

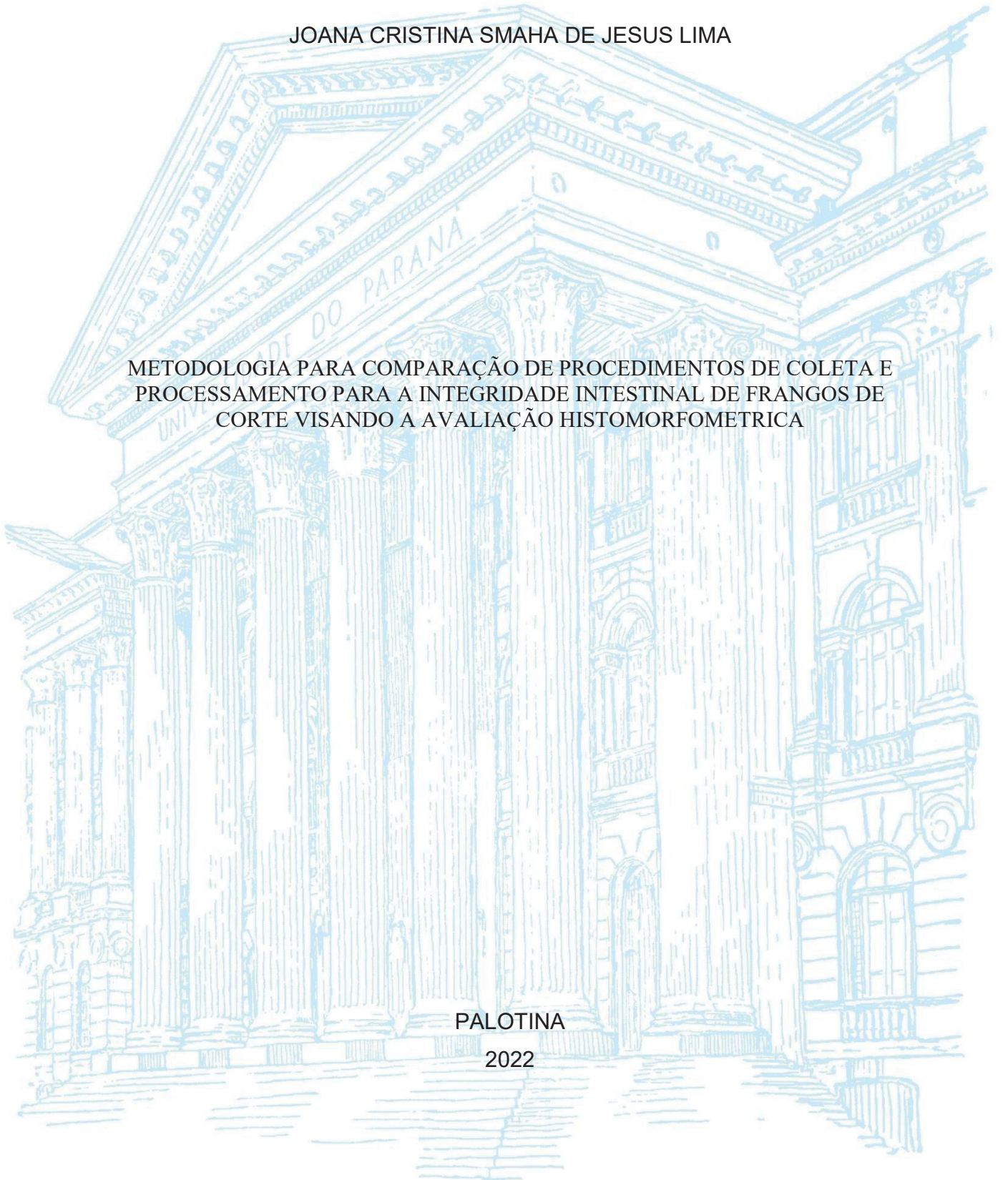
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOANA CRISTINA SMAHA DE JESUS LIMA

METODOLOGIA PARA COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE COLETA E
PROCESSAMENTO PARA A INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE
CORTE VISANDO A AVALIAÇÃO HISTOMORFOMETRICA

PALOTINA

2022



JOANA CRISTINA SMAHA DE JESUS LIMA

METODOLOGIA PARA COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE COLETA E
PROCESSAMENTO PARA A INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE
CORTE VISANDO A AVALIAÇÃO HISTOMORFOMETRICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, no Curso de
Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em
Saúde Animal, linha de pesquisa em Patologia Animal, Setor
de Palotina, da Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof.a Dra. Aline de Marco Viott
Coorientador: Prof.a Dra. *Elisabete*Takiuchi

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

L732 Lima, Joana Cristina Smaha de Jesus
Metodologia para comparação de procedimentos de coleta e processamento para a integridade intestinal de frangos de corte visando a avaliação histomorfométrica / Joana Cristina Smaha de Jesus Lima. – Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Orientadora: Prof.a Dra. Aline de Marco Viott.
Coorientadora: Prof.a Dra. Elisabete Takiuch.

1. Avicultura. 2. Criptas. 3. Histopatológico. 4. Saúde intestinal.
I. Viott, Aline de Marco. II. Takiuch, Elisabete. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.6

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JOANA CRISTINA SMAHA DE JESUS LIMA** intitulada: **METODOLOGIA PARA COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE COLETA E PROCESSAMENTO PARA A INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE VISANDO A AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA**, sob orientação da Profa. Dra. ALINE DE MARCO VIOTT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 04 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

04/08/2022 13:58:41.0

ALINE DE MARCO VIOTT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

10/08/2022 13:09:40.0

EDNA TEREZA DE LIMA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/08/2022 12:16:31.0

MILTON RÖNNAU

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 212463

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 212463

AGRADECIMENTOS

Agradeço á Deus e á Nossa Senhora por me amparar em todos os momentos, e me dar forças quando eu achava que não suportava mais, acolher quando eu não tinha mais esperanças. Me abençoar por todo esse caminho que percorri. Obrigada Santíssima Trindade por todas as graças em minha vida.

Aos meus pais Zenobia e João e ao meu irmão Jhonny, muito obrigado por tudo, pelo carinho, sempre estarem sempre ao meu lado, por cada palavra de apoio e conforto, incentivo, esperança, tempo dedicado, por terem me educado e me ajudado a ter um bom caráter e me tornado a pessoa que sou hoje. Enfim obrigado por todo o amor que vocês sempre me deram e nunca me deixaram desistir ao contrário sempre me incentivaram a estudar e a voar, eu amo imensamente vocês.

Aos meus animais de estimação gatos, cães, passarinhos e coelhos. Obrigado por serem esses filhos maravilhosos e companheiros, sempre presentes, inspiram-me cada dia mais, eu amo muito vocês.

A minha orientadora, Profa.Dra. Aline de Marco Viott, por ser uma inspiração como profissional e como pessoa, pelas oportuidades, por todo o aprendizado compartilhado, pelo seu carinho e orientação maravilhosa.

A minha co-orientadora, Profa.Dra Elisabete Takiuchi, por ter me auxiliado, compartilhado aprendizados e me apoiado durante o período do mestrado.

Aos alunos de iniciação científica Vinicius, Nicolle, Danieli e Lorena, que sempre me auxiliaram durante o processo.

Agradeço imensamente aos residentes e mestrandas do Laboratório de Patologia Animal (Arthur, Crisan, Karim, Juliana e Carolina), nos quais tenho um carinho enorme, por todo auxílio, apoio, aprendizado compartilhado, paciência, carinho e risadas. Vocês são demais.

A todos os meus amigos que estiveram presentes nessa fase tão importante da minha vida. Me apoiaram a nunca desistir apesar dos momentos ruins.

RESUMO

As características morfológicas do intestino delgado são de suma importância para a avicultura, e diversos estudos baseiam-se na histomorfometria como método auxiliar de avaliação. A histomorfometria, por sua vez, avalia as estruturas do intestino correlacionando a morfologia intestinal com a capacidade de absorção de novos alimentos. No entanto, muitas vezes este processo fica comprometido devido a autólise e alterações morfológicas destas estruturas em decorrência de falhas de coleta e processamento. Objetiva-se com este estudo, comparar diferentes métodos de coleta e processamento do jejuno de frangos de corte, visando encontrar a melhor técnica de processamento para a histomorfometria. Foram utilizados 55 frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*), com 39 dias de vida, tratados com ração comercial e água *ad libitum*, os quais não foram submetidos a um desafio sanitário. As aves foram eutanasiadas e posteriormente coletou-se um fragmento de 7cm de jejuno. O fixador utilizado foi formol a 10%. Esses segmentos de intestino foram submetidos a 11 técnicas com cinco animais cada, sendo eles: 1) aberto e fixado rapidamente; 2) fixado na forma de tubo e clivado na forma circular após 4 horas; 3) fixado na forma de tubo e clivado na forma circular após 6 horas; 4) aberto e lavado em formol antes da fixação; 5) aberto e limpo delicadamente com tesoura; 6) aberto e fixado em isopor em 4 extremidades; 7) aberto e fixado em isopor em 4 extremidades e lavado com formol 10% 4°C; 8) aberto e fixado em formol a 10% a 4° C; 9) fixado na forma de tubo com clivagem circular das extremidades; 10) fechado e lúmen lavado com formol e 11) amarrado às extremidades e inoculado com 4 ml de formol. Todas as amostras foram processadas para coloração de hematoxilina e eosina 48 horas após a coleta. Após processamento histológico, de cada amostra foi contabilizada o número de vilosidades aptas para aferição do comprimento de vilosidades e comprimento de cripta além da capacidade de avaliação da muscular intestinal e do comprimento total da mucosa. Na histologia foram descartadas as vilosidades autolisadas, dobradas, sobrepostas e partidas pelo processamento. A mediana das vilosidades obtida de cada técnica foi submetida a um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial negativa (MLG-NB). Os dados contínuos foram então submetidos ao teste de Tukey com valor de significância de $p < 0,05$. As técnicas diferiram quanto a contagem média de vilosidade e cripta. Para ambos os casos, a técnica 1 teve médias estimadas comparáveis as técnicas 4 e 5, distinguindo-se dos demais. Todas as técnicas possibilitaram a realização da aferição da espessura da camada muscular e da espessura total da mucosa. Dessa forma conclui-se que a metodologia empregada na coleta influi na qualidade da amostra submetida a morfometria, e que técnicas de coleta que fixam o intestino aberto e com menor manipulação da amostra apresentam resultados mais satisfatórios para a avaliação morfométrica.

Palavras-chave: Avicultura, saúde intestinal, criptas, histopatológico, vilosidades.

