

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Influência da densidade populacional sobre o peso médio, percentual de calo de patas e histomorfometria da bolsa cloacal em aves (*Gallus gallus*).

Eduardo Correa Muniz

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
MAIO DE 2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Influência da densidade populacional sobre o peso médio, percentual de calo de patas e histomorfometria da bolsa cloacal em aves (*Gallus gallus*).

Eduardo Correa Muniz

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Batista Guimarães

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração: Saúde Animal

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL - BRASIL
MAIO DE 2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

M966i Muniz, Eduardo Correa
Influência da densidade populacional sobre o peso médio, percentual de calo de patas e histomorfometria da bolsa cloacal em aves (*Gallus Gallus*) / Eduardo Correa Muniz. -- Campo Grande, MS, 2006.
25 f. ; 30 cm.

Orientador: Eurípedes Batista Guimarães
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Frango de corte - Criação. I. Guimarães, Eurípedes Batista. II. Título.

CDD (22) - 636.513

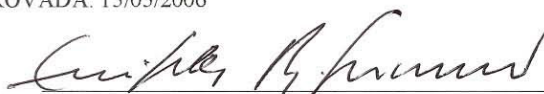
EDUARDO CORREA MUNIZ

“Influência da densidade populacional sobre o peso médio, percentual de calo de patas e histomorfometria da bolsa cloacal em aves (*Gallus gallus*)”

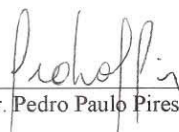
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Animal

APROVADA: 15/05/2006



Dr. Euripedes Batista Guimarães
Orientador



Dr. Pedro Paulo Pires



Dr. Alfredo Sampaio Carrijo

“A medicina criou a doença, a religião criou o pecado e a matemática criou o problema”.

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Pedro e Ruth, pela esperança que cultivam e dedicação em me ensinar a viver. Serei eternamente grato a vocês que me concederam o milagre da vida e a alegria de uma infância simples, tranqüila e serena.

Agradeço a minha esposa, Daniela Brecht de Freitas, pessoa que me ensinou o significado da palavra amor. Nunca esquecerei do apoio e dedicação durante esses meses de trabalho.

Agradeço aos meus dois filhos, Arthur e Eduardo, que nasceram no decorrer do mestrado e dividiram as atenções com os livros, aulas e trabalhos.

Agradeço a meus irmãos, Ricardo e Rodrigo, que me fazem acreditar que sou uma pessoa privilegiada. Tenho muita sorte em contar com dois irmãos tão companheiros.

Agradeço aos amigos e em especial Vitor Barbosa Fascina que sempre esteve do meu lado apoiando e ajudando no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao produtor Rogério Batistelli que além de ajudar na criação dos animais deste experimento também é para mim um grande amigo e pessoa especial.

Agradeço a UFMS e em especial ao mestre Eurípedes Batista Guimarães, pessoa de enorme coração e valor, que participou desta etapa tão importante da minha evolução profissional.

Agradeço a Seara Alimentos pela oportunidade de aprendizado e que nosso país continue mostrando sua aptidão de produtor de alimentos saudáveis e de qualidade. Precisamos mostrar o valor do nosso povo.

LISTA DE FIGURAS

ASSUNTO	“página”
FIGURA 1. Aviário climatizado com alojamento de alta densidade populacional.....	02
FIGURA 2. Fotos de pés de frangos de corte após o abate apresentando ausência e presença de pododermatite.....	03
FIGURA 3. Interação neuro-hormonal no estresse.....	04
FIGURA 4. Sistema imune celular e humoral das aves e seus órgãos.....	05
FIGURA 5. Determinação do percentual de parênquima da bolsa cloacal	08
FIGURA 6. Porcentagem de parênquima da bolsa cloacal de aves com idade entre 0 e 6 semanas.....	09
FIGURA 7. Determinação do percentual de córtex do folículo linfóide	10
FIGURA 8. Porcentagem média de área cortical nos folículos linfóides da bolsa cloacal de aves com 5 semanas de idade.....	10

LISTA DE TABELAS

ASSUNTO	“página”
Tabela 1. Porcentagem média de parênquima das bolsas cloacais das aves sacrificadas no início do experimento e ao final de cada semana durante as fases de criação e experimental (0 – 6 semanas de vida).....	08
Tabela 2. Porcentagem do córtex dos folículos das bolsas cloacais nas aves dos três tratamentos com 5 semanas de idade.....	09

SUMÁRIO

ASSUNTO	“página”
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERÊNCIAS.....	13
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem crescido com uma velocidade superior aos demais segmentos econômicos agropecuários. Os volumes de produção de carne de frango estão aumentando a cada ano e com isso o país tem demonstrado sua vocação para uma avicultura eficiente, onde os índices de produtividade são superiores aos demais países do mundo. Isto é reflexo de investimento em genética, nutrição e manejo (MARSHALL, 2004). No entanto, ainda existem várias questões sem resposta com relação ao comportamento biológico das aves frente ao intenso confinamento a que são submetidas e, principalmente, quanto às conseqüências desta forma de manejo sobre o sistema imunológico das aves.

Com a finalidade de obter altos volumes de carne por metro quadrado, as empresas fazem alojamentos de alta densidade populacional atingindo 20 aves/m² (Fig. 1). No entanto, ao analisar a qualidade da carcaça no abatedouro é possível perceber diferenças entre lotes criados em diferentes densidades. Os lotes criados em altas densidades têm apresentado problemas de dermatite (riscos na carcaça), calos de patas e calosidades de joelho, indicando que a ave está sendo submetida a um elevado grau de agressão, resultando no aumento do índice de condenações totais ou parciais de carcaças durante a inspeção sanitária no abate. Este espaço limitado devido à alta densidade de alojamento por metro quadrado gera desconforto e impõe uma dificuldade maior ao animal no que diz respeito ao acesso ao comedouro e bebedouro e, também, imprime um ambiente pouco favorável para a manifestação do seu comportamento natural, criando entre o piso e as aves uma atmosfera de difícil renovação carregada de gases e microorganismos. Por outro lado, percebe-se que lotes alojados em densidades menores apresentam um resultado zootécnico melhor e, logicamente, mais facilidade no acesso à ração e água. Isto parece estar relacionado a uma condição melhor de movimentação dentro do aviário (BILGILI & HESS, 1995).

Outro aspecto importante dentro do tema densidade populacional diz respeito ao bem-estar animal. Fora do país, existe uma preocupação crescente por parte dos consumidores de carnes, com relação à forma como são criados os animais destinados ao abate. Esta preocupação é

extremamente saudável e obriga o setor produtivo a estabelecer limites onde também seja levado em consideração o bem-estar das aves. O continente Europeu tem liderado as práticas produtivas dentro de uma preocupação séria com o bem-estar animal. Inclusive, existem várias organizações não governamentais sugerindo normas bem definidas que norteiam a criação dos animais. Estas normas determinam o padrão de alojamento, densidade populacional, transporte e abate de aves na Comunidade Européia e podem se constituir também em barreiras para o ingresso de carne importada de outros continentes. Estas organizações não governamentais seguem as cinco liberdades do bem-estar animal que resumem as necessidades básicas para uma criação racional e humanitária (FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL, 2004).

Figura 1 – Aviário climatizado com alojamento de alta densidade populacional.

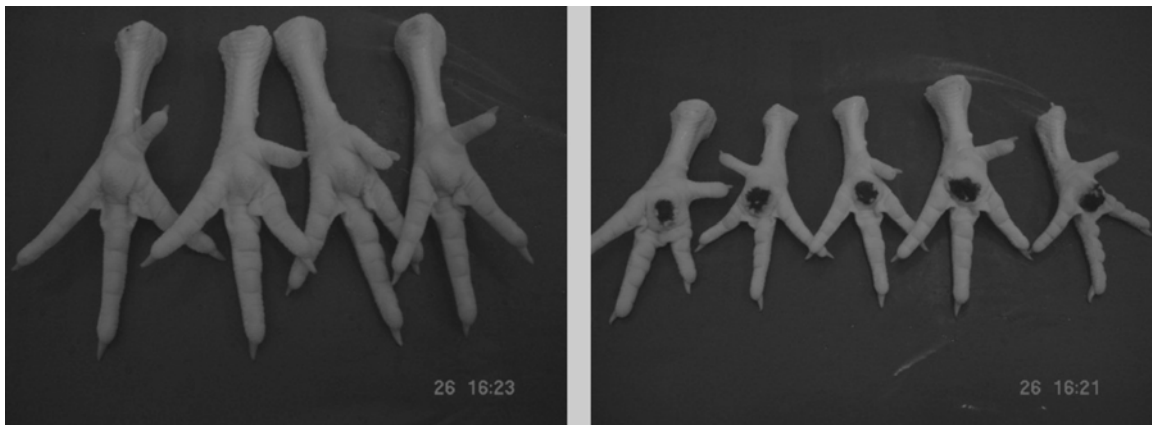


Fonte: Arquivo pessoal.

Cada vez mais os compradores externos de carne de frango estão atentos a maneira com que os animais vem sendo criados. Todas as exigências legais européias devem ser cumpridas pelos produtores. As empresas brasileiras que exportam para estes mercados, passam por auditorias externas que avaliam o sistema de produção dos frangos de corte. Durante estas auditorias são inspecionadas as conformidades com as cinco liberdades do bem-estar animal e devem estar disponíveis evidências de boas práticas de criação. Diferentes formas de criação vêm

sendo avaliadas e adotadas como alternativas para minimizar os efeitos estressantes do confinamento das aves. A liberdade de stress, injúria e doença é um dos principais requisitos para o bem-estar dos animais. Lesões nas carcaças de frangos de corte são indicadores do bem-estar, principalmente calos de patas (Fig. 2). Os fatores que contribuem para um pobre bem-estar normalmente estão relacionados a condições de alojamento e manejo. Trabalhos científicos mostram que as dermatites são freqüentes em frangos de corte abatidos no reino unido (BROOM & REEFMANN, 2005).

Figura 2 – Fotos de pés de frangos de corte após o abate apresentando ausência e presença de pododermatite.



Fonte: Arquivo pessoal.

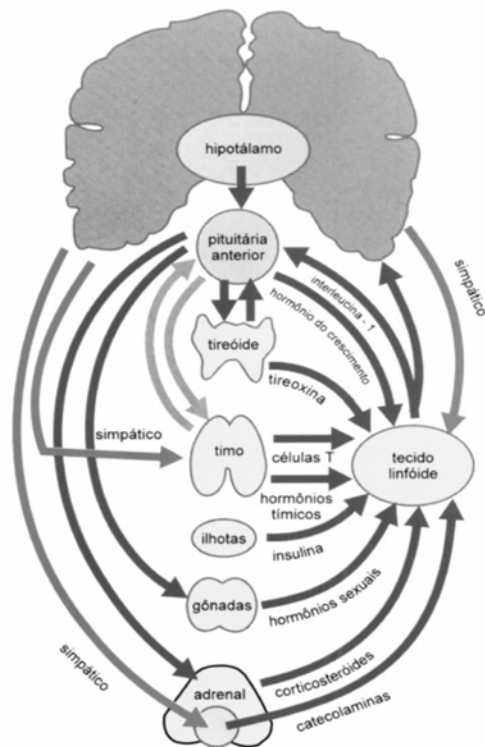
O sistema de produção sueco tem avaliado sistematicamente a relação entre os calos de patas e a densidade populacional utilizada na criação de frangos de corte como um parâmetro de bem-estar animal. Para os produtores obterem autorização para densidades mais altas, são estabelecidas exigências quanto a fatores de manejo e estado sanitário das aves. Os parâmetros sanitários em discussão são: percentagem de calos de jarrete, lesões de coxim plantar e taxa de mortalidade. No abatedouro, são coletadas amostras para a classificação de acordo com um sistema de escores. Este país tem reservado atenção especial para este aspecto no meio científico e produtivo (EKSTRAND & CARPENTER, 1998).

Todos os efeitos de fatores ambientais estressantes exercem significativa influência negativa sobre o sistema imune dos animais de criação e, dessa forma, implica em aumento da susceptibilidade às doenças, menor resposta aos programas de vacinação e maior ocorrência de

condenações no abatedouro (Fig. 3). Assim, a modulação do sistema imunológico em aves é considerada um tópico de grande importância econômica, social e científica (DOHMS & METZ, 1991).

Todo o mecanismo neuro-hormonal relacionado ao estresse em aves e sua relação com fatores do ambiente já está bem definido na literatura, onde o aumento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico e, conseqüentemente, o aumento dos corticosteróides leva a imunossupressão (HILL, 1983). A relação entre a imunossupressão e a involução dos tecidos linfóides em ratos também segue o mesmo mecanismo fisiológico (SEYLE, 1937; INGLE, 1940).

Figura 3 – Interação neuro-hormonal no estresse.

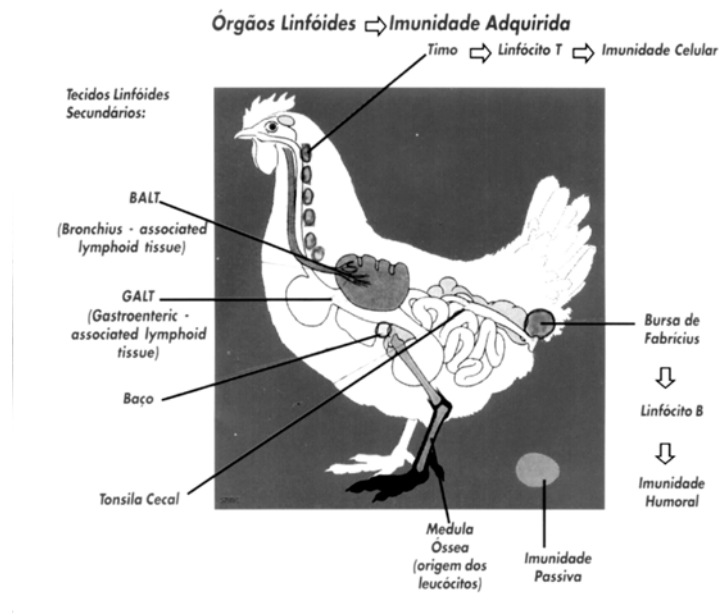


Fonte: Manual Pfizer de doenças imunossupressoras em aves, 2000.

Como particularidade, o sistema imune das aves possui um órgão linfoepitelial descrito pela primeira vez por *Hieronimus Fabricius of Aquapendente* (1533-1619). Esta estrutura tem a forma de um saco cego e se comunica com a parte superior da cloaca por intermédio de um ducto excretor estreito (Fig. 4). O lume desse órgão é preenchido em média por 12 pregas ou dobras da mucosa bursal, semelhantes a projeções vilosas que emergem internamente da parede da bolsa. A parede da bolsa cloacal é composta de 4 camadas: a primeira,

constituída de uma membrana serosa delgada, é seguida de duas camadas musculares lisas, uma circular e outra longitudinal e uma mucosa. A camada mucosa é o principal componente da parede bursal e é constituída por pregas da mucosa que se projetam verticalmente à parede da bolsa cloacal sendo que cada uma é composta de tecido conjuntivo de sustentação e de folículos linfóides. Os folículos linfóides constituem o maior componente das pregas bursais. Apesar de serem formados, em parte, por tecido mesenquimatoso, são considerados como mucosa. Morfologicamente os folículos apresentam-se como estruturas poliédricas ou piriformes, dispostos lado a lado e separados por pequena quantidade de tecido conjuntivo. A base do folículo repousa sobre o cório e o ápice, voltado para o lume da bolsa, é recoberto por células epiteliais (HODGES, 1974).

Figura 4 – Sistema imune celular e humoral das aves e seus órgãos.



Fonte: Manual Pfizer de doenças imunossupressoras em aves, 2000.

O ápice de cada folículo linfóide é contínuo com o epitélio superficial. Esta parte epitelial, altamente especializada é capaz de realizar pinocitose, transferindo antígenos do lume da cloaca para a área medular dos folículos linfóides, apresentando-os aos linfócitos, ativando-os. Esta apresentação antigênica é importante para o processo de maturação da bolsa cