense Mechanisms in the Digestive Tract of the Chick. Journal of Applied Poultry Research, v.14 p.437-443. 2005.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science*, v. 77, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; NOY, Y.; SKLAN, D. Posthatch development of small intestinal function in the poult. *Poultry Science*, v. 78, p. 215-222, 1999.

UNI, Z. et al. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *British Poultry Science*, v. 41, p. 544-551, 2000.

UNI, Z. et al. Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. *Poultry Science*, v. 82, p. 1747-1754, 2003;

VIEIRA, S.L.; MORAN JR, E.T. Effects of delayed placement and used litter on broiler yields. *Journal of Applied Poultry Research*. v. 8, p. 75-81, 1999.

YAMAUCHI, K.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in White Leghorn hens. *British Poultry Science*, v.37, p.909-921, 1996.



**EFEITO DA JANELA DE NASCIMENTO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA  
MUCOSA INTESTINAL E PRESENÇA DE CÉLULAS CD3 POSITIVAS EM PINTOS  
DE CORTE**

*(Effect of hatch window on intestinal mucosa development and presence of  
CD3 positive cells of broiler chicks)*

**Ricardo Mitsuo Hayashi**

**RESUMO**

Dentro de uma mesma incubadora ocorrem diferentes períodos de eclosões, chamado de janela de nascimento. Se muito prolongado, esse período provoca jejum e desidratação das aves, comprometendo o seu desenvolvimento. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento da mucosa intestinal, alterações de moela e a presença de células CD3+ no timo, baço e tecido linfóide associado ao sistema gastrintestinal de pintos de corte. Foram utilizados ovos oriundos de matrizes com 38 semanas de idade, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 2, sendo 3 períodos de janela de nascimento (eclosão antes de 472 h de incubação, entre 472 e 488 h de incubação e 488 e 504 h de incubação) e 2 pesos de ovos (leves e pesados). Animais que nasceram precocemente e permaneceram por maiores períodos dentro do nascedouro após a eclosão apresentaram desenvolvimento da mucosa intestinal normal, melhor integridade de membrana coelínea da moela, e menor presença de células CD3+ no timo e baço comparado aqueles animais que eclodiram mais próximo do horário padrão de abertura da máquina.

**Palavras-chave:** eclosão; jejum; sistema imunológico; trato gastrintestinal.

## **ABSTRACT**

In the same incubator occurs different hatch periods, called hatch window. If too long, this period can cause dehydration and fasting, affecting broiler chickens' development. This study aimed to evaluate the intestinal mucosa development, gizzard alterations and CD3+ cells in the thymus, spleen and lymphoid tissue associated with the gastrointestinal tract of chicks. Hatching eggs from 36-weeks-old were used, and a randomized 3 x 2 factorial design with three window hatch periods (hatched within 472 h of incubation, between 472 and 488 h and hatched between 488 and 504 of incubation) and 2 eggs weight (light and heavy) were assessed by macroscopic changes and histology. Animals that hatched early and remained in hatchery longer showed regular intestinal mucosa development, gizzard membrane coilin integrity, and less presence of CD3+ cells in the thymus and spleen compared to chick hatched close to regular time to open the hatch machine.

**Key words:** fasting, gastrointestinal tract, hatch, immune system

## **INTRODUÇÃO**

A eclosão de pintos fortes e viáveis é um fator essencial para o desempenho dos frangos de corte. Para aumentar a possibilidade do nascimento de aves saudáveis, o manejo adequado das matrizes até a eclosão das aves na incubadora é crucial. As últimas horas do período embrionário e as primeiras após a eclosão é considerado um dos períodos mais críticos e de extrema importância para o desenvolvimento da ave. Esse período caracteriza-se por eventos fisiológicos como a maturação do trato gastrintestinal (crescimento físico e funcional, devido ao

aumento de vilosidades, polarização de enterócitos e atividade enzimática) e desenvolvimento do sistema imunológico (maturação de órgãos linfóides primários e secundários) (WILLEMSEN *et al.*, 2010).

Práticas de manejo adotadas pela indústria avícola na fase inicial da ave podem, potencialmente, revelarem-se desafios adicionais para o desenvolvimento de frangos de corte. Fatores como a linhagem de matriz utilizada, a idade das matrizes no momento da postura, condição nutricional, tamanho e peso do ovo afetam diretamente o desenvolvimento inicial da ave, podendo ter consequências no seu desempenho final. Ovos e pintos pesados, geralmente apresentam maior proporção de água, proteína e gordura na gema, bem como melhor desempenho zootécnico (MCNAUGHTON *et al.*, 1978; CARDOSO *et al.*, 2002).

A variabilidade do número de horas até o rompimento da casca, temperatura de incubação e tamanho do ovo, fazem com que dentro de uma mesma incubadora haja pintainhos com diferentes tempos de eclosão que varia de 36 a 48 horas, formando a janela de nascimento (SKLAN *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2005). Existem ainda os fatores operacionais do incubatório, como o tempo necessário para a sexagem, vacinação e o transporte até as granjas. Esse período, denominado jejum pós eclosão, pode durar até 72 h, e pode causar perdas de peso do pintainho de até 10% (CANÇADO e BAIÃO, 2002).

Animais submetidos a jejum podem entrar em estado de desidratação, cetose, reduzir ganho de peso, apresentar danos na mucosa intestinal (GEYRA, UNI e SKLAN, 2001a), apoptose celular e danos na musculatura peitoral (YAMAUCHI *et al.*, 1996), mau aproveitamento da gema (MAIORKA *et al.*, 2006) e retardo no desenvolvimento do sistema GALT (tecido linfóide associado ao trato gastrintestinal) (FRIEDMAN *et al.*, 2003). Apesar de a literatura ter vasta informação dos efeitos do

jejum pós eclosão sobre o desenvolvimento das aves, existe pouca informação sobre o que acontece com animais eclodidos precocemente e que permanecem dentro do nascedouro.

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento da mucosa intestinal e a presença de células CD3+ no timo, baço e tecido linfóide associado ao sistema gastrointestinal de animais provenientes de dois pesos de ovos, com eclosão em diferentes períodos (janela de nascimento).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Classificação e incubação dos ovos**

Ovos oriundos de matrizes Cobb<sup>®</sup>, com 38 semanas de idade, foram coletados no período da manhã diretamente do ninho e estocados no incubatório por dois dias à temperatura de 15°C e 75% de umidade. Todos os ovos foram pesados individualmente e calculados a média e o desvio padrão ( $65,4 \pm 4,6$  g), sendo posteriormente classificados em ovos leves, aqueles com peso abaixo do peso médio menos o desvio padrão (igual ou menor que 60,8), e ovos pesados aqueles com peso acima do peso médio mais o desvio padrão. Ovos dentro do peso médio não foram utilizados na avaliação.

Após esse processo, 1152 ovos foram identificados (576 leves e 576 pesados), separados em 12 bandejas com 96 ovos cada e incubados em temperatura e umidade controlada (37,8°C e 60%, respectivamente) em incubadoras Casp CMg 125R<sup>®</sup> até 456 horas (19° dia). O posicionamento do carro com as bandejas foi estrategicamente colocado na porção mediana da incubadora, onde não havia grande oscilação de temperatura. Na transferência dos ovos para o nascedouro, grupos de cinco ovos leves e pesados foram intercalados

aleatoriamente em compartimentos específicos nas bandejas experimentais, de modo que ovos leves e pesados estivessem distribuídos uniformemente da mesma forma na bandeja.

### **Delineamento experimental**

Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2X3, sendo dois pesos de ovos (leves X pesados) e três períodos de eclosão (aqueles eclodidos antes das 472 h de incubação, entre 472 e 488 h, e entre 488 a 504 h de incubação). O fator período de eclosão foi padronizado como animais submetidos à mais de 32h de permanência no nascedouro após eclosão (+32 h janela de nascimento - JN), entre 32 e 16 h de permanência no nascedouro após eclosão (32 h JN) e entre 16 e 0 h de permanência dentro do nascedouro após eclosão (16 h JN), de acordo com a Tabela 01.

Tabela 01. Grupos experimentais com dois pesos de ovos e três períodos de janela de nascimento ou permanência dentro do nascedouro após eclosão (JN).

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Ovos</b>	<b>JN (horas)</b>
T1	Leves	+32
T2	Pesados	+32
T3	Leves	32
T4	Pesados	32
T5	Leves	16
T6	Pesados	16

Durante o período de nascimento, em cada intervalo (+32, 32 e 16 h de JN), o nascedouro foi aberto e 20 pintinhos eclodidos de cada período e de cada peso foram identificados com anilhas coloridas para cada grupo experimental. Após identificação, os pintinhos permaneceram dentro do nascedouro até o momento estipulado para abertura das máquinas de acordo com o procedimento padrão do incubatório (504 horas).

### **Necropsia, pesagem e colheita de amostras**

No momento padrão de abertura das máquinas (504 horas), os animais foram eutanasiados por descolamento cervical e necropsiados em seguida. Foram retirados e pesados o trato gastrintestinal (moela+proventrículo, intestino delgado, intestino grosso) e saco vitelínico de todos os animais.

Após a pesagem, a moela foi aberta, e avaliada macroscopicamente quanto à integridade da membrana coilínea. Amostras também foram coletadas para análise histológica com o objetivo de avaliar espessura de membrana coilínea, integridade e conteúdo das glândulas tubulares, e presença de lesões e células inflamatórias.

Foi realizada a colheita de amostras de fígado, moela, duodeno, jejuno, íleo, ceco, tonsilas cecais, timo, baço e bolsa cloacal, sendo amostras de 10 animais por grupo experimental armazenadas em formol tamponado a 10%. A separação das regiões do intestino foi realizada de acordo com GEYRA, UNI e SKLAN (2001a) para a mensuração de altura de vilo e profundidade de cripta, onde o duodeno foi definido como porção final da alça duodenal, jejuno entre o final da alça duodenal e o divertículo de Meckel e íleo entre o divertículo de Meckel e a saída do ceco.

### **Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)**

Os fragmentos em formol tamponado a 10% de moela, duodeno, jejuno, íleo, fígado, timo e bolsa cloacal, após 24 h de fixação, foram processados rotineiramente e corados pela técnica de HE (LUNA, 1968). Para essa coloração, foram mensuradas as variáveis morfométricas da mucosa do intestino delgado (altura de vilosidade e profundidade de cripta) e espessura de membrana coilínea, com auxílio de um sistema e analisador de imagem (Motic Images Plus 2.0, acoplado ao microscópio Olympus BH2 Olympus America INC., NY, USA) por microscopia de luz. Foram mensurados 20 vilos e 20 criptas dos mesmos vilos por tratamento, para cada segmento intestinal (adaptado de SANTIN *et al*, 2001), e 10 mensurações de espessura de membrana coilínea por grupo experimental (aumento de 20x).

### **Coloração Alcian Blue (AB)**

Os fragmentos de duodeno, jejuno e íleo corados por HE também foram corados pela técnica de Alcian Blue de acordo com SMIRNOV *et al*. (2006), para contagem de células caliciformes. Foi realizada contagem de número de células caliciformes por campo, sendo analisados 20 campos por grupo experimental em objetiva 40x (Motic Images Plus 2.0, acoplado ao microscópio Olympus BH2 Olympus America INC., NY, USA).

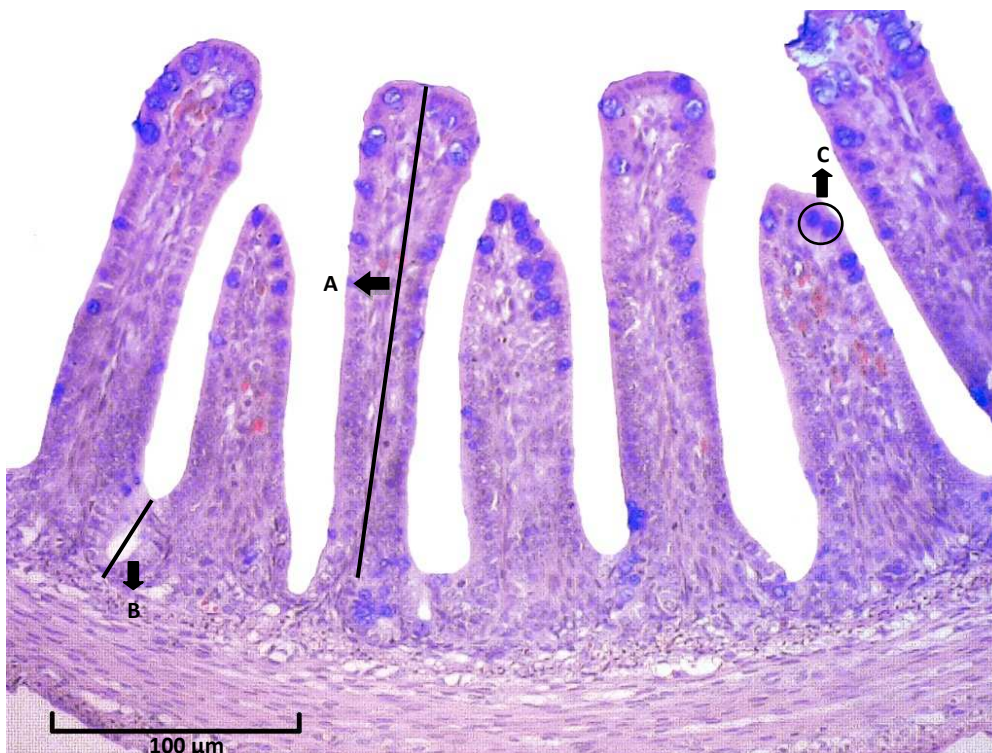


Figura 01. Fotomicrografia de jejuno para mensuração de altura de vilão (A), profundidade de cripta (B) e presença de células caliciformes no vilão (C) (aumento de 20x).

### Imunohistoquímica / Células CD3+

Amostras de timo e baço (porção medular), duodeno, jejuno e íleo (porção inicial) foram analisadas por imunohistoquímica para contagem de células CD3+. Fragmentos foram incluídos em parafina, seccionados com 5  $\mu\text{m}$  de espessura e fixadas em lâminas carregadas positivamente. As secções foram desparafinadas em xilol a 60°C por 20 minutos e reidratadas em água e álcool. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0 em “banho-maria” a 100°C por 10 minutos, bem como o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% e proteína bloqueadora por 8 minutos. O anticorpo primário utilizado foi anti-CD3 (CD3 Dako 1:750), incubado em refrigerador “overnight” a 5° C. Para detecção da reação foram utilizados anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho combinados em um mesmo sistema de amplificação (kit ADVANCE®),



por 30 minutos. Para revelação da reação utilizou-se cromógeno (kit DAB<sup>®</sup>), por 30 segundos. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Meyer, lavadas em água com posterior desidratação e montagem das mesmas. As amostras foram analisadas para presença de células CD3+. Foram analisados 20 campos em timo e baço (aumento de 100x) e 20 vilos por segmento para cada grupo experimental (aumento de 40x) com auxílio de um microscópio Olympus BX41 (Olympus America INC., NY, USA).

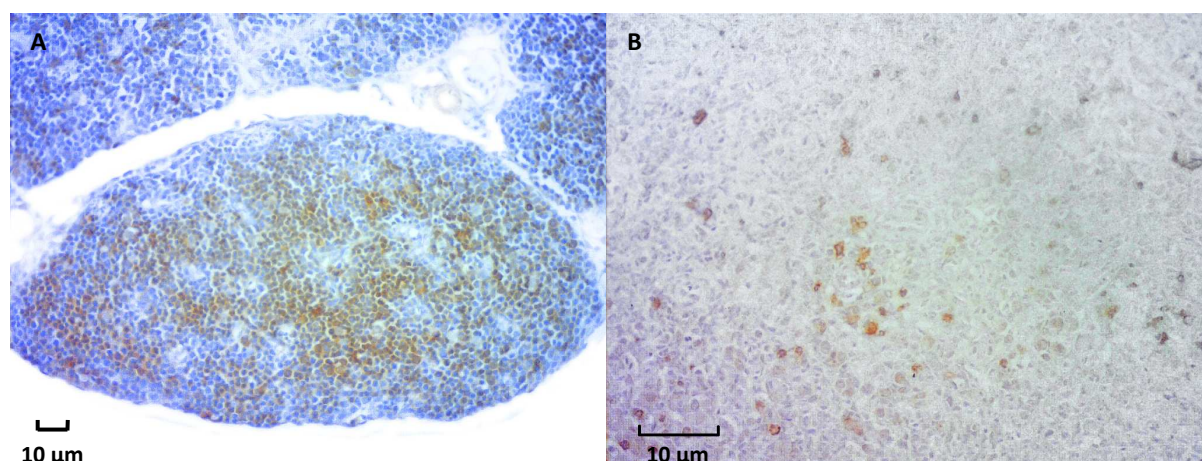


Figura 02. Fotomicrografia de timo (A, aumento de 40x) e baço (B, aumento de 100x) para identificação de células CD3+ por imunohistoquímica.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando houve significância ( $P < 0,05$ ) as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com o auxílio do software Statistix<sup>®</sup> (2008). A interação dos fatores foi analisada pelo software MSTAT<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

Como observado na tabela 02, 10,6% dos ovos incubados eclodiram antes das 32 horas da retirada dos animais do nascedouro (+32 h JN), 87,3% entre as 32 e 16 h (32 h JN) e 2,1% eclodiram entre 16 e 0 hora do tempo padrão de abertura das máquinas (16 h JN).

Tabela 02: Porcentagem de eclosão nos diferentes períodos de janela de nascimento.

Janela de nascimento (h)	Eclosão (%)
Antes das 32 horas de retirada padrão do nascedouro	10,6
Entre 32 e 16 horas	87,3
Entre 16 e 0 hora	2,1

Tabela 03: Peso do trato gastrintestinal e gema (g) de animais submetidos a três períodos de janela de nascimento (h) no período padrão de abertura das máquinas.

JN (h)	Gema (g)	Trato Gastrintestinal (g)
+ 32	3,210±1,02 c	4,290±0,75
32	4,315±1,40 b	4,290±1,04
16	6,805±1,62 a	4,745±0,67
<b>Valor de P</b>	0,000	0,076

a-c: Médias seguidas de letras diferentes (colunas) diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O peso do trato gastrintestinal não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os animais que nasceram em diferentes períodos e foram retirados à zero hora. O peso da gema foi estatisticamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre todos os tratamentos. Quanto mais cedo a eclosão (+32 h JN), menor é o peso da gema no momento da retirada dos animais do nascedouro (Tabela 03).

Tabela 04. Altura de vilos, profundidade de cripta, número de células caliciformes por campo (40x) e relação vilos/cripta no duodeno em pintos de corte.

	Vilos ( $\mu\text{m}$ )	Cripta ( $\mu\text{m}$ )	Caliciformes	Vilos/Cripta
<b>Efeitos principais</b>				
<b>Leves</b>	658,1 $\pm$ 129,86	64,53 $\pm$ 19,17	116,28 $\pm$ 13,76	10,98 $\pm$ 3,72
<b>Pesados</b>	661,42 $\pm$ 168,79	75,75 $\pm$ 19,63	113,78 $\pm$ 15,0	9,25 $\pm$ 3,15
<b>+ 32 h</b>	726,14 $\pm$ 143,81 a	76,55 $\pm$ 18,83 a	125,53 $\pm$ 13,49 a	9,87 $\pm$ 2,48
<b>32 h</b>	651,88 $\pm$ 160,48 ab	67,58 $\pm$ 18,28 ab	110,7 $\pm$ 13,34 b	10,23 $\pm$ 3,18
<b>16 h</b>	601,26 $\pm$ 118,69 b	66,30 $\pm$ 21,98 b	108,87 $\pm$ 13,49 b	10,25 $\pm$ 4,67
<b>Probabilidades</b>				
<b>Peso (P<sub>1</sub>)</b>	0,918	0,001	0,350	0,007
<b>Período (P<sub>2</sub>)</b>	<0,001	0,033	<0,001	0,865
<b>Interação (P<sub>1</sub>*P<sub>2</sub>)</b>	0,243	0,174	0,067	0,332

a-b: Médias seguidas de letras diferentes (colunas) diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O peso dos ovos não influenciou a altura dos vilos e o número de células caliciformes no duodeno ( $P > 0,05$ ) (tabela 04). Já a profundidade da cripta foi influenciada por este fator ( $P < 0,05$ ), na qual aves provenientes de ovos pesados apresentaram maior profundidade de cripta que àquelas oriundas de ovos leves. A relação vilos/cripta foi influenciada pelo peso do ovo ( $P < 0,05$ ), nos quais animais provenientes de ovos leves apresentaram relação maior quando comparados aos animais oriundos de ovos pesados. A altura de vilos, profundidade da cripta e o número de células caliciformes no duodeno foram influenciados pelo período de eclosão ( $P < 0,05$ ). Aves submetidas a mais de 32 horas de permanência dentro do nascedouro após eclosão apresentaram maior altura de vilos, maior profundidade de cripta e maior número de células caliciformes quando comparados àquelas que eclodiram entre as 32 e 16 h, e entre as 16 e 0 hora do período padrão de retirada do nascedouro. Não houve interação entre os fatores ( $P > 0,05$ ) para as variáveis analisadas no duodeno.

Tabela 05. Altura de vilo, profundidade de cripta, número de células caliciformes por campo (40x) e relação vilo/cripta no jejuno de pintos de corte.

	Vilo ( $\mu\text{m}$ )	Cripta ( $\mu\text{m}$ )	Caliciformes	Vilo/Cripta
<b>Efeitos principais</b>				
<b>Leves</b>	270,10 $\pm$ 73,61	43,74 $\pm$ 15,41	160,88 $\pm$ 15,03	6,59 $\pm$ 2,13
<b>Pesados</b>	282,99 $\pm$ 85,53	44,04 $\pm$ 14,12	161,62 $\pm$ 20,57	6,71 $\pm$ 2,27
<b>+ 32 h</b>	293,18 $\pm$ 90,48 a	48,55 $\pm$ 19,83 a	163,73 $\pm$ 18,78 a	6,48 $\pm$ 2,45 ab
<b>32 h</b>	285,82 $\pm$ 85,65 ab	44,96 $\pm$ 9,09 ab	164,95 $\pm$ 20,9 ab	7,65 $\pm$ 2,08 a
<b>16 h</b>	250,64 $\pm$ 53,0 b	38,16 $\pm$ 11,3 b	155,08 $\pm$ 11,55 b	5,82 $\pm$ 1,64 b
<b>Probabilidades</b>				
<b>Peso (P<sub>1</sub>)</b>	0,365	0,902	0,814	0,665
<b>Período (P<sub>2</sub>)</b>	0,035	0,004	0,021	<0,001
<b>Interação (P<sub>1</sub>*P<sub>2</sub>)</b>	0,119	0,202	0,123	0,665

a-b: Médias seguidas de letras diferentes (colunas) diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

No jejuno, o fator peso dos ovos não influenciou o desenvolvimento da mucosa intestinal (P>0,05). Os diferentes períodos de janela de nascimento influenciaram todas as variáveis intestinais avaliadas (P<0,05). A altura de vilo, profundidade de cripta e número de células caliciformes foram maiores em animais submetidos a mais de 32 h de permanência dentro do nascedouro após eclosão (32 h JN), quando comparados àqueles que eclodiram próximos a 0 h de abertura padrão das máquinas. A relação vilo/cripta foi maior em animais submetidos a 32 horas de permanência dentro do nascedouro após eclosão (32 h JN), o que indica melhor equilíbrio na altura de vilo e taxa de renovação celular. Não houve interação entre os fatores peso do ovo e o período de janela de nascimento (P>0,05) no jejuno.

Tabela 06. Altura de vilão, profundidade de cripta, células caliciformes por campo (40x) e relação vilão/cripta no íleo de pintos de corte.

	Vilão ( $\mu\text{m}$ )	Cripta ( $\mu\text{m}$ )	Caliciformes	Vilão/Cripta
<b>Efeitos principais</b>				
<b>Leves</b>	258,90 $\pm$ 73,23	78,00 $\pm$ 30,98	141,97 $\pm$ 14,35	3,57 $\pm$ 1,19
<b>Pesados</b>	256,04 $\pm$ 70,83	69,97 $\pm$ 21,19	142,87 $\pm$ 13,77	3,95 $\pm$ 1,58
<b>+ 32 h</b>	285,86 $\pm$ 67,51 a	76,36 $\pm$ 34,94	144,63 $\pm$ 13,83	4,28 $\pm$ 1,68 a
<b>32 h</b>	262,0 $\pm$ 68,67 a	75,61 $\pm$ 22,47	143,23 $\pm$ 13,26	3,66 $\pm$ 1,23 ab
<b>16 h</b>	224,56 $\pm$ 66,91 b	69,99 $\pm$ 20,73	139,4 $\pm$ 14,72	3,34 $\pm$ 1,12 b
<b>Probabilidades</b>				
<b>Peso (P<sub>1</sub>)</b>	0,817	0,074	0,719	0,090
<b>Período (P<sub>2</sub>)</b>	<0,001	0,446	0,214	0,002
<b>Interação (P<sub>1</sub>*P<sub>2</sub>)</b>	0,258	<0,001	0,062	<0,001

a-b: Médias seguidas de letras diferentes (colunas) diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

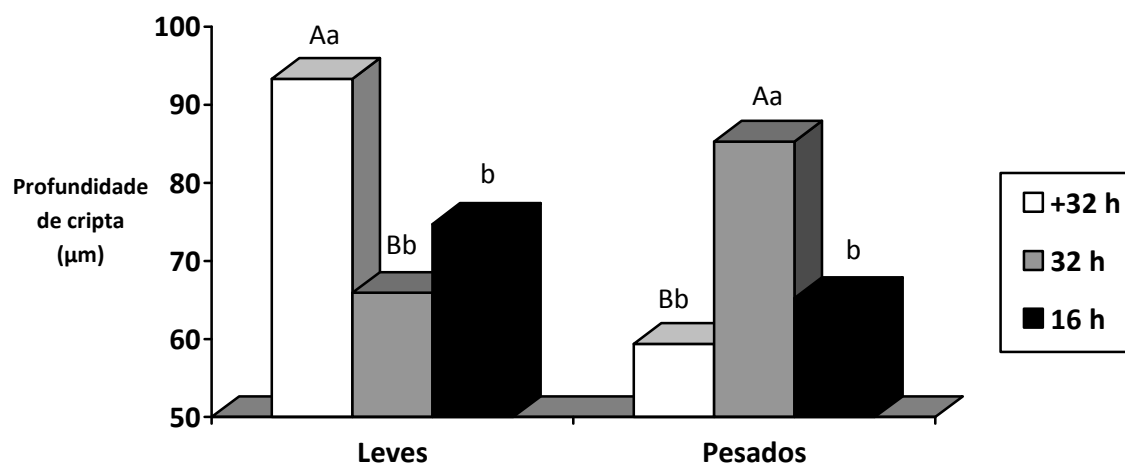


Figura 03. Desdobramento da interação entre os períodos de janela de nascimento e pesos de ovos sobre a profundidade de cripta no íleo. A-B: comparação entre os mesmos períodos de janela de nascimento. a-b: comparação dentro de cada peso. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

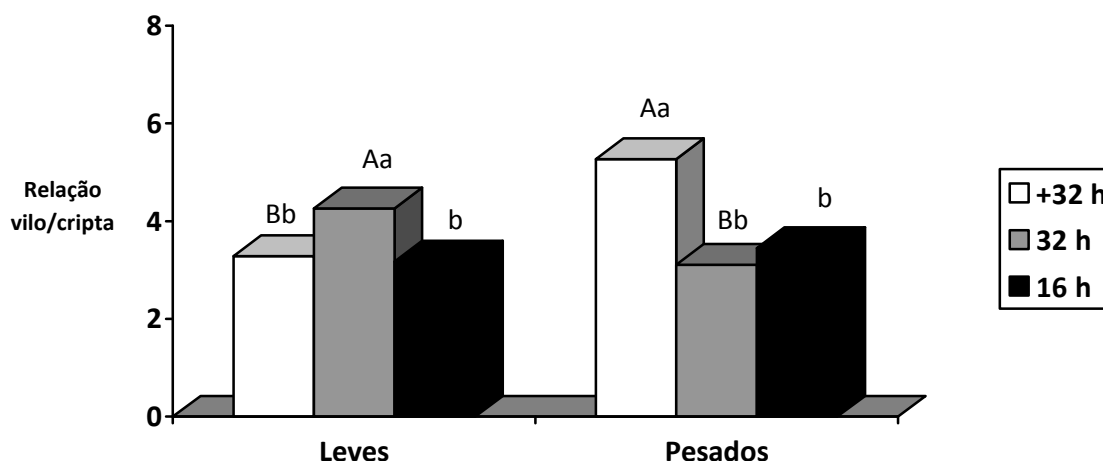


Figura 04. Desdobramento da interação entre os períodos de janela de nascimento e pesos de ovos sobre a relação vilo/cripta no íleo. A-B: comparação entre os mesmos períodos de janela de nascimento. a-b: comparação dentro de cada peso. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

No íleo, o fator peso dos ovos não influenciou as variáveis avaliadas ( $P > 0,05$ ). Os diferentes períodos de janela de nascimento após eclosão influenciaram a altura de vilo e o número de células caliciformes ( $P < 0,05$ ). Aves que eclodiram antes das 32 horas e entre 32 e 16 horas anteriores ao período padrão de abertura das máquinas, apresentaram maior altura de vilo e maior quantidade de células caliciformes no íleo quando comparados àquelas que nasceram entre 16 e 0 h.

Houve interação entre o peso de ovos e o período de janela de nascimento na profundidade de cripta e relação vilo/cripta ( $P < 0,05$ ). O desdobramento desta interação mostrou que, aves oriundas de ovos leves submetidas a mais de 32 h (+32 h JN) de permanência dentro do nascedouro apresentaram maior profundidade de cripta que animais pesados do mesmo período. O mesmo não ocorreu com animais que permaneceram entre 32 e 16 h (32 h JN) dentro do nascedouro após eclosão, pois pintos oriundos de ovos pesados apresentaram maior profundidade de cripta.

Entre os animais oriundos de ovos leves, aqueles com mais tempo de permanência no nascedouro após eclosão (+ 32 h JN), e entre os pesados, animais com período de 32 a 16 h (32 h JN) de permanência no nascedouro após eclosão, apresentaram maiores profundidades de cripta.

O desdobramento da interação na relação vilo/cripta no íleo mostrou que aves provenientes de ovos leves submetidas a mais de 32 h de permanência no nascedouro após eclosão apresentaram menor relação vilo/cripta que animais oriundos de ovos pesados do mesmo período. O mesmo não ocorreu com animais com período entre 32 e 16 h (32 h JN) de permanência no nascedouro após eclosão, pois pintos pesados apresentaram menor profundidade de cripta. Animais oriundos de ovos leves com 32 h JN, e entre os pesados, aqueles com + 32 h JN apresentaram maior relação vilo/cripta entre os pesos de ovos.

A contagem de células CD3+ no timo teve influência no fator período de janela de nascimento ( $P < 0,05$ ), onde se observou que quanto maior o período de permanência no nascedouro após eclosão (+ 32 h JN), menor a contagem de células CD3+ nesse órgão. Houve interação entre os fatores ( $P < 0,05$ ) no baço de pintos para contagem de células CD3+.

No desdobramento dos resultados de presença de células CD3+ no baço, quanto ao período de permanência dentro do nascedouro, animais oriundos de ovos leves com + 32 JN e 16 h JN apresentaram maior contagem de células CD3+ que animais oriundos de ovos pesados nestes períodos. Dentre os animais oriundos de ovos leves, aqueles com menor tempo de permanência no nascedouro após eclosão (16 h JN) apresentaram maior contagem de células CD3+. Nos animais oriundos de ovos pesados, aqueles com 32 h JN apresentaram mais células CD3+ no baço, seguidos de 16 h JN e + 32 h JN.

Tabela 07. Número de células CD3+ por imunohistoquímica no timo (100x), baço (100x), duodeno (40x), jejuno (40x) e íleo (40x) em pintos de corte.

	<b>Timo</b>	<b>Baço</b>	<b>Duodeno</b>	<b>Jejuno</b>	<b>Íleo</b>
<b>Efeitos principais</b>					
<b>Leves</b>	202,35±18,6	13,31±4,1 a	1,01±1,1	0,93±1,0	0,96±0,9
<b>Pesados</b>	201,28±19,1	10,91±10,9 b	1,1± 1,1	1,08±1,2	1,1±1,1
<b>+ 32 h</b>	195,15±11,5 b	7,55±2,2 b	1,0±1,1	1,2±1,2	0,4±0,6 b
<b>32 h</b>	204,2±19,8 ab	15,02±3,3 a	1,07±1,1	0,95±0,9	1,22±0,8 a
<b>16 h</b>	206,1±22,0 a	13,77±3,5 a	1,10±1,1	1,02±1,1	1,47±1,2 a
<b>Probabilidades</b>					
<b>Peso (P<sub>1</sub>)</b>	0,751	<0,001	0,694	0,472	0,436
<b>Período (P<sub>2</sub>)</b>	0,021	<0,001	0,926	0,401	<0,001
<b>Interação (P<sub>1</sub>*P<sub>2</sub>)</b>	0,602	<0,001	0,281	0,662	0,638

a-b: Médias seguidas de letras diferentes (colunas) diferem estatisticamente (P<0,05).



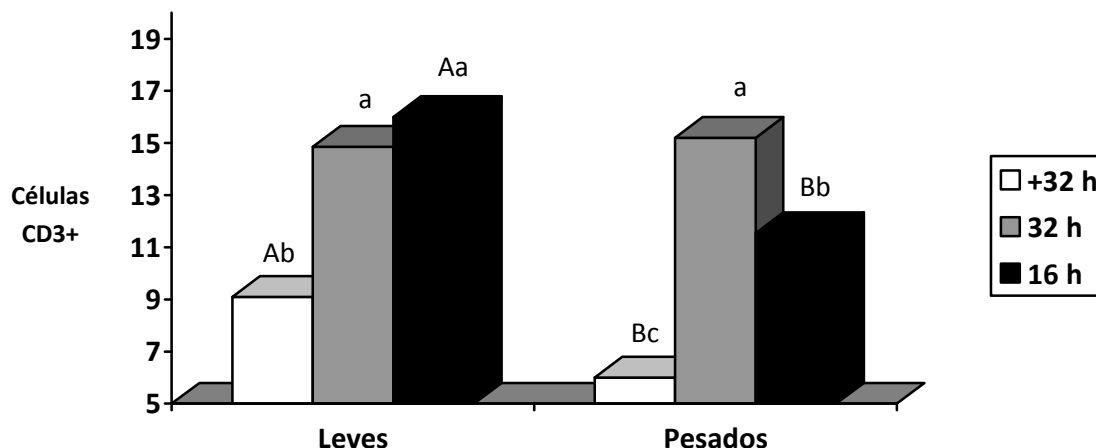


Figura 05. Desdobramento da interação entre os períodos de janela de nascimento e pesos de ovos sobre a contagem de células CD3+ no baço, em período padrão de abertura das máquinas. A-B: comparação entre os mesmos períodos de janela de nascimento. a-b: comparação dentro de cada peso. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

Durante as necropsias, as moelas foram avaliadas macroscopicamente para verificar o aspecto da membrana coilínea e submucosa. Aves com 32 e 16 h JN apresentaram maior porcentagem de aparecimento de pontos marrons (figura 06) na superfície da membrana coilínea (65 e 60%, respectivamente) do que as aves com +32 h JN as quais somente 30% apresentaram estas alterações.

A espessura de membrana coilínea não foi diferente estatisticamente no fator peso de ovos ( $P > 0,05$ ). No entanto, o fator período de janela de nascimento influenciou a espessura da membrana coilínea ( $P < 0,05$ ), onde se observou que quanto maior o tempo eclosão, maior é a espessura de membrana. Também se observou a ausência de células inflamatórias na lâmina própria em todos os tratamentos. As glândulas responsáveis pela secreção da camada muco protéica (membrana coilínea) apresentaram-se com menor conteúdo em animais que

permaneceram mais tempo dentro do nascedouro após a eclosão (+ 32 h JN). Esse mesmo tratamento também apresentou maior integridade de membrana coilínea, mais compacta, caracterizada por conteúdo semelhante à queratina (figura 08).

Tabela 08. Espessura da membrana coilínea na moela (20x) em pintos de corte.

<b>Espessura de membrana coilínea (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	
<b>Efeitos principais</b>	
<b>Leves</b>	154,19 $\pm$ 48,6
<b>Pesados</b>	155,68 $\pm$ 46,5
<b>+ 32 h</b>	203,93 $\pm$ 17,9 a
<b>32 h</b>	166,76 $\pm$ 8,01 b
<b>16 h</b>	94,12 $\pm$ 9,26 c
<b>Probabilidades</b>	
<b>Peso (<math>P_1</math>)</b>	0,654
<b>Período (<math>P_2</math>)</b>	<0,001
<b>Interação (<math>P_1 * P_2</math>)</b>	0,640

a-c: Médias seguidas de letras diferentes (colunas) diferem significativamente ( $P < 0,05$ ).

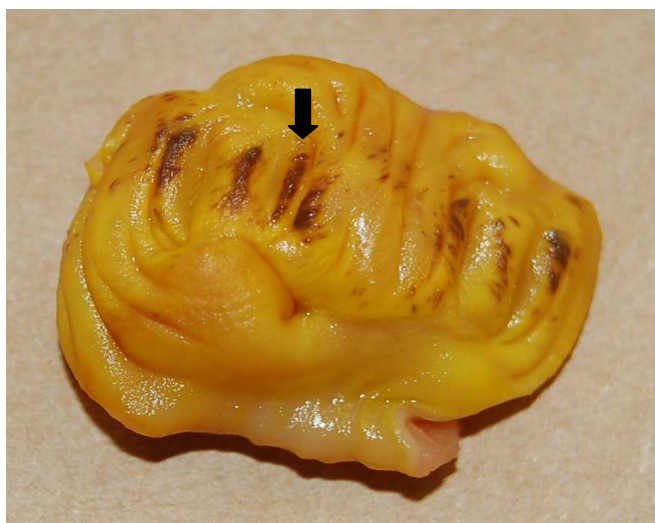


Figura 06. Alterações macroscópicas severas na superfície da membrana coilínea na moela de aves com 16 h JN.

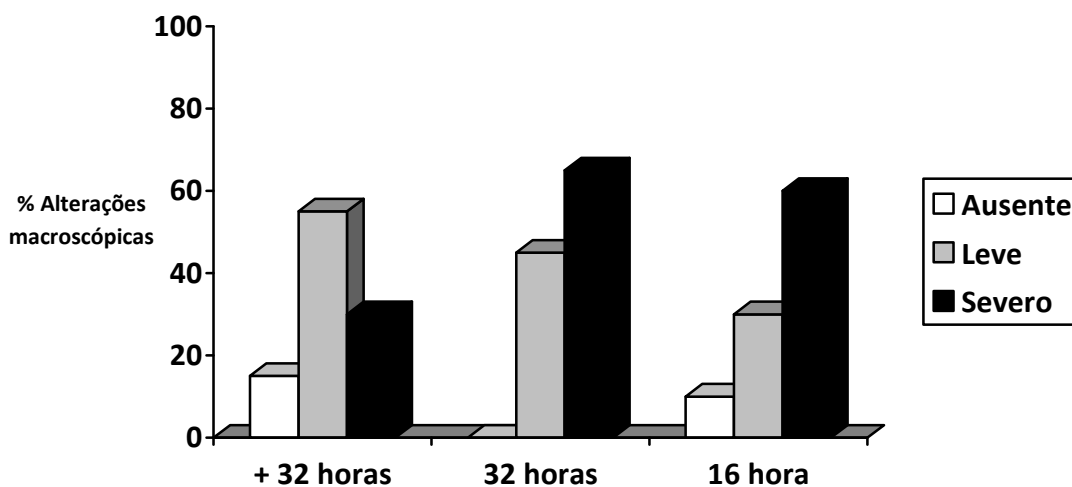


Figura 07. Porcentagem de alterações macroscópicas (ausente, leve ou severo) na superfície da membrana coelínea de aves com diferentes períodos de janela de nascimento.

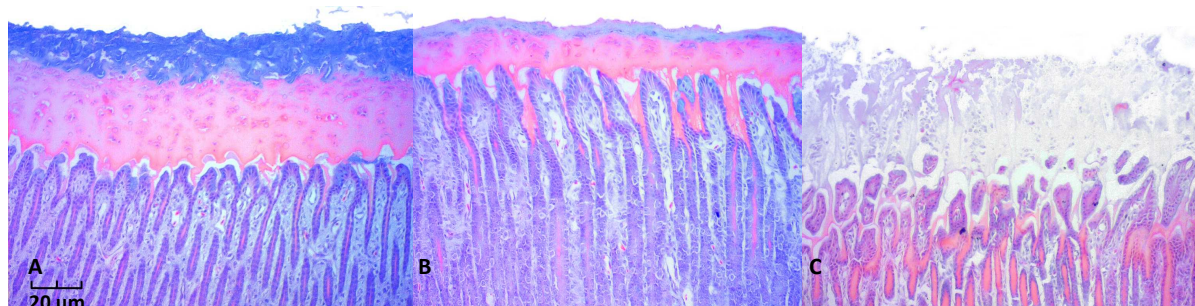


Figura 08. Fotomicrografias de membrana coelínea de moela nos diferentes períodos de janela de nascimento. A: +32 h JN, caracterizada por membrana compacta e densa; B: 32 h JN, caracterizada por membrana em formação; C: 16 h JN, caracterizada por membrana pouco desenvolvida e glândulas com alto conteúdo mucoprotéico (aumento de 40x).

## DISCUSSÃO

As últimas horas do período embrionário e as primeiras após a eclosão é um período de extrema importância no desenvolvimento do intestinal da ave. Neste trabalho, observou-se que o desenvolvimento da mucosa intestinal foi mais intenso

em animais eclodidos precocemente e que permaneceram mais tempo dentro do nascedouro após a eclosão. Por outro lado, avaliando período de jejum após a abertura padrão das máquinas de incubação, diversos autores (YAMAUCHI *et al.*, 1996; SHAMOTO & YAMAUCHI, 2000; MAIORKA *et al.*, 2001) afirmaram que sob jejum hídrico e ração, ocorre aumento na densidade de vilos intestinais, células epiteliais intestinais com grandes vacúolos autofágicos lisossomais, caracterizando morte celular (digestão intracelular), levando o menor desenvolvimento de vilos, altas taxas de extrusão e perda do epitélio (STERZO *et al.*, 2003). É bem provável que os resultados observados neste estudo, no qual houve melhor desenvolvimento da mucosa intestinal em aves com mais tempo dentro do nascedouro após a eclosão (+ 32 h JN) refira-se a eventos fisiológicos programados, que de acordo com WILLEMSSEN *et al.*, (2010) são verificados no final do período de incubação e primeiras horas após a eclosão.

No presente estudo, duodeno e jejuno de pintos com maior período de jejum dentro nascedouro apresentaram maior altura de vilo e maior profundidade de cripta, indicando que apesar da integridade do vilo, as criptas estavam em processo renovação celular. De acordo UNI *et al.* (1998), o intestino delgado atua como uma interface entre o ambiente interno e o externo dos frangos de corte, sendo que a mucosa intestinal encontra-se em uma condição dinâmica. O processo normal de renovação celular é decorrente de dois eventos citológicos primários associados: renovação celular (proliferação e diferenciação), resultante das divisões sofridas por células totipotentes localizadas na cripta e ao longo dos vilos e perdas por descamação que ocorre no ápice dos vilos. A relação vilo/cripta indica o equilíbrio desses dois processos (UNI *et al.*, 2000).

A contagem de células caliciformes foi evidentemente superior no intestino delgado de aves com maior período de tempo dentro do nascedouro após a eclosão, resultados que também foram observados por UNI *et al.* (2003) e GEYRA, UNI e SKLAN (2001b) em animais submetidos a jejum após a eclosão. A camada de muco, composta predominantemente por mucinas glicoprotéicas, protege os microvilos contra atritos provocados pela passagem da digesta, ação das enzimas digestivas, suco gástricos e agentes patogênicos (UNI *et al.*, 2003). Segundo GEYRA, UNI e SKLAN (2001b), o atraso no fornecimento da dieta pós eclosão causa redução na área superficial dos vilos, resultando em diminuição no número de enterócitos e aumento na densidade de células caliciformes produzindo e secretando mucinas para a superfície dos vilos.

Em relação ao peso dos ovos, observa-se pouca influência desse fator sobre o desenvolvimento da mucosa intestinal. No duodeno, animais oriundos de ovos pesados apresentaram maior profundidade de cripta e maior quantidade de células caliciformes que aves oriundas de ovos leves. Entretanto, animais provenientes de ovos leves apresentaram maior relação vilo/cripta, o que pode indicar maior equilíbrio para renovação celular. Segundo GIMENEZ *et al.* (2008), a altura de vilo de todos os segmentos intestinais e a profundidade de cripta no jejuno foram maiores em aves provenientes de ovos pesados. Ovos mais pesados podem apresentar maior quantidade de proteína na gema e albúmen, e a diferença na transferência do lipídio da gema no final da incubação pode influenciar a maturação do intestino (APPLEGATE e LILBURN, 1999).

Órgãos linfóides primários como o timo e bolsa cloacal começam a se desenvolver na fase embrionária. O timo, local de desenvolvimento e amadurecimento de células T, tem suas primeiras células com marcadores CD3,

CD4 e CD8 durante a fase embrionária (MAST & GODDEERIS, 1999). Após a eclosão, ondas de migração dessas células ocorrem para órgãos linfóides secundários, como o baço, que se encontra imaturo na eclosão. Esse transporte a partir do timo para outros órgãos pode justificar os achados deste estudo onde se observa redução na presença de células CD3+ no timo de aves com maior tempo de permanência no nascedouro após a eclosão.

Seguindo essa linha de povoamento de células CD3+ no organismo, MAST & GODDEERIS (1999) explicam ainda que o baço fornece um microambiente de interação entre células linfóides e não linfóides, e é responsável principalmente por armazenar e transportar linfócitos para circulação e tecidos. No presente trabalho, observou-se interação entre peso de ovos e período de permanência dentro do nascedouro após a eclosão sobre a população de células CD3+ no baço. Animais oriundos de ovos leves que permaneceram mais de 32 h dentro do nascedouro após a eclosão, apresentaram maior proporção de células CD3+ no baço quando comparado aos animais oriundos de ovos pesados que permaneceram eclodidos no nascedouro pelo mesmo período. Diante disso, neste trabalho pode-se sugerir que os animais nascidos precocemente transportaram mais células CD3+ do baço para outros tecidos que os animais leves ou tiveram mais células que sofreram apoptose e proporcionaram menor número de células neste órgão. Animais que nasceram no período de 32 a 16 h antes do tempo padrão de abertura das máquinas (32 h JN) não apresentaram diferença na quantidade de células CD3+ no baço com relação ao peso dos ovos, demonstrando que talvez neste período não haja diferença no transporte destas células para outros tecidos entre pintos oriundos de ovos leves ou pesados. Naqueles animais que nasceram próximo ao período padrão de abertura das máquinas (16 h JN) observa-se que pintos oriundos de ovos leves possuem

maior quantidade de células CD3+ que pintos oriundos de ovos pesados, sugerindo aqui, mais uma vez maior eficiência de transporte destas células do baço para outros tecidos ou menor número de células que sofreram processo de apoptose.

Apesar desta forte sugestão de transporte de células do baço para outros tecidos, quando se observa a população de células CD3+ na mucosa intestinal, verifica-se que a presença foi evidentemente baixa e apresentando alto coeficiente de variação entre as amostras impossibilitando uma análise estatística adequada. Sabe-se que aves possuem níveis basais de marcadores CD3+ durante a eclosão no GALT, e que esses marcadores tornam-se mais freqüentes a partir do 4° dia de idade (BAR-SHIRA *et al.*, 2003).

Segundo HANDY *et al.* (1991), aves que permanecem por um tempo superior a 12 horas dentro do nascedouro após a eclosão, já estão sujeitas a processos estressores, devido a maior produção de calor corporal e temperatura excessiva da incubadora, respondendo com uma maior liberação fisiológica do hormônio corticosterona. A permanência elevada desse hormônio pode levar a atrofia do tecido linfóide no timo, bolsa cloacal, baço por apoptose, bem como supressão de resposta humoral e celular (EDENS *et al.*, 1983; ROGAUSCH *et al.*, 1999). Maiores estudos são necessários para estabelecer se este processo deve-se a apoptose celular.

Outra variável acompanhada neste estudo foram as alterações no aspecto da superfície da moela nos diferentes tratamentos. Aves que nasceram precocemente (32 h antes do período padrão) apresentaram maior espessura de membrana coilínea. Essa membrana é formada pela secreção de conteúdo muco proteico por glândulas tubulares ramificadas ou gástricas e se deposita na superfície da mucosa, tornando-se mais resistentes à medida que ocorre o contato com o pH ácido do suco

gástrico, formando uma membrana distensível extremamente resistente à injúria química e mecânica (HILL, 1971).

GIAMBRONE *et al*, (2004) alertam que lesões hemorrágicas e multifocais na membrana coílínea ocorrem com maior freqüência de 72 a 48 horas anterior à eclosão padrão, e possuem tendência de desaparecimento e recuperação da membrana 2 dias após a eclosão. Em experimentos realizados pelos mesmos autores, houve presença de células epiteliais descamadas e eritrócitos degenerados na lâmina própria, e não encontraram evidências de qualquer desafio viral naqueles animais. Portanto sustentam a hipótese de que o estresse durante a incubação e as trocas gasosas pode provocar um desequilíbrio no metabolismo energético, provocando o aparecimento de lesões no sistema intestinal. No presente trabalho, entretanto, as observações microscópicas não demonstraram presença de estruturas que evidenciam processo inflamatório ou de lesão, portanto não sendo considerado como tal.

Segundo AKESTER (1986), o conteúdo glandular (muco proteína) apresenta-se na forma líquida durante o final da fase embrionária. Após a eclosão, esse conteúdo é secretado e sofre um processo de polimerização, tornando-se sólido em contato com o ácido clorídrico proveniente do proventrículo, material semelhante à queratina. Isso pode explicar os resultados encontrados neste experimento onde aves recém eclodidas (16 h JN) apresentam a membrana coílínea menos íntegra que aqueles que eclodiram antes e permaneceram mais tempo dentro do nascedouro, ou seja, este período de espera permitiu que os eventos fisiológicos descritos por HILL (1971) e AKESTER (1986) sucedam e a membrana coílínea seja então devidamente formada.



As aves nascidas precocemente apresentaram maior desenvolvimento da mucosa intestinal, da moela e menor presença de células CD3+ nos órgãos linfóides primários e secundários, o que pode tanto sugerir maior transporte destas células para outros tecidos quanto maior apoptose destas células e imunossupressão nas aves. Como em nenhum dos tratamentos foi oferecido alojamento adequado e água e alimento as aves não se pode dizer que esta eclosão precoce que submete o animal a período de jejum no nascedouro não possa afetar o desenvolvimento do pintinho. No entanto, sabe-se que somado a outras práticas como sexagem, vacinação, processamento, transporte e alojamento dos pintinhos, o jejum é prolongado e torna-se capaz de comprometer o desempenho e resposta imunológica dessas aves como tem sido apresentado em diversos estudos (GEYRA, UNI e SKLAN, 2001a; MAIORKA *et al.*, 2001; VARGAS *et al.*, 2009).

## **CONCLUSÃO**

Aves eclodidas precocemente e que permanecem mais tempo dentro do nascedouro, ou com maior janela de nascimento, apresentaram desenvolvimento da mucosa intestinal de forma normal, boa integridade de moela, porém menor presença de células CD3+ no timo e baço comparado a aves que nascem mais próximo a abertura padrão das máquinas.

Pode-se sugerir que aves que eclodem mais cedo no nascedouro podem estar desenvolvidas e prontas para o alojamento antes mesmo da abertura padrão das máquinas. Esse fato nos questiona se existe a possibilidade de retirar e alojar esses pintos mais precoces, permitindo o melhor aproveitamento do potencial genético para ganho de peso e conversão alimentar destes animais no campo em um tempo menor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKESTER, A.R. Structure of the glandular layer and koilin membrane in the gizzard of the adult domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Anatomy*, 147, pp. 1-25, 1986.
- APPLEGATE, T.J.; LILBURN, M.S. Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. Intestinal growth and glucose tolerance of the turkey poult. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 124, p. 371-380, 1999.
- BAR-SHIRA, E. *et al.* Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Developmental and Comparative Immunology*, v.27, p.147-157, 2003.
- CANÇADO, S.V.; BAIÃO, N.C. Effects of fasting period between hatching and housing and addition of oil to the feed on performance of broiler chicks and digestibility of the ration. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54, n.6, p. 630-635, 2002.
- CARDOSO, J.P.; NAKAGE E.S.; PEREIRA, G.T.; BOLELI, I.C. Efeito da idade da matriz e peso dos ovos, sobre os componentes do ovo em frangos de corte. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas. *Facta*, p. 16, 2002.
- EDENS, F. W. *et al.* Grouping in Japanese quail. Suppression and humoral immunity. *Poultry Science*, v.62, p.2479-2485, 1983.
- FRIEDMAN, A., BAR-SHIRA, E. and SKLAN, D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick. *World's Poultry Science Journal*, 59:209-219, 2003.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN D. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *British Journal of Nutrition*, v. 86, p. 53-61, 2001a.
- GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. *Poultry Science*, v. 80, p. 776-782, 2001b.
- GIAMBRONE, J.; DORMITORIO, T.V.; HOERR, F.J.; POOLE, D. Gizzard and proventricular lesions before & after hatch. *World Poultry*, v.21, n.3, 2005.
- GIMENEZ, A.; RICCARDI, R.; MALHEIROS, E.; BOLELI, I. Influência do sexo e peso dos ovos sobre a altura dos vilos e profundidade das criptas do intestino delgado de embriões e pintos de corte. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, n.3, p.608-616, 2008.
- GONZALES, E.; KONDO, N.; SALDANHA, E.S.P.B.; LODDI, M.M.; CAREGHI, C.; PIZZOLANTE, C.C.; DECUYPERE, E. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poultry Science*, v.82 p.1250-1256, 2003.

- HANDY, A.M.M.; HENKEN, A.M.; VANDER HEL, W. Effects of incubation humidity and hatching time on heat tolerance of neonatal chicks. Growth performance after heat exposure. *Poultry Science*, v.70, p.1507-1515, 1991.
- HILL, K.L. The structure of alimentary tract. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Academic Press, v.1, p.1-22, 1971.
- LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the army force Institute of Pathology. 3 ed. New York, Mc. Graw, 1968.
- MAIORKA, A.; SANTIN, E.; DALHKE, F. Effect of feed and/or water withdrawal on intestinal mucosa development in broiler chicks after hatching. *Poultry Science*, v. 80, p. 393-, 2001.
- MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M.S.F.A. Adaptações pós-eclosão em frangos. *Ciência Rural*. v.36, p.701-708, 2006.
- MAST, J.; GODDEERIS, B. M. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.70, p.245-256, 1999.
- MCNAUGHTON, J.L.; DEATON, J.W.; REECE, F.N.; HAYNES, R.L. Effect of age of parents and hatching egg weight on broiler chick mortality. *Poultry Science*, v.57, p.38-44, 1978.
- ROGAUSCH, H. *et al* Norepinefrine stimulates lymphoid cell mobilization from the perfused rat spleen via-b-adrenergic receptors. *American Journal of Physiology*, v.276, p. R724-R730, 1999.
- SANTIN, E., MAIORKA, A; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broilers chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae*s cell wall. *Journal of Applied Poultry Research*, v.10 p.236–244, 2001.
- SHAMOTO, K.; YAMAUCHI, K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poultry Science*, v. 79, p. 718-723, 2000.
- SKLAN, D., NOY, Y., HOYZNAN, A., ROZENBOIM, I. Decreasing weight loss in the hatchery by feeding chicks and poults in hatching trays. *Journal of Applied Poultry Research*, v.9, p.142-148, 2000.
- SMIRNOV, A.; SKLAN, D.; UNI, Z. Mucin dynamics in the chick small intestines are altered by starvation. *Journal of Nutrition*. 134, 736-742, 2004.
- STERZO, E. V.; GOMIDE JUNIOR, M. H.; PIRES, D. L.; BOLELI, I. C.; SATAKE, F. M. Efeitos da injeção de ácido ascórbico in ovo sobre a densidade e integridade dos vilos intestinais de frangos machos submetidos a jejum pós-eclosão. In: XV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Anais, 2003.
- UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthach development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science*, v. 77, p. 75-82, 1998.

UNI, Z.; GEYRA, A.; BEN-HUR, H.; SKLAN, D. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *British Poultry Science*, v. 41, p. 544-551, 2000.

UNI, Z.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O. Morphological, molecular and functional changes in the chicken small intestine of the late-term embryo. *Poultry Science*, v. 82, p. 1747-1754, 2003.

VARGAS, F., BARATTO, T., BONA, T., MAIORKA, A., & SANTIN, E. 2010. Two different breeder ages and two periods of post-hatching fasting on immunity of broilers. *Archives of veterinary science* [Online] 14:3. Disponível: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/15358>

VIEIRA, S. L.; ALMEIDA, J.G.; LIMA, A.R.; CONDE, O.R.A.; OLMOS, A.R. Hatching distribution of eggs varying in weight and breeder age. *Brazilian Journal of Poultry Science* v.7, p.73-78, 2005.

WILLEMSEN, H.; DEBONNE, M.; SWENNEN, N.; EVERAERT, N.; CAREGHI, C.; HAN, H.; BRUGGEMAN, V.; TONA, K.; DECUYPERE, E. Delay in feed access and spread of hatch: importance of early nutrition. *World's Poultry Science Journal*, v.66, p.177-188, 2010.

YAMAUCHI, K.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in White Leghorn hens. *British Poultry Science*, v. 37, p. 909-921, 1996.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de todos os sistemas na fase embrionária e após a eclosão é caracterizado por vários eventos fisiológicos de grande importância no ciclo de vida da ave. Práticas de manejo, genética e nutrição são fatores limitantes na obtenção de animais em bom estado sanitário, capaz de atingir ótimos níveis zootécnicos.

Nessa fase após a eclosão, o sistema imunológico e gastrointestinal de frangos pode ser afetado negativamente por longos períodos de restrição alimentar. Entretanto, quando se avalia a janela de nascimento (diferença de períodos de eclosão dentro da incubadora), observamos nesse trabalho que aves que eclodiram mais cedo apresentaram a mucosa intestinal desenvolvida no período padrão de abertura das máquinas. Com relação ao sistema imunológico, houve diminuição de células CD3+ no timo e baço naqueles animais eclodidos precocemente, sugerindo a hipótese de transporte dessas células para outros tecidos, ou morte celular.

Esse trabalho nos faz questionar se há a possibilidade de retirada e alojamento daquelas aves já eclodidas antes das 504 horas de incubação. Se elas já apresentam órgãos bem desenvolvidos e prontos para a alimentação e contato com ambiente externo, melhor será o aproveitamento genético para desempenho zootécnico em um menor período de incubação.

É necessário continuar avaliando o desenvolvimento tecidual nos animais nascidos em diferentes períodos quando esses são submetidos a diferentes condições antes e após o nascedouro, como condições de estresse de temperatura, jejum e desafios a campo.