ABSTRACT

The morphological characteristics of the small intestine are of paramount importance for poultry farming, and several studies are based on histomorphometry as an auxiliary evaluation method. Histomorphometry, in turn, evaluates gut structures by correlating intestinal morphology with the ability to absorb new foods. However, this process is often compromised due to autolysis and morphological changes in these structures as a result of collection and processing failures. The objective of this study is to compare different methods of collecting and processing the jejunum of broiler chickens, in order to find the best processing technique for histomorphometry. Fifty-five broilers (*Gallus gallus domesticus*) were used, 39 days old, treated with commercial feed and water ad libitum, which were not subjected to a sanitary challenge. The birds were euthanized and a 7cm fragment of jejunum was later collected. The fixative used was 10% formaldehyde. These intestine segments were submitted to 11 techniques with five animals each, as follows: 1) opened and quickly fixed; 2) fixed in tube form and cleaved in circular form after 4 hours; 3) fixed in tube form and cleaved in circular form after 6 hours; 4) opened and washed in formalin before fixation; 5) open and clean gently with scissors; 6) open and fixed in styrofoam at 4 ends; 7) opened and fixed in styrofoam at 4 ends and washed with 10% formalin at 4°C; 8) opened and fixed in 10% formalin at 4°C; 9) fixed in the form of a tube with circular cleavage of the ends; 10) closed and lumen washed with formalin and 11) tied to the ends and inoculated with 4 ml of formalin. All samples were processed for hematoxylin and eosin staining 48 hours after collection. After histological processing, the number of villi capable of measuring the length of the villi and crypt length was counted for each sample, in addition to the ability to evaluate the intestinal muscle and the total length of the mucosa. In histology, autolyzed, folded, overlapping and split villi were discarded by processing. The median of the villi obtained from each technique was submitted to a Generalized Linear Model with negative binomial distribution (MLG-NB). The continuous data were then submitted to the Tukey test with a significance value of $p < 0.05$. The techniques differed in the mean villus and crypt counts. For both cases, technique 1 had estimated averages comparable to techniques 4 and 5, distinguishing itself from the others. All the techniques made it possible to measure the thickness of the muscular layer and the total thickness of the mucosa. Thus, it is concluded that the methodology used in the collection influences the quality of the sample submitted to morphometry, and that collection techniques that fix the open intestine and with less manipulation of the sample present more satisfactory results for the morphometric evaluation.

Keywords: Poultry, intestinal health, crypts, histopathological, villi.

FIGURA 1 - Corte histológico do duodeno de um frango de corte de 39 dias, sendo identificadas as seguintes estruturas: vilosidades (6), criptas de Lieberkuhn (1), muscular da mucosa (3), submucosa (5), muscular externa (4) e musculatura interna longitudinal (2).....	16
FIGURA 2 - Características avaliadas na mucosa do intestino delgado através de régua micrométrica e morfometria computadorizada, em 100x aumentos.	19
FIGURA 3 - A) Procedimento realizado referente a técnica 6, onde coletou-se um fragmento de jejuno aberto delicadamente com uma tesoura ponta fina e posteriormente exposto em uma superfície, sendo fixado com alfinete em quatro extremidades; B) Procedimento realizado referente a técnica 10, onde coletou-se um fragmento de jejuno fechado e lavou-se o lúmen com 1mL de formaldeído a 10%; C) Técnica de coleta referente a técnica 11, onde amarrou-se ambas as extremidades do jejuno com um barbante, e injetou-se aproximadamente 3mL de formaldeído 10% no lúmen.....	34
FIGURA 4 - Intestino delgado (jejuno), <i>Gallus gallus domesticus</i> , 39 dias. Ave 03, técnica 1. Observa-se maioria vilosidades preservadas, aptas a mensuração (HE, obj. 4x).	40
FIGURA 5 - Intestino delgado (jejuno), <i>Gallus gallus domesticus</i> , 39 dias. (A) Ave 06, técnica 2. Observa-se autólise do ápice das vilosidades (HE, obj. 4x). (B). Ave 11, técnica 3. Observa-se as vilosidades sobrepostas, rompidas, plissadas e dobradas (HE, obj. 4x). (C). Ave 46, técnica 10. Observa-se as vilosidades achatadas (HE, obj. 20x). (D). Ave 52, técnica 11. Observa-se as vilosidades tortas, dobradas, sobrepostas e há presença de conteúdo intestinal mesmo após a lavagem (HE, obj. 4x).	41

TABELA 1 - Técnicas com seus respectivos códigos e quantidades de unidades experimentais (N).....	34
TABELA 2 - Valores de mediana, mais mínimo e máximo, e média estimada, com intervalo de confiança de 95% das contagens de cripta e vilosidade para cada técnica deste estudo.....	38

GRÁFICO 1 - Média±IC95% das contagens de cripta para as técnicas. As cores representam os grupos com maiores (azul/quadrado) e menores (bolinhas/vermelho) contagens médias..... 38

GRÁFICO 2 - Média±IC95% das contagens de vilosidade para as técnicas. As cores representam os grupos com maiores (azul/quadrado) e menores (bolinhas/vermelho) contagens médias..... 39

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 FUNÇÕES E ORGÃOS ASSOCIADOS.....	10
2.1.1 Cavidade oral.....	11
2.1.2 Esôfago.....	11
2.1.3 Estômago.....	11
2.1.4 Intestino Delgado	12
2.1.4.1 Duodeno	12
2.1.4.2 Jejuno	12
2.1.4.2 Íleo	13
2.1.4 Intestino grosso.....	13
2.1.5.1 Ceco.....	14
2.1.5.2 Colón e reto	14
2.1.5.3 Cloaca.....	14
2.2 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO INTESTINO DAS AVES	15
2.3 MORFOMETRIA INTESTINAL	17
2.3.1 Definição e conceito.....	17
2.3.2 Procedimentos morfométricos e técnica para aplicação	19
2.2.2.1 Dificuldades e erro na técnica	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. CAPÍTULO 1	29
4.1 INTRODUÇÃO.....	32
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.2.1 Bioética	33
4.2.2 Animais	33
4.2.3 Coleta das amostras	33
4.2.4 Processamento histológico	35
4.2.5 Avaliação histológica e contagem histomorfométrica.....	35
4.2.6 Avaliação estatística	36
5.3 RESULTADOS	37
5.4 DISCUSSÃO.....	42
5.5 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

O setor da avicultura industrial brasileira, vem sendo uma das áreas mais tenrificadas do agronegócio mundial, tendo produção com eficiência e exigindo o máximo desempenho das aves (SOUZA et al., 2020).

A saúde intestinal dos frangos de corte constitui uma importante característica a ser mantida e observada na produção avícola (SOUZA et al., 2020). O monitoramento intestinal baseia-se apenas em observações superficiais que não permitem um diagnóstico preciso capaz de produzir soluções eficazes para sanar os problemas (MORI, 2008).

A morfometria das vilosidades tornou-se uma importante ferramenta de avaliação, pois cada vez mais os mercados importadores exigem a retirada do uso de aditivos de crescimento da dieta. Entretanto, os presentes trabalhos não possuem uma metodologia delineada de como proceder a coleta e a fixação do material para não danificar a estrutura das vilosidades intestinais (SOUZA et al., 2020).

Assim, o presente trabalho tem por objetivo demonstrar a metodologia e comparar procedimentos de coleta e processamento para a integridade intestinal de frangos de corte visando a avaliação histomorfométrica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Há cerca de cinco décadas a avicultura vem sendo implantada com fortes investimentos e profissionalização, gerando em torno de 4,1 milhões de empregos diretos e indiretos e engajando cerca de 100 mil famílias em um sistema que preserva o trabalhador no campo. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo, em 2019 a produção brasileira chegou a 13.245 milhões de toneladas de carne de frango, sendo exportado 32% desta produção para diversos países como a China e a Arábia Saudita. (ABPA, 2020).

A alta produtividade observada na produção avícola depende, dentre outros fatores, da obtenção adequada de nutrientes pelo organismo. Os processos de absorção são totalmente dependentes de mecanismos de transporte que acontecem na membrana das células epiteliais da mucosa intestinal (MAIORKA, 2004). Logo, a manutenção da saúde intestinal das aves é fundamental para o melhor desempenho, pois possibilita a adequada obtenção de energia e nutrientes obtidos da ração pelo organismo (BARRETO, 2007).

2.1 FUNÇÕES E ORGÃOS ASSOCIADOS

As funções básicas do sistema digestivo é ingerir alimentos, triturá-los e mistura-los a uma variedade de secreções da cavidade, oral, estômago, pâncreas, fígado e intestinos (digestão) e então absorver os nutrientes constitutivos para a corrente sanguínea, vasos linfáticos e a eliminação de alimentos (ZACHARY; MC GAVIN, 2013).

O sistema digestivo das aves é formado por órgãos relativamente leves, o que contribui para o voo das aves, além de liberar rapidamente a energia proveniente dos alimentos, resultando assim em uma alta taxa metabólica (DYCE et al., 2010). O sistema digestório das aves é composto pela cavidade oral, esôfago, papo, proventrículo, moela (ventrículo), intestino delgado, intestino grosso e cloaca (ARENT, 2010), sendo visualizada algumas particularidades como a ausência de dentes, lábios e bochechas e presença de dois cecos (KONIG et al., 2016).

2.1.1 Cavidade oral

O bico surge no oitavo dia de incubação no formato de uma saliência córnea denominada diamante (BOLELI et al., 2008). O bico das aves substitui os lábios e os dentes presentes nos mamíferos e consiste em uma parte óssea, derme vascular e uma queratina modificada, permitindo as aves agarrar os alimentos, algumas vezes matando a presa e a dilacerando para iniciar o processo digestivo (ARENT, 2010).

A orofaringe é uma cavidade comum para o sistema digestivo e respiratório devido à ausência de palato mole. As aves possuem somente uma camada de glândulas salivares dispersas pela orofaringe, sendo que a saliva das aves é mais mucoide justamente para lubrificar o alimento (CUBAS, 2006).

2.1.2 Esôfago

O esôfago é capaz de grandes distensões e sua lâmina própria apresenta diversas glândulas mucosas com a função de produzir muco que auxilia na passagem do bolo alimentar. A parede ventral do esôfago das aves, geralmente a dos frangos, se expande para formar o inglúvio conhecido também como papo, que possui a função de estocar alimentos por um curto período de tempo (KING, 1986; RITCHIE et al., 1994; ALMEIDA, 2006; CUBAS, 2006; TULLY e MITCHELL, 2009; DYCE et al., 2010; ARENT, 2010). Tanto o esôfago como o papo estão localizados na tela subcutânea e não possui quase nenhuma atividade química nos mesmos (DYCE et al., 2010).

2.1.3 Estômago

O estômago é dividido em duas partes distintas, o proventrículo e o ventrículo (moela). O proventrículo é a porção glandular do estômago, apresenta dois tipos de células epiteliais, as células oxintopépticas que produzem ácido clorídrico (HCl) e pepsinogênio e as células epiteliais que produzem muco. A moela é constituída de músculos fortes responsáveis pela trituração, maceração e mistura do alimento (KING, 1986; RITCHIE et al., 1994; TULLY e MITCHELL, 2009; DYCE et al., 2010; BERTECHINI, 2012).

2.1.4 Intestino Delgado

O intestino delgado aumenta em peso mais rapidamente que a musculatura corporal, este processo de rápido crescimento em relação ao peso corporal é verificado desde o terço final da incubação (MAIORKA et al., 2000), alcançando máximo desenvolvimento relativo do 4° ao 8° dia em frangos (NOY E SKLAN, 1998). Isto fortalece a premissa de que a adequada alimentação na primeira semana de idade do pintainho tem papel relevante no desempenho do frango (MAIORKA, 2004). O intestino delgado compreende o duodeno, o jejuno e o íleo.

2.1.4.1 Duodeno

O duodeno percorre em sentido caudal a partir da superfície direita da moela formando uma alça semelhante a um “U” que retorna à junção duodenojejunal próximo a moela (KING, 1986; RITCHIE et al., 1994; DYCE et al., 2010).

O duodeno consiste em uma alça intestinal, localizada logo após o ventrículo, sendo esta constituída de porção proximal descendente e porção distal ascendente. Sua localização é fácil devido a posição do pâncreas entre as duas porções da alça e seu maior diâmetro. (BOLELI et al., 2008; MCLELLAND, 1975). No duodeno há uma redução na espessura da mucosa, na direção do íleo, em função da diferença do tamanho dos vilos e da profundidade das criptas.

2.1.4.2 Jejuno

O jejuno é responsável pela absorção de nutrientes no intestino, forma alças espiraladas ao longo do mesentério e possui uma parede fina, por isso seu conteúdo lhe confere um aspecto esverdeado, possuindo diversos agregados de linfonodos (KING, 1986; RITCHIE et al., 1994; DYCE et al., 2010). O jejuno é a região mais longa do intestino delgado e encontra-se disposto em várias alças, se comparado ao duodeno, ele apresenta vilosidades mais longas, uma quantidade maior de células caliciformes e não possui glândulas de Brunner (CARVALHO et al, 2014).

2.1.4.2 Íleo

O íleo continua a partir do jejuno, porém sem nenhuma divisão visível a olho nu. Possui início no divertículo vitelino (Meckel) ou oposto ao ápice dos cecos (DYCE et al., 2010; TULLY e MITCHELL, 2009). O íleo continua a partir do jejuno, delimitado posteriormente pelo ponto de ligação cecos-cólico ao intestino, os vilos do íleo são menores e mais alargados, assim como no jejuno, sendo chamados, também de lameliformes com um aspecto foliáceo (MENDES et al., 2004).

O divertículo de Meckel resulta de uma obliteração incompleta do ducto onfalomesentérico ou vitelino, é considerado a anomalia congênita gastrintestinal mais comum (ERRASTI et al. 1994). É usado como marcador arbitrário para separar o jejuno do o íleo. A túnica mucosa é composta por vilos intestinais (GARTNER e HIATT, 2007), que proporcionam um aumento na área de digestão e absorção intestinal.

O fígado e o pâncreas são considerados glândulas anexas que facilitam ao intestino delgado as principais etapas químicas da digestão e absorção de nutrientes. O fígado possui como função a estocagem de carboidratos, gorduras e vitaminas, realizando a secreção da bile, que é conduzida pelo ducto hepatoentérico diretamente para o duodeno. O conteúdo biliar emulsifica as gorduras presentes no intestino delgado, formando complexos hidrossolúveis, facilitando a absorção lipídica e a ação das enzimas do pâncreas. O pâncreas tem funções endócrinas que atua no controle de carboidratos e funções exócrinas atuando na síntese de sais e enzimas digestivas (BOLELI et al., 2008).

2.1.4 Intestino grosso

O intestino grosso nas galinhas é composto de um par de cecos, colón (reto) e é contíguo a cloaca (BOLELI et al., 2008). É um segmento que se estende do final do intestino delgado até a cloaca e sua principal função é reabsorção de água e minerais, possui uma parede muscular espessa e as vilosidades da mucosa são relativamente curtas.

2.1.5.1 Ceco

O ceco é um par de saculações localizado na junção do intestino delgado e grosso em algumas espécies, sua função continua sendo estudada, mas é importante para reabsorção hídrica e fermentação bacteriana de celulose através da atuação de bactérias gram-positivas e de protozoários. O ceco apresenta grandes variação na forma, tamanho e histologia entre as espécies aviárias, a maioria das aves possui cecos emparelhados, mas alguns têm apenas um único ceco, pares duplos de ceco ou carecem de cecos. Os galináceos possuem um ceco intestinal tubular simples com vilosidades sendo que a porção média possui pregas longitudinais proeminentes(CONSINS, 1985 RITCHIE et al., 1994; DYCE et al., 2010).

2.1.5.2 Colón e reto

O Colon ou reto é curto nas aves e aproximadamente retilíneo com vilosidades, estendendo da junção ileo-cecal até a cloaca. Tem como função a reabsorção de água e eletrólitos por movimentos antiperistálticos (DUKE et al., 2007).

2.1.5.3 Cloaca

A cloaca é uma estrutura dilatada, possuindo formato de uma bolsa, sendo um compartimento comum aos sistemas digestórios, urinários e reprodutivos (RITCHIE et al., 1994; WERTHER, 2004; TULLY e MITCHELL, 2009; DYCE et al., 2010; ARENT, 2010). Ela é revestida por epitélio colunar com um arranjo de vilosidades semelhante ao do intestino grosso. (MAIORKA et al.; 2008). Localiza-se no final do trato digestório e divide-se em três partes, o copródeo que tem por função receber as fezes do intestino, o uródeo que recebe os excrementos dos rins e dos ductos genitais e o proctódeo, localizado posteriormente, é acessado pelas duas outras partes e armazena os excrementos. A cloaca é fechada por um orifício muscular que apresenta músculos ejetores potentes para eliminação das excretas através do ânus. (ARENTE, 2010).

2.2 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO INTESTINO DAS AVES

Histologicamente, o intestino dos frangos é semelhante na questão da estrutura, por todo o seu comprimento. Embora a parede intestinal dos frangos seja semelhante à dos mamíferos, algumas diferenças como a ausência de glândulas duodenais e a submucosa extremamente fina, devem ser consideradas (JUNIOR E BACHA, 2012).

A avaliação microscópica dos intestinos é melhor realizada com seções longitudinais que fornecem mais área de superfície do intestino em comparação para o exame de seções transversais (ABDUL-AZIZ; FLETCHER; BARNES, 2021). O epitélio intestinal mantém regulada a absorção de nutrientes e água, excluindo os potenciais agentes patogênicos. Porém devido a sua grande extensão e capacidade absorptiva é uma das vias mais importantes de entrada de antígenos estranhos (BOUHET E OSWALD, 2005).

A parede intestinal das aves em sua camada mais próxima ao lúmen é composta de uma membrana mucosa a qual é formada por uma camada superficial de epitélio cilíndrico (ou colunar) simples, uma camada de tecido conjuntivo de ligação e uma lâmina própria. É delimitada a mucosa por uma fina camada de fibras musculares dispostas longitudinalmente nomeada muscular da mucosa, sob qual está a submucosa que é composto de uma discreta camada de tecido conjuntivo frouxo e a submucosa é pouco desenvolvida no intestino delgado.

As principais camadas musculares que compõe o intestino são: a camada circular (externa) e a longitudinal (interna) da muscular externa, entre essas duas possuem uma discreta camada de fibras elásticas, muitos vasos sanguíneos e plexos nervosos, a camada longitudinal as fibras envolve todo o tecido exceto o ceco. A serosa ou membrana serosa é caracterizada por um epitélio composto de células lisas e finas sobre uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo que possui umas poucas e pequenas fibras elásticas, nesta região vasos sanguíneos e nervosos se encontram e se juntam com a camada do mesentério (FIGURA 1) (BOLELI, 2008).

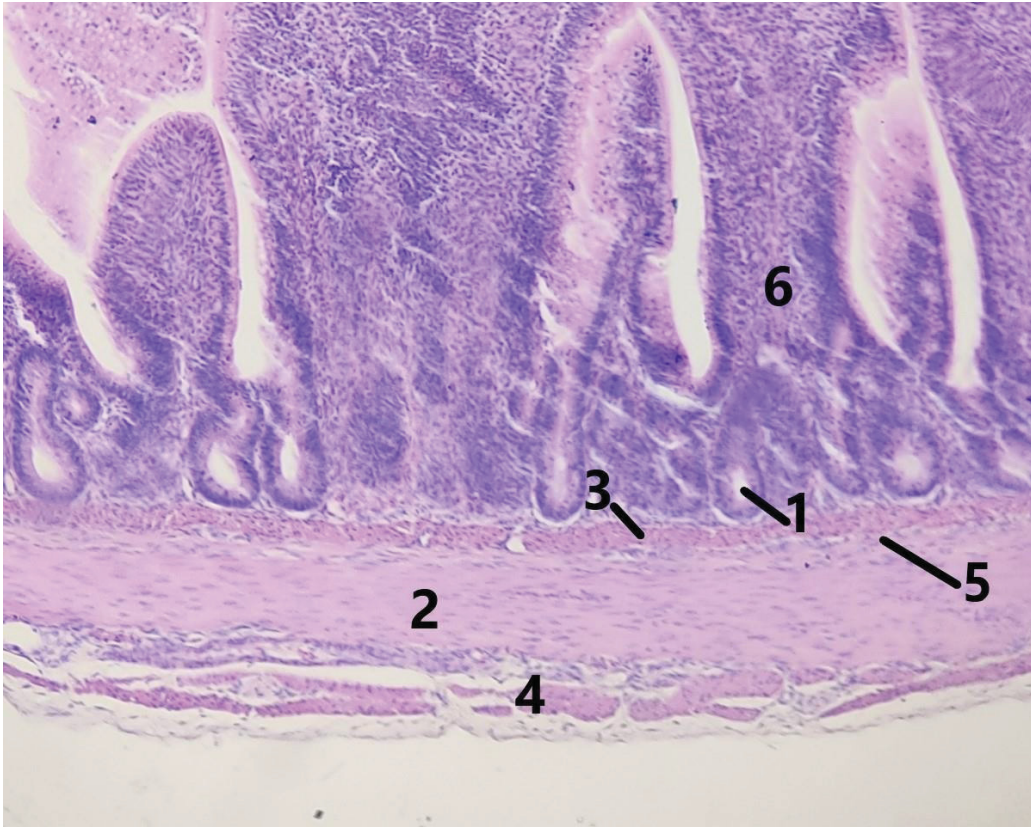


FIGURA 1 - Corte histológico do duodeno de um frango de corte de 39 dias, sendo identificadas as seguintes estruturas: vilosidades (6), criptas de Lieberkuhn (1), muscular da mucosa (3), submucosa (5), muscular externa (4) e musculatura interna longitudinal (2).
Fonte: A autora (2022).

A mucosa do intestino é formada por uma camada de epitélio simples colunar, e formam um grande número de vilos, que variam de número, tamanho e forma de acordo com a região. Esses vão diminuindo de tamanho alargando-se gradualmente em direção aos cecos (JUNIOR E BACHA, 2012). Os vilos são protuberâncias da lâmina própria no lúmen intestinal que servem para ampliar a digestão e área de absorção (YAMAUCHI, 2002).

Os vilos são constituídos por três tipos de células, funcionalmente distintas: enterócitos, células caliciformes e as células enteroendócrinas. O tamanho das vilosidades, bem como o de microvilos, em cada segmento do intestino delgado, conferem a eles características próprias, sendo que na presença de nutrientes a capacidade absorptiva do segmento será diretamente proporcional ao tamanho dos vilos (MACARI, 1999). Sousa et al. (2015), afirmam que vilos intestinais tornam-se curtos e largos à medida que se aproxima o término do tubo digestório.

Essa característica é observada na mucosa do intestino delgado, já que esta torna-se mais delgada no sentido do duodeno para o íleo. Assim as vilosidades se tornam mais curtas e a profundidade das criptas diminuem (DUKE et al., 2007).

Os enterócitos são células que respondem pela digestão final do alimento e pelo transporte transepitelial dos nutrientes a partir do lúmen, dito isso um fator relevante para a absorção de nutrientes, é a quantidade de microvilos presentes nessas células, pois atuam como amplificador de área para a absorção dos nutrientes (MAIORKA, 2004).

As células caliciformes são secretoras de glicoproteínas, que tem a função de proteger o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta. As células enteroendócrinas são produtoras de hormônios peptídicos (gastrina, secretina e colecistoquinina) e monoaminas biogênicas, substâncias essas que participam na regulação da digestão, absorção e utilização dos nutrientes (MAIORKA, 2004).

Mediante a essas informações, quanto maior for o número de células, maior será o tamanho dos vilos e por consequência, maior será a área de absorção dos nutrientes. A mucosa intestinal tem crescimento contínuo, sendo afetada tanto pelos nutrientes da dieta (características físicas e químicas), como pelos níveis de hormônios circulantes (insulina, tiroxina, triodotironina, IGF-I, colecistoquinina, entre outros. Agressões intestinais, por agente infecciosos, também atuam na taxa e velocidade de crescimento das células da mucosa intestinal sendo fatores importantes que modificam a morfofisiologia intestinal (MAIORKA et al., 2000).

2.3 MORFOMETRIA INTESTINAL

2.3.1 Definição e conceito

A morfometria define-se pela fusão de geometria e biologia, e atua nos estudo das formas em duas ou três dimensões (Richtsmeier et al., 2002) Enquanto a morfologia se refere ao estudo das relações estruturais entre diferentes partes ou aspectos do objeto de estudo (ÁLVAREZ e RITCHEY, 2015), incluindo, portanto, aspectos como formas, tamanhos, estruturas, e

aplicando-se aqui métodos estatísticos de análise, abre-se para a morfometria um grande leque de possibilidades de estudos, onde, como aponta Zelditch et al. (2004), a morfometria pode ser definida como uma medida quantitativa de comparação de formas e suas correlações, com informações extraídas através de operações matemáticas. Métodos morfométricos de estudos de formas e dimensões podem ser aplicados em vários campos, biológicos ou não.

A histomorfometria apresenta-se difundida e aplicada em todo o contexto de nutrição animal, principalmente no que se refere à introdução de novos alimentos na produção de aves, buscando avaliar as condições morfológicas intestinais ligadas diretamente a capacidade de absorção dos componentes nutritivos e os possíveis efeitos nocivos desses novos componentes alimentares (IJI, SAKI e TIVEY, 2001; SILVA et al., 2011; ZHANG et al., 2005).

O trato intestinal é um sistema de órgão desafiador, pois representa um tubo muscular convoluto, delicado de parede muito fina e complexa. Também sofre autólise rápida e descamação do epitélio imediatamente após a morte. Existem vários fatores que complicam sua amostragem e exame, incluindo sua propensão a sofrer contração das vilosidades, sua célula tem alta taxa de renovação (POTTEN, 1990; BARKER et al., 2007), e um lúmen central carregado com digesta, enzimas digestivas e bactérias.

Portanto, todo esforço deve ser feito para minimizar e padronizar o tempo decorrido entre a morte do animal e a fixação do tecido para que as mudanças autolíticas não sejam mal interpretadas como mudanças patológicas genuínas. Resumidamente a autólise resulta em colapso celular com consequências de mudanças estruturais que muitas vezes distorcem a linha entre os processos naturais e patológicos. No entanto, muitas vezes a autólise ocorre da mesma maneira, comprometendo os resultados das características morfológicas e até mesmo da morfometria e não há muitos estudos referentes a métodos que auxiliem na melhor visualização histológica dos intestinos (CARSON E HLADIK, 2009; COOPER, 2012; ELMORE, 2007; ROE, GARTRELL E HUNTER, 2012; STERNE, TITLEY E CHRISTIE, 2000; TAVICHAKORNTRAKOOL et al., 2008).

2.3.2 Procedimentos morfométricos e técnica para aplicação

O objetivo de estudo de morfometria intestinal deve considerar que para maior eficiência de absorção de nutrientes, deseja-se encontrar vilosidades altas enquanto as criptas são rasas, ampliando assim a área disponível para absorção (CUNNINGHAM, 2004). Na literatura podemos encontrar diferentes técnicas para aplicação de medidas morfológicas, entre as quais as seguintes são citadas no trabalho de Hamilton e Allen (1995):

- Medições Lineares: a medição entre dois pontos de análise, utilizando réguas ou escalas, com ou sem uso de microscópio, sendo a técnica rotineiramente mais utilizada (FIGURA 2).

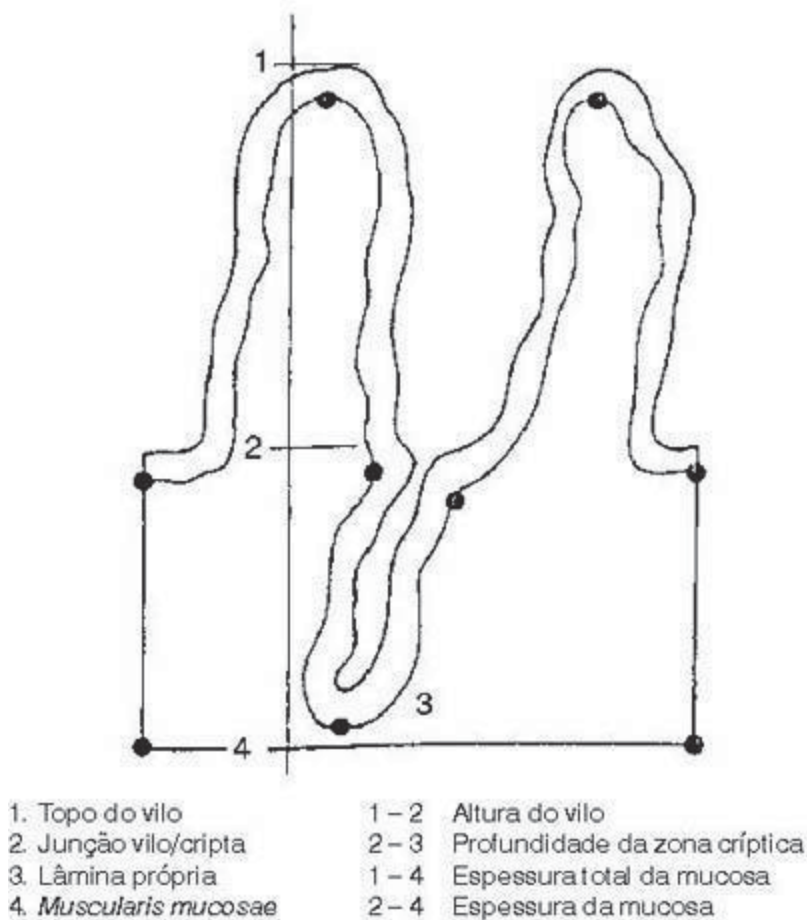


FIGURA 2 - Características avaliadas na mucosa do intestino delgado através de régua micrométrica e morfometria computadorizada, em 100x aumentos. Fonte: Pires et al. (2003).

- Medições Geométricas: baseada em probabilidades, permitindo análises de área e volumes, contando pontos ou intersecções com gabaritos pré-determinados.
- Sistemas Computadorizados Interativos: Utilizando ferramentas de desenho acopladas a um computador, permitindo recriar o objeto a ser estudado de forma digital.
- Capturas de imagens: São sistemas computadorizados capazes de capturar e interpretar os objetos que serão contatos, sem intervenção direta de um operador humano.

Na literatura, vários trabalhos utilizam da histomorfometria para analisar aspectos morfológicos do intestino delgado de frangos de corte como Ramos et al. (2011), Rocha et al. (2016) e Fernandes et al. (2017). Para que isso aconteça é necessário o processamento histológico de rotina, ou seja, a coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia e coloração. Sabe-se que imediatamente após a remoção do tecido é essencial a imersão em solução fixadora para interromper o processo de autólise e manter as estruturas celulares praticamente intactas (NUNES et al., 2016).

Uma preparação histológica de qualidade exige uma fixação completa e adequada, por meio desta, anseia-se pela preservação dos componentes celulares e tissulares, inibindo autólise tecidual, coagulação ou endurecimento do tecido, o que resulta em uma visão óptica apropriada e facilitação da subsequente coloração (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Os fixadores devem preservar a morfologia e os constituintes teciduais, de tal forma que se assemelhe ao *in vivo*, portanto os mesmos, não devem retrair, distorcer, endurecer excessivamente ou corromper qualquer componente tecidual que prejudique a observação microscópica (GRIZZE, FREDENBURGH e MYERS, 2008).

A fixação química tem seus agentes fixadores divididos em duas categorias: os fixadores coagulantes, que não se ligam às proteínas dos tecidos, e os não coagulantes, que se ligam e precipitam as proteínas (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Os reagentes mais utilizados nos fixadores não coagulantes são o cloreto de mercúrio e o ácido pícrico. Já os fixadores

coagulantes mais utilizados são o formaldeído, tetróxido de ósmio e o glutaraldeído (SOUZA JUNIOR, 2010).

Embora o formol tenha sido classificado como reagente carcinogênico pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 2004), por desenvolver neoplasias no trato respiratório dos manipuladores (HAUPTMANN, LUBIN e STWART, 2003), BEHMER et al. (2003) afirma que o formol, ainda é tido como o fixador mais utilizado e permite que os tecidos permaneçam até dez anos sem grandes modificações, mesmo que não preserve as estruturas celulares da melhor forma.

2.2.2.1 Dificuldades e erro na técnica

Pode-se obter diversas respostas através de medidas morfométricas em corpos biológicos. A questão relevante nessas análises é definir conceitualmente como e o que deve ser medido e como a análise matemática deve ser efetuada. Como exemplo, análises geométricas e lineares de amostras morfométricas mostram resultados diferentes, enquanto análise estatística multivariável são similares. Comparando essas duas formas, é notável como uma diferença na técnica de coleta pode resultar em análises diferentes. (PARÉS-CASANOVA E REIG, 2015).

Apesar dos diversos estudos e pesquisas realizados sobre morfometria intestinal, a maioria não é clara ou explícita com relação aos procedimentos metodológicos aplicados. São deixados sem tratamento importantes dados referentes a tempo entre abate e coleta de amostra, formas de segmentação, critérios de mensuração de estruturas (ALVARENGA et al., 2004; FUKAYAMA et al.; 2005, OKAMOTO et al., 2009; SHIRAISHI et al., 2009).

Pode-se citar, como contra exemplo, Caruso e Demonte (2005), no seu trabalho de morfometria de intestino delgado de ratos, quando os autores apresentaram dados precisos e relevantes como tempo entre a coleta e fixação de amostras, técnicas e métodos de medida, qualidade, quantidade e densidade de vilos e criptas por indivíduo. Visando isso, este projeto tem como objetivo avaliar uma forma de coleta mais eficiente na qualidade de avaliação de morfometria intestinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-AZIZ, T.; FLETCHER, O.J.; BARNES, H.J. **Avian Histopathology**. 4^a ed., American Association of Avian Pathologists, 2021.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA - **Relatório Anual ABPA 2020**. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf. Acesso em 10/03/2021.

ALMEIDA, M.A. Struthioniformes (Ema, Avestruz) In: CUBAS Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária. Editora Roca, São Paulo, 2006.

ALVARENGA, B.O.; BELLETTI, M.E.; FERNANDES, E.A.; SILVA, M.M.; CAMPOS, L.F.B.; RAMOS, S.P. Efeitos de fontes alternativas de fósforo nas rações de engorda e abate sobre a morfologia intestinal de frangos de corte. **Bioscience Journal**, v.20, n.3,p.55-59, 2004.

ÁLVAREZ, A.; RITCHEY T. Applications of General Morphological Analysis. **Acta Morphologica Generalis**, v.4, n.1, p.1-40, 2015.

ARENT, L.R. **Anatomia e fisiologia das aves**. In: COLVILLE, T. BASSERT, J. M. Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária. 2^a ed., cap. 19. p.414-454. Elsevier, 2010.

BARKER, N.; VAN ES, J.H.; KUIPERS, J.; KUJALA, P.; VAN DEN BORN, M.; ET AL. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, v.449, p.1003-1007,2007.

BARRETO, M.S.R. **Uso de extratos vegetais como promotores do crescimento em frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 16f, 2007.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F.; RODRIGUES, C.J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2^a ed., Manole, São Paulo, 2003.

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. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, 2008.

BERTECHINI, A.G. **Nutrição de monogstricos**. 3^a ed., Lavras: UFLA, 2012.

CARVALHO, M.M; PIERI, N.C.G.; PEREIRA, K.F.; LIMA. F.C.; CARNIATTO, C.H.O.; MIGLINO, M.A.; RICCI, R.E.; MARTINS, D.S. Caracterização comparativa do intestino das espécies da Ordem Xenarthra. **Brazilian Journal of veterinary research**, v.34, 2014.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L.B.; MANSO, P. P.A. **Técnicas histológicas**. In: Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. EPSJV, Rio de Janeiro, 2010.

CARSON, F.L, HLADIK, C. **Histotechnology: a self-instructional text**. 3ª ed., Society for Clinical Pathology Press, Hong Kong, 2009.

CARUSO M, DEMONTE A. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes protéicas. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.2, p.131-133, 2005.

CONSINS, R.J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiology Review**, n.65, p. 238- 309, 1985.

COOPER, J.E. The estimation of post-mortem interval (PMI) in reptiles and amphibians: current knowledge and needs. **Journal of Herpetology**, v. 22, p.91–96, 2012.

CUBAS Z.S.; SILVA J.C.R.; CATÃO-DIAS J.L. **Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária**. Editora Roca, São Paulo, 2006.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinaria**. 3ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

DUKE, E.K.; PURCELL-GATES, V.; HALL, L.A.; TOWER, C. Authentic literacy activities for developing comprehension and writing. **The Reading Teacher**, v.60, n.4, p. 344-355, 2007.

DYCE, K.M.; WENSING, C.J.G.; SACK, W.O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4ª ed., Elsevier Saunders, Rio de Janeiro, 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, p.495–516, 2007.

ERRASTI, J.; ERRO, J.M.; CERMEÑO, B.; PEÑA, J.; MARTINEZ, C.; VIANA, M., et al. Diverticulo de Meckel. **Cir Esp**, n.55, p. 28-31, 1994.

FERNANDES, J.I.M.; GONÇALVES, D.R.M.; RIFFEL, E.T.; VANROO, E; LIMA, F.K.; BROCH, J. Effect of Oral supplement for chicks subjected to termal oscillation on performance and intestinal morphometry. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v.39, n. 4, p.385-392, 2017.

FUKAYAMA, E.H.; BERTECHINI, A.G.; GERALDO, A.; KATO, R.K., MURGAS, L.D.S. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de zootecnia**, v.34, n.6, p.2316-2326, 2005.

GRIZZLE, W.; FREDENBURGH, J.; MYERS, R. Fixation of Tissues.In: In book: Theory and Practice of Histological Technique. 6ª ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 2008.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **Journal of pathology**, v.175, n.4, p.369-379, 1995.

HAUPTMANN, M.; LUBIN, J.H.; STEWART, P.A.; HAYES, R.B.; BLAIR, A. Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. **American Journal of epidemiology**, v.159, p.1117-1130, 2004.

HIATT, J.L.; GARTNER, L.P. **Tratado de histologia**. Editora Campus, Rio de Janeiro, 2007.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 83, IARC Press, Lyon, 2004.

IJI, P.A.; SAKI, A.A.; TIVEY, D.R. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannanoligosaccharide. **Science of food and agriculture**, v.81, n.12, p.1186-1192, 2001.

JUNIOR, W.J.B.; BACHA, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. 3ª ed. John Wiley and Sons, Hoboken, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto/atlas**. 11ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

KING, A.S. **Introdução às Aves**. In: GETTY, R. Anatomia dos Animais Domésticos. Vol.2, 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1986.

LESER, T.D.; MOLBAK, L. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. **Environ Microbiology**, v.11, n.9, p.2194-2206, 2009.

KONIG, H.E.; KORBEL, R.; LIEBECH, H.G. **Digestory System (apparatus digestorius)**. In: Avian Anatomy: Textbook and Color Atlas. 2ª ed. Cap. 6. P.92-118. Sheffield, 2016.

MACARI, M. Fisiologia do sistema digestivo das aves (II). **Aves e Ovos**, v.15, n.10, p.2-20, 1999.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Estudo sobre uso de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre desenvolvimento das vilosidades intestinais. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, **Anais [...]** Campinas, SP, p. 170, 2000.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: V Simpósio Brasil Sul de Avicultura. **Anais [...]**, Chapeco, p. 119-129, 2004.

MAIORKA, A.; SANTIN E.; FISCHER, A.V.S.; BRUNO L.D.G, BOLELI I.C.; MACARI, M. Desenvolvimento do trato gastrointestinal de embriões oriundos de matrizes pesadas de 30 e 60 semanas de idade. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 141-148, 2000.

MCLELLAND, J. **Sistema Digestivo das Aves**. In: Grossman, J.D., Sisson, S., Getty, R. Anatomia dos animais domésticos. 5ª ed., Guanabara Koongan, Rio de Janeiro, 1975.

MCBRIDE BW, KELLY JM. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2997- 3010, 1990.

MENDES, A.A.; NAAS, I; MACARI, M. **Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais**. In: Produção de frangos de corte. FACTA, Campinas, 2004.

MITCHELL, M.A.; TULLY JR, T.N. **Manual of Exotic Pet Practice**. Elsevier Saunders, Saint Louis, 2009.

MORI, A. **Relação entre o ensaio de digestibilidade de nutrientes e a integridade intestinal de frangos de corte submetidos a desafios químicos e microbiológicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 44f., 2008.

NOY Y.; SKLAN D. Metabolic responses to early nutrition. **Journal Applied Poultry Research**, v.7, p.437-451, 1998.

NUNES, C.L.; CINSA, L.A. Princípios do processamento histológico de rotina. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**. v.08, p.31-40, 2016.

OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; MOUJAIM, J.C. Histopatologia da mucosa intestinal de pintos tratados com *Lactobacillus spp.* e desafiadas com *Salmonella entérica*, Subespécie *entérica*, Sorotipo *Enteritidis*. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.568-573, 2009.

BOUHET, S.; OSWALD, I.P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 1-2, p. 199-209, 2005.

PARÉS-CASANOVA, P.M.; REIG, E. Directional and fluctuating asymmetries in Cavall Pirinenc Català breed molars. **Journal of Animal Ethnology**, v.1, p.10-18, 2015.

PIRES, A.L.G.; SILVEIRA, T.R.; SILVA, V.D. Estudo morfométrico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente. **Jornal de pediatria**, v.79, n.4, 2003.

POTTEN, C.S.; LOEFFER, M. Stem Cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. **Lessons Form the crypt. Development**, v. 110, p. 1001-1020,1990.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD F.C. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 10^a ed., Blackwell Publishing, Oxford, 2010.

RAMOS, L.S.N; LOPES, J.B.; SILVA, S.M.M.S.; SILVA, F.E.S.; RIBEIRO, M.N. Desempenho e histomorfometria intestinal de frangos de corte de 1 a 21 dias recebendo melhoradores de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.8, p.1738-1744,2011.

RICHTSMEIER, J.T.; DELEON, V.B.; LELE, S.R. The promise of geometric morphometrics. **American Journal of Physical Anthropology**. v.45, p.63-91, 2002.

RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: Principles and Application**. Wingers Publishing, Florida, 1994.

ROCHA, P.M.C.; BARROS, M.E.G.; NETO, J.E. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102. **Pesquisa veterinária brasileira**. v. 36, n.4, p.312-316., 2016.

ROE WD, GARTRELL BD, HUNTER SA. Freezing and thawing of pinniped carcasses results in artifacts that resemble traumatic lesions. **Veterinary Journal**, v.194, p.326–331, 2012.

SHIRAIISHI, C.S.; AZEVEDO, J.F.; SILVA, A.V.; SANT'ANA, D.B.G.; ARAUJO, E.J.A. Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v.39, p.2146-2153, 2009.

SILVA, J.C.R.; RABELO, C.B.V.; LOPES, C.C.; JÚNIOR, V.A.S.; SILVA, D.A.T.; ARRUDA, E.M.F. Sugar cane yeast in the diet of laying hens and effects on intestinal morphology. **Poultry Science**, v.90. n. 1, p. 146-147, 2011.

SOUZA, C. S.; VIEITES, F. M.; JUSTINO, L. R.; LIMA, M. F. de; CHAVES, A. S.; CARDOSO, V. S.; SOUSA, F. D. R.; COSTA, T. F.; MINAFRA, C. S.; LIMA, C. A. R. Importance of intestinal health in broilers. **Research, Society and Development**, v.9, n.3, p.1-18, 2020.

SOUSA D.C.; OLIVEIRA, N.L.A.; SANTOS, E.T.; GUZZI, A.; DOURADO, L.R.B. FERREIRA, G.J.B.C. Morphological characterization of the gastrointestinal tract of Cobb 500® broiler. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.1, p.61-68, 2015.

SOUZA JUNIOR, J. C. **Controle de qualidade em lâminas histológicas: importância da metodologia de H/E no diagnóstico médico**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)– Faculdades Integradas FAFIBE, Bebedouro, São Paulo, 34f, 2010.

STERNE, G.D.; TITLEY, O.G.; CHRISTIE J.L. A qualitative assessment of various storage conditions on short term preservation of human split skin grafts. **British Journal of Plastic Surgery**, v.53, p.331–336, 2000.

TAVICHAKORNTRAKOOL, R.; PRASONGWATTANA, V.; SRIBOONLUE, P., PUAPAIROJ, A., PONGSKUL, J.; KHUNTIKEO, N.; HANPANICH, W.; et al. Serial analyses of postmortem changes in human skeletal muscle: A case study of alterations in proteome profile, histology, electrolyte contents, water composition, and enzyme activity. **Proteomics Clinical Applications**, v.2, n.9, p.1255-1264, 2008.

WERTHER, K. **Columbiformes** (Pomba, Rolinha, Avoante, Juriti). In: CUBAS Z. S.; SILVA J. C. R.; CATÃO-DIAS J. L. *Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária*. Editora Roca, São Paulo, 2006.

YAMAUCHI, K. review on chicken intestinal villus histological alterations related with intestinal function. **Jornal of poultry Science**, v. 39, p.229-242, 2002.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5^a ed., Elsevier Saunders, Saint Louis, 2013.

ZELDITCH, M.L; SWIDERSKI, D.L.; SHEETS, H.D. **Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer**. Elsevier Academic Press, Boston, MA, 2004.

ZHANG, W.; LEE, B.D.; LEE, S.K.; LEE, K.W.; AN, G.H.; SONG, K.B.; LEE, C.H. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, n.7, p.1015-1021, 2005.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar diferentes métodos de coleta e processamento do jejuno de frangos de corte, visando encontrar a melhor técnica de processamento para a histomorfometria.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Contabilizar o número de vilosidades aptas para aferição do comprimento de vilosidades e cripta;
- Avaliar a capacidade da muscular intestinal e do comprimento da mucosa
- Avaliar se a técnica de coleta influi na qualidade e viabilidade da amostra;
- Avaliar se a técnica de coleta influi na qualidade do exame morfométrico;
- Avaliar se a manipulação do tecido interfere na qualidade da amostra;
- Analisar se a temperatura do formol interfere na qualidade da amostra para morfometria;

4. CAPITULO 1

Artigo intitulado: Metodologia para comparação de procedimentos de coleta e processamento para a integridade intestinal de frangos de corte visando a avaliação histomorfométrica.

METODOLOGIA PARA COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS DE COLETA E PROCESSAMENTO PARA A INTEGRIDADE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE VISANDO A AVALIAÇÃO HISTOMORFOMETRICA

Joana Cristina Smaha de Jesus Lima^{1*}, Crisan Smaniotto², Arthur Colombari Cheng³, Alessandra da Cruz⁴; Carolina Fontana⁵; Karim Cristhine Pase Montagnini⁶; Marina Berón⁷, Vinicius Dahm⁸; Lorena Pinheiro⁹, Danieli Starke¹⁰, Nicolle Glaeser Pelosie¹¹, Elisabete Takiuchi¹², Aline de Marco Viott¹³

RESUMO: As características morfológicas do intestino delgado são de suma importância para a avicultura, e diversos estudos baseiam-se na histomorfometria como método auxiliar de avaliação. A histomorfometria, por sua vez, avalia as estruturas do intestino correlacionando a morfologia intestinal com a capacidade de absorção de novos alimentos. No entanto, muitas vezes este processo fica comprometido devido a autólise e alterações morfológicas destas estruturas em decorrência de falhas de coleta e processamento. Objetiva-se com este estudo, comparar diferentes métodos de coleta e processamento do jejuno de frangos de corte, visando encontrar a melhor técnica de processamento para a histomorfometria. Foram utilizados 55 frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*), com 39 dias de vida, tratados com ração comercial e água *ad libitum*, os quais não foram submetidos a um desafio sanitário. As aves foram eutanasiadas e posteriormente coletou-se um fragmento de 7cm de jejuno. O fixador utilizado foi formol a 10%. Esses segmentos de intestino foram submetidos a 11 técnicas com cinco animais cada, sendo eles: 1) aberto e fixado rapidamente; 2) fixado na forma de tubo e clivado na forma circular após 4 horas; 3) fixado na forma de tubo e clivado na forma circular após 6 horas; 4) aberto e lavado em formol antes da fixação; 5) aberto e limpo delicadamente com tesoura; 6) aberto e fixado em isopor em 4 extremidades; 7) aberto e fixado em isopor em 4 extremidades e lavado com formol 10% 4°C; 8) aberto e fixado em formol a 10% a 4° C; 9) fixado na forma de tubo com clivagem circular das extremidades; 10) fechado e lúmen lavado com formol e 11) amarrado às extremidades e inoculado com 4 ml de formol. Todas as amostras foram processadas para coloração de hematoxilina e eosina 48 horas após a coleta. Após processamento histológico, de cada amostra foi contabilizada o número de vilosidades aptas para aferição do comprimento de vilosidades e comprimento de cripta além da capacidade de avaliação da muscular intestinal e do comprimento total da mucosa. Na histologia foram descartadas as vilosidades autolisadas, dobradas, sobrepostas e partidas pelo processamento. A mediana das vilosidades obtida de cada técnica foi submetida a um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial negativa (MLG-NB). Os dados contínuos foram então submetidos ao teste de Tukey com valor de significância de $p < 0,05$. As técnicas diferiram quanto a contagem média de vilosidade e cripta. Para ambos os casos, a técnica 1 teve médias estimadas comparáveis as técnicas 4 e 5, distinguindo-se dos demais. Todas as técnicas possibilitaram a realização da aferição da espessura da camada muscular e da espessura total da mucosa. Dessa forma conclui-se que a metodologia empregada na coleta influenciou na qualidade da amostra submetida a morfometria, e que técnicas de coleta que fixam o intestino aberto e com menor manipulação da amostra apresentam resultados mais satisfatórios para a avaliação morfométrica.

Palavras-chave: Avicultura, Criptas, Histopatologia, Mucosa, Vilos.

4.1 INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira vem sendo uma das áreas mais tecnificadas do agronegócio mundial, tendo produções eficientes que objetivam o desempenho máximo das aves. Esses índices elevados de produção exigem uma constante busca para a manutenção de um “status” sanitários na cadeia produtiva, com o objetivo de impedir a quebra deste potencial produtivo. Dentre os principais fatores produtivos está a nutrição adequada e a manutenção de um bom status sanitário, principalmente no que rege a manutenção da saúde intestinal. Com a crescente preocupação com a saúde intestinal das aves tem sido realizados diversos estudos envolvendo a análise morfométrica do intestino (Gava, 2012).

O conhecimento das características macro e microscópicas do aparelho digestório é considerada indispensável antes do aprofundamento no estudo dos distintos mecanismos de absorção, relata Gallego e Rus (1987). O epitélio intestinal serve como uma barreira dinâmica, a qual, no decurso do seu funcionamento normal, mantém regulada a absorção de nutrientes e água, excluindo os potenciais agentes patogênicos (Bouhet e Oswald, 2005).

Apesar de amplamente utilizada a avaliação histomorfométrica do intestino das aves e de outras espécies de produção, apresentam inúmeras divergências quanto aos métodos de tempo e técnica de coleta, metodologia de fixação e processamento das amostras (Gava, 2012). Essas discordâncias acabam por afetar a qualidade da técnica e muitas inviabilizam a aplicação da mesma em amostra coletadas principalmente em experimentos acarretando perda de tempo, recursos e dados.

Dessa forma o presente estudo teve como objetivo descrever a metodologia de comparação de procedimentos de coleta e processamento para a integridade tecidual de intestinos (jejuno) de frangos de corte não desafiados.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Bioética

Para a eutanásia das aves, foi seguida a resolução nº 1000/2012 do CFMV, conforme o protocolo. Este trabalho utilizou aves de um projeto de pesquisa aprovado pela comissão de ética no uso de animais do setor Palotina da UFPR(CEUA/Palotina), protocolo n 18/2020.

4.2.2 Animais

Foram utilizadas o total de 55 aves domésticas (*Gallus Gallus domesticus*), selecionadas aleatoriamente no aviário da Fazenda Experimental, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, as quais não foram submetidas a desafio sanitário. As aves tinham 39 dias de vida, tratadas com água *ad libitum* e ração comercial.

4.2.3 Coleta das amostras

Após a eutanásia foram coletadas amostras de jejuno com aproximadamente 7cm de comprimento. Essa coleta foi realizada no máximo 5 min após a morte do animal. Foram utilizadas 11 diferentes técnicas de coletas (TABELA 1) sendo que cada técnica foi composta por cinco aves cada. O fixador de escolha foi o formol tamponado a 10% em temperatura ambiente para as

técnicas de 1 a 6 (FIGURA 3A) e de 9 a 11 (FIGURA 3B e 3C) nas técnicas 7 e 8 utilizou-se formol a 10% a 4 °C.

Técnicas	Código	N galinhas
Segmento aberto e fixado rapidamente em formol a 10%	1	5
Fixado na forma de tubo e clivado na forma transversal (circular) 4 horas após a coleta	2	5
Fixado na forma de tubo e clivado na forma transversal (circular) 6 horas após a coleta	3	5
Aberto e lavado em formol 10% com pisseta antes da fixação	4	5
Aberto e limpo delicadamente com tesoura antes da fixação	5	5
Aberto e fixado em isopor em 4 extremidades com alfinetes	6	5
Aberto e fixado em isopor em 4 extremidades com alfinetes e lavado com formol 10% 4°C antes da fixação no mesmo fixados	7	5
Aberto e fixado em formol a 10% a 4°C	8	5
Fixado na forma de tubo com clivagem transversal (circular) das extremidades	9	5
Fixado na forma de tubo e com lúmen lavado com formol	10	5
Fechado na forma de tubo, amarrado às extremidades e inoculado com 3 ml de formol a 10%	11	5
Total		55

TABELA 1 - Técnicas com seus respectivos códigos e quantidades de unidades experimentais (N).

Fonte: A autora (2022)

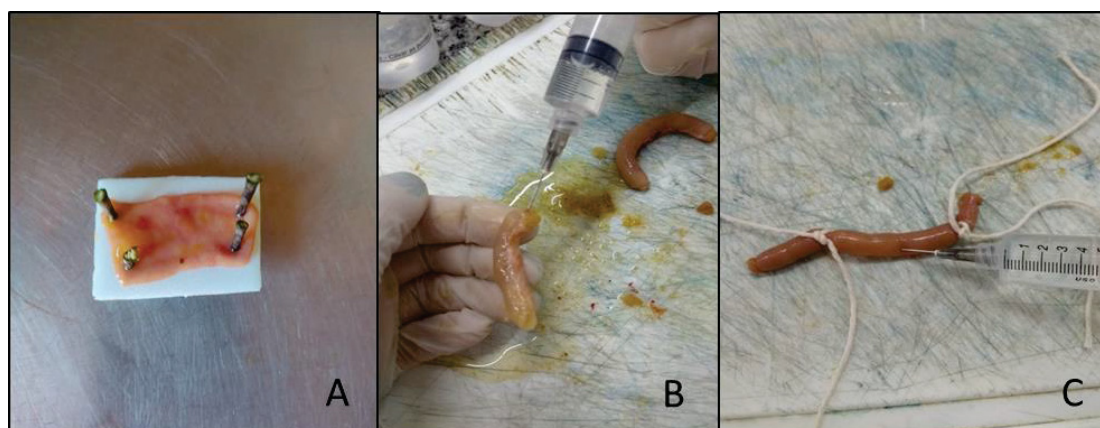


FIGURA 3 - A) Procedimento realizado referente a técnica 6, onde coletou-se um fragmento de jejunum aberto delicadamente com uma tesoura ponta fina e

posteriormente exposto em uma superfície, sendo fixado com alfinete em quatro extremidades; B) Procedimento realizado referente a técnica 10, onde coletou-se um fragmento de jejuno fechado e lavou-se o lúmen com 1mL de formaldeído a 10%; C) Técnica de coleta referente a técnica 11, onde amarrou-se ambas as extremidades do jejuno com um barbante, e injetou-se aproximadamente 3mL de formaldeído 10% no lúmen.

Fonte: A autora (2021).

4.2.4 Processamento histológico

Todas as amostras de intestino foram processadas 48H após a fixação. Os tecidos foram processados pela técnica histológica rotineira de desidratação e inclusão em parafina (clivadas, armazenadas em cassetes histológicos e submetidas a banhos em diferentes concentrações de álcool e xilol). Os tecidos parafinizados foram seccionados em 5 micras (μm) de espessura em micrótomo Leica® modelo Rm2245, as lâminas foram montadas segundo a técnica de rotina em parafina e corados pela técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE), para avaliação sob microscópio de luz (Falkeholm et al., 2001).

4.2.5 Avaliação histológica e contagem histomorfométrica

Utilizando-se um microscópio óptico com objetiva de 10X, foram realizadas as contagens de vilosidades e criptas aptas para avaliação morfométrica. O número total observável foi determinado em cada técnica e devidamente registrado. As vilosidades, obliquas, sobrepostas, partidas e que apresentassem o ápice das vilosidades autolizadas foram descartadas. Só foram contabilizados os vilos íntegros sendo que esses se caracterizavam por apresentar uma base de inserção clara na submucosa intestinal, sem as alterações de coleta e processamento citadas acima e com um ápice claro onde

se evidenciava-se um epitélio colunar simples. As criptas más demarcadas e tortuosas também não foram contabilizadas.

Para avaliar a espessura da parede do intestino utilizamos cinco porções de cada corte, onde mediu-se a altura do ápice do vilo até a serosa do órgão. Quando o fragmento de corte contemplava essa característica, o corte era caracterizado como apto a avaliação morfométrica. Os mesmos foram realizados na camada muscular, essa aferição se estendeu desde a submucosa até a serosa do órgão.

4.2.6 Avaliação estatística

A mediana e o os valores mínimos e máximos foram usados para descrever as técnicas. Em seguida, um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial negativa (MLG-NB) foi implementado para permitir a análise de dados não lineares (contagens), não normais e superdispersos (contagens com variância maior do que o esperado para uma distribuição de Poisson). O modelo atendeu aos pressupostos de homogeneidade de variância e distribuição de resíduos. ANOVA tipo II foi utilizada para testar a hipótese da ausência de diferenças entre as médias estimadas pelo MLG-NB para as técnicas. O teste de Tukey foi utilizado para classificar as técnicas que apresentam valores distintos da técnica 1. O valor de significância considerado para todos os testes foi de 0,05. A quantidade de variação nas contagens de vilosidade e cripta que é explicado pelas técnicas foi calculado via “Desvio explicado”, que é a diferença entre o valor amostrado e o valor previsto por regressão. Os resultados foram tabulados e plotadas em gráficos com respectivas médias de contagens estimadas para cada técnica e o intervalo de confiança de 95% (IC95%). Estas análises foram realizadas baseadas em Zuur et al. (2009). Todas as análises

foram realizadas no software R 4.1.3 Os pacotes utilizados são *stats* (R Core Team, 2013), *Tidyverse* (Wickham et al., 2019), *car* (Fox e Weisberg, 2019), *glmmTMB* (Brooks et al., 2017), *MASS* (Venables e Ripley, 2002) e *emmeans* (The R package emmeans, Lenth, 2018).

5.3 RESULTADOS

As técnicas diferiram quanto a contagem média de vilosidade (Anova tipo II: LR Chisq = 102,3; DF = 10; $p < 0,001$) e cripta (Anova tipo II: LR Chisq = 90,499; DF = 10; $p < 0,001$). Para ambos os casos, a técnica 1 teve médias estimadas comparáveis as técnicas 4 e 5, distinguindo-se dos demais (TABELA 2; GRAFICOS 1 E 2).

Técnicas	Cripta		Vilosidade	
	Mediana	Média estimada	Mediana	Média estimada
	[min-max]	[IC 95%]	[min-max]	[IC 95%]
1	60[8-118]	58[33-100]	54[6-130]	58[23-148]
2	3[1-39]	10[5-18]	0[0-19]	4[1-11]
3	6[8-13]	5[2-10]	2[1-2]	1[0-5]
4	25[12-43]	26[14-45]	18[7-41]	20[8-52]
5	3[3-6]	8[4-15]	1[0-3]	1[0-4]
6	8[4-13]	4[2-8]	0[0-4]	1[0-3]
7	11[3-21]	11[6-19]	0[0-5]	1[0-3]
8	5[2-20]	9[5-17]	2[0-4]	1[0-5]
9	3[2-7]	3[1-7]	0[0-1]	0[0-1]
10	3[0-9]	4[2-9]	0[0-4]	1[0-4]

TABELA 2 - Valores de mediana, mais mínimo e máximo, e média estimada, com intervalo de confiança de 95% das contagens de cripta e vilosidade para cada técnica deste estudo.

Fonte: A autora (2022).

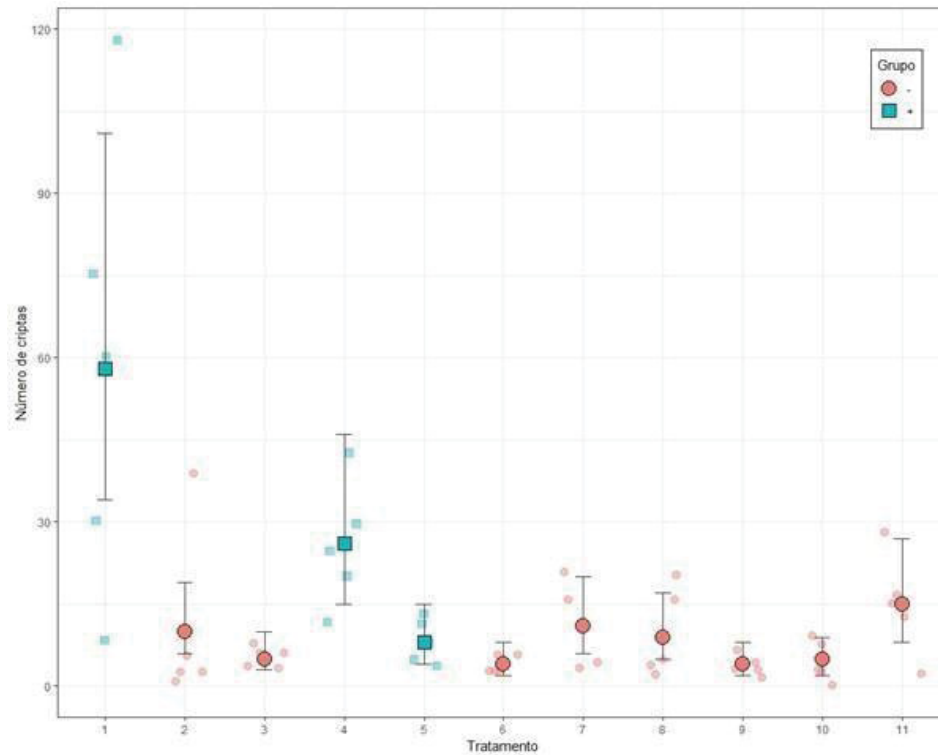


GRÁFICO 1 - Média±IC95% das contagens de cripta para as técnicas. As cores representam os grupos com maiores (azul/quadrado) e menores (bolinhas/vermelho) contagens médias.

Fonte: A autora (2022).

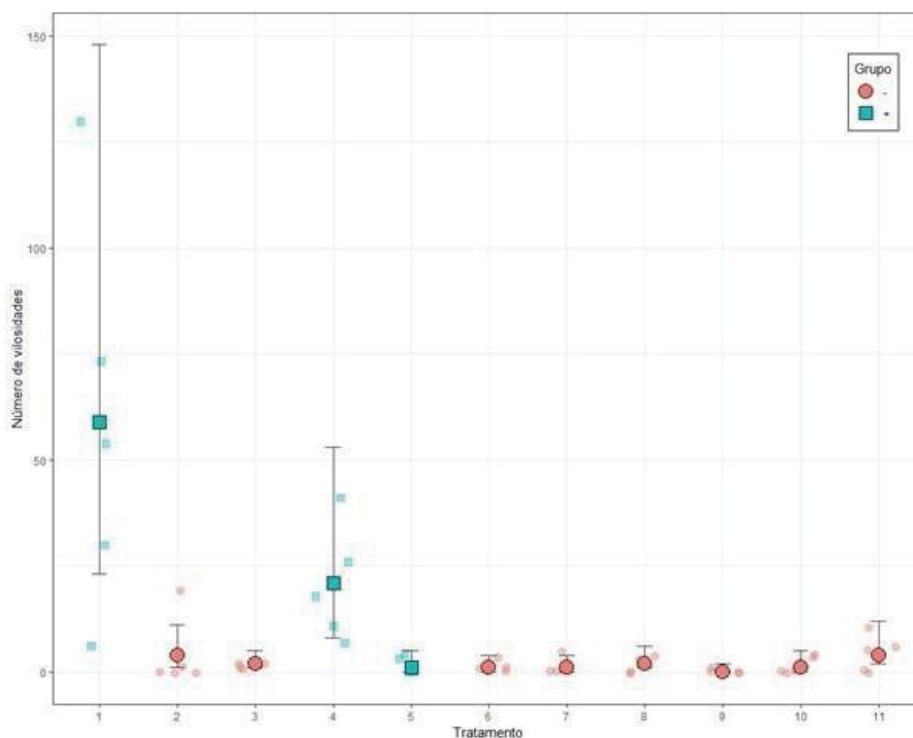


GRÁFICO 2 - Média±IC95% das contagens de vilosidade para as técnicas. As cores representam os grupos com maiores (azul/quadrado) e menores (bolinhas/vermelho) contagens médias.
 Fonte: A autora (2022).

A média das técnicas 1, 4 e 5 foram diferentes das demais técnicas. As técnicas demonstraram uma variação de 63,71% para variação de contagem de vilosidade e 61,65% para variação das contagens de cripta. As técnicas não influenciaram na espessura da mucosa intestinal e na espessura da musculatura do jejuno, sendo que em todas as amostras foi possível realizar essa mensuração.

Apesar de estatisticamente semelhantes às técnicas 4 e 5 apresentaram número de vilosidades e criptas aptas para morfometria ligeiramente inferiores a técnica 1 (FIGURA 4). Histologicamente, isso pode ser comprovado pela maior observação de vilosidades obliquas e sobrepostas.

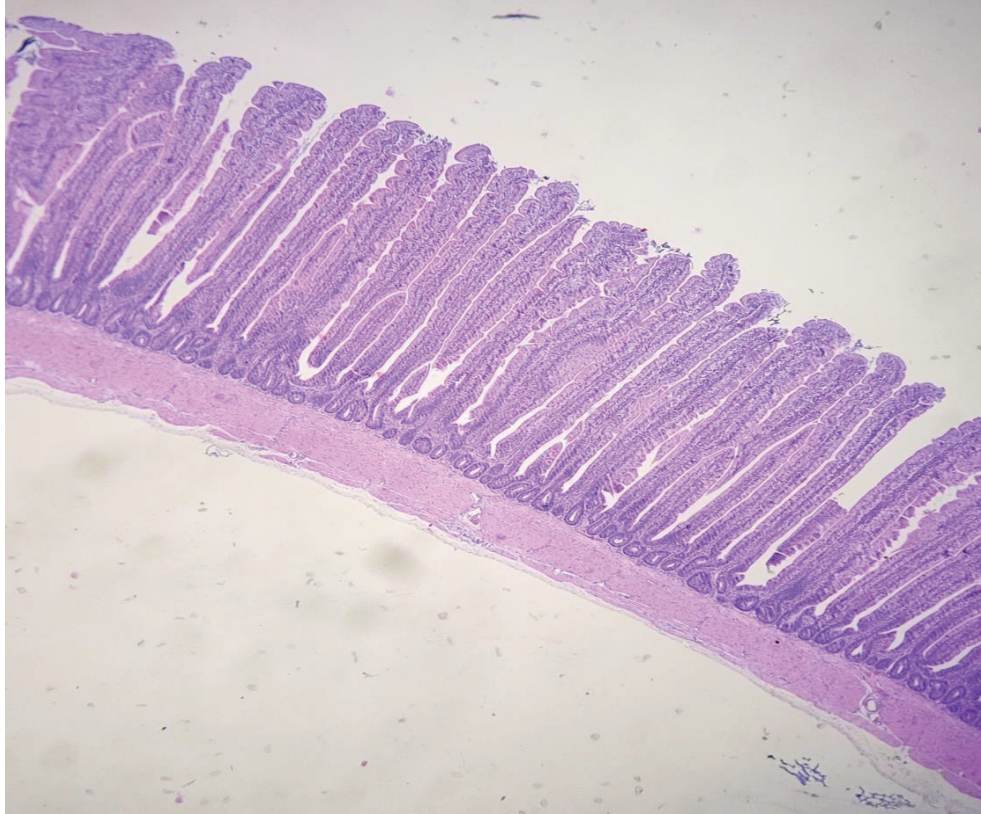


FIGURA 4 - Intestino delgado (jejuno), *Gallus gallus domesticus*, 39 dias. Ave 03, técnica 1. Observa-se maioria vilosidades preservadas, aptas a mensuração (HE, obj. 4x).

Fonte: A autora (2022)

Através da avaliação histopatológica ficou evidente que as técnicas 2 e 3 apresentaram um baixo número de vilosidades intestinais adequadas para a avaliação morfométrica devido a autólise dos ápices das vilosidades (FIGURA 5A), que foi mais evidenciada na técnica 3 indicando problemas de fixação na mucosa intestinal. De uma maneira geral os fragmentos de intestino que foram coletados abertos e fixados de forma longitudinal tiveram melhores medianas de contagem de vilosidades e criptas dos que os intestinos coletados e processados na forma cilíndrica (Transversal).

Nas técnicas 10 e 11 foi possível observar uma alta incidência de vilosidades “achatadas” (sem um ápice evidente para avaliação morfométrica) (FIGURA 5C), ou oblíquas o que impossibilitou a contagem dessas estruturas.

As criptas estavam tortuosas com pouca definição celular (FIGURA 5D). Nas demais técnicas foi possível notar o maior número de vilosidades sobrepostas, dobradas e/ou fragmentadas (FIGURA 5B). Sendo que nestes casos a delimitação das criptas era pouco evidente, refletindo na avaliação dessa porção do tecido.

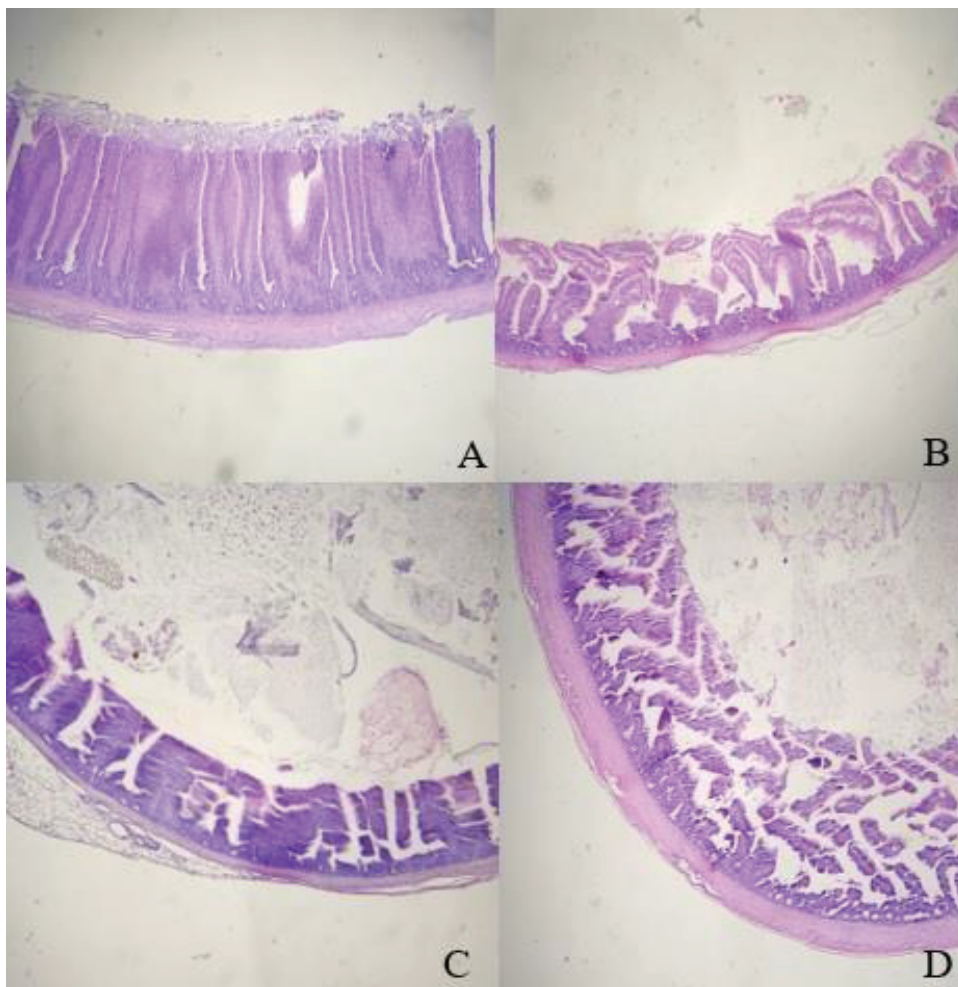


FIGURA 5 - Intestino delgado (jejuno), Gallus gallus domesticus, 39 dias. (A) Ave 06, técnica 2. Observa-se autólise do ápice das vilosidades (HE, obj. 4x). (B). Ave 11, técnica 3. Observa-se as vilosidades sobrepostas, rompidas, plissadas e dobradas (HE, obj. 4x). (C). Ave 46, técnica 10. Observa-se as vilosidades achatadas (HE, obj. 20x). (D). Ave 52, técnica 11. Observa-se as vilosidades tortas, dobradas, sobrepostas e há presença de conteúdo intestinal mesmo após a lavagem (HE, obj. 4x).
Fonte: A autora (2022).

5.4 DISCUSSÃO

Como pode ser observada pela literatura de revisão há uma falta de consenso a respeito dos critérios de obtenção e processamento das amostras de intestino para análise (Barreto, 2007; Fernandes 2007).

Os cortes de intestino delgado devem ser sempre longitudinais para obter preparações histológicas sem vilosidades falsamente alargadas. Observa-se que as hemicilindros longitudinais são mais eficientes que cortes longitudinais, evidenciando assim que cortes transversais não parecem serem adequados quando se objetiva a avaliação morfológica (Gava et al, 2015). Dessa forma, pode concluir-se que os cortes em sentido longitudinal foram mais eficientes que os cortes em cilindro.

Muitos autores citam que a temperatura baixa diminui a ação bacteriana e diminui o metabolismo tecidual e bacteriano (Kumar e Kieman, 2010), mas isso não apresentou influência positiva no presente trabalho, pois os tecidos que foram submetidos a temperatura do fixador a 4°C (técnica 7 e 8) apresentavam-se dobrados, rompidos e degradado.

Os fixares apresentaram um maior tempo para realizar sua penetração tecidual, assim não prevenindo o efeito da autólise das bactérias que ficam no lúmen tecidual. Quando o formol consegue penetrar no tecido a autólise já aconteceu e isso intensifica com o tempo de 6 horas (técnica 3), já que a amostra ficou maior tempo no formol (clivada no formato de tubo) por mais tempo e a quantidade de vilosidades com ápice autolisado foi ainda maior.

No presente estudo foram utilizados os tecidos 5 minutos após a morte dos animais, o que foi adequado para uma boa qualidade do intestino na maior parte das técnicas. Gava (2012), coletou amostras de intestino com 10 minutos

pós-morte ou mais, observou assim algum nível de autólise capaz de inviabilizá-las para a realização da histomorfometria e assim observou-se alterações nos ápices das vilosidades. Confirmando assim que quando o objetivo da coleta de vísceras for para histomorfometria intestinal, deve-se realizar a coleta do órgão imediatamente após a morte do animal, evitando assim autólise.

A técnica 8, onde o intestino foi aberto e mantido em formol a 4°C apresentou os melhores resultados, entretanto, a utilização de formol a 4°C que tem por objetivo retardar/evitar a autólise da amostra, não pareceu influenciar na integridade celular, pois nos outros métodos testados as vilosidades apresentaram moderada autólise também e o formol utilizado estava em temperatura ambiente. A utilização de formol a 4°C tem gerado discussão entre os autores, alguns sugerem que a fixação a 4°C melhora a qualidade da amostra devido a menor atividade metabólica e bacteriana nos tecidos submetidos a essa temperatura. Sabe-se que a evidenciação de glicogênio intracelular é mais efetiva em amostras fixadas nessa temperatura (Kumar e Kieman, 2010). Porém sabe-se que há melhor rendimento de DNA de amostras que foram fixadas em temperaturas maiores que 25 C° que indica que a integridade tecidual não é tão afetada pela temperatura como foi indicado por alguns autores.

Outro aspecto é referente aos métodos de coleta das Técnicas 6 e 7, onde o intestino foi aberto e fixado no isopor, que tem por objetivo não permitir que o fragmento do intestino dobre durante sua desidratação, conseqüentemente as vilosidades não se sobrepõem, possibilitando uma melhor visualização. Porém, no presente trabalho, tais amostras apresentaram as vilosidades sobrepostas, mesmo fixadas em isopor, não obtendo diferença das amostras não fixadas. Logo, sob o ponto de vista do tempo e empenho para fixar a amostra em isopor,

e ainda ter o risco de danificar a amostra devido ao manuseio, torna-se mais prático não fixar o material. Tal fato, corrobora com o trabalho de Gava (2012), onde ao comparar amostras fixadas (grampeadas) com as não fixadas, as fixadas apresentaram uma menor quantidade de vilosidades aptas a mensuração morfométrica.

O intestino é um órgão muito sensível e requer muito cuidado com a manipulação. Gava et al (2015), salientam que o intestino é muito elástico e sujeito a interferências de manipulação. Portanto dessas acredita-se que o uso de pissetas para a lavagem das amostras, independentemente de estarem fechadas ou abertas, levou a uma intensa abrasividade do jato causando danos significativos as vilosidades.

O mesmo foi observado na Técnica 11, onde após a coleta do tecido, amarrou-se as extremidades e injetou-se 3mL de formoldeído no lúmen. Nesse caso a pressão causada pelo formol danificou as vilosidades achatando as mesmas o que levou a alteração da arquitetura tecidual.

Assim o presente trabalho obteve o melhor resultado para análise morfométrica da vilosidade intestinal, as amostras submetidas a técnica 1, onde o intestino foi aberto e fixado rapidamente em formol a 10%. Na técnica 4 onde o intestino foi aberto e lavado em formol a 10% com pisseta antes da fixação. E na técnica 5 onde o intestino foi aberto e limpo delicadamente com tesoura antes da fixação.

5.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos do presente estudo, podemos concluir que a técnica de coleta influi na qualidade do exame morfométrico, podendo até

inviabilizar o mesmo; observa-se que a técnica de coleta com menor manipulação tecidual é a mais indicada. Em relação a temperatura do formol a 4°C percebeu-se que essa não a influenciou a qualidade amostral para análise morfométrica; e por fim, pode-se sugerir que os cortes longitudinais são melhores que cortes transversais. No entanto sugere-se a realização de novos trabalhos, para comparar e alcançar resultados mais precisos de qual método de coleta do intestino é o mais adequado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barreto MSR. Uso de extratos vegetais como promotores do crescimento em frangos de corte. 2007. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 16 f.

Gava MS. Metodologia de morfometria intestinal em frangos de corte. 2012. Dissertação (Mestrado em ciência veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 59f.

Fernandes JIM, Gonçalves DRM, Riffel ET, Vanroo E, Lima FK, Broch J. Effect of Oral supplement for chicks subjected to thermal oscillation on performance and intestinal morphometry. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 2017; 39(4):385-392.

Bouhet S, Oswald IP. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005;108(1-2):199-209.

Brooks ME, Kristensen K, Bentzen KJV, Magnusson A, Berg CW, et al. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal*, 2017; 9(2):378-400.

Falkeholm L, Grant CA, Magnusson A, Möller E. Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation. *Lab Invest* 2001; 81(9):1213-1221.

Fox J, Weisberg, S. *An R Companion to Applied Regression*. Sage, 3^a ed, 2019, Thousand Oaks CA.

Gallego MG, Rus AS. 1987. Absorción intestinal en peces. In: ESPINOSA DE Monteros JEL, Labarta U. (Eds.). *Nutrición en acuicultura I*. Madrid: Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. p.123-171.

Gava MS, Moraes LB, Carvalho D, Chitolina GZ, Fallavena LCB et al. Determining the Best Sectioning Method and Intestinal Segment for Morphometric Analysis in Broilers. *Ver. Bras. Cienc. Avic.* 2015; 17(2):145-149.

Kumar GL, Kiernan JA. *Education Guide: Special Stains and H&E*. Dako, 2^a ed, 2010, Carpinteria.

Lenth RV. emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means, 2018. R package version 1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>

R Core Team. *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, 2013, Vienna, Austria.

Venables, WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with*. Springer Science+Business Media, 2002, New York.

Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang w, McGowan LD, et al. Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* 2019; 4(43), 1686-1692.

Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM. *Mixed Effects Models and extensions in ecology with R*. Springer, New York, 2009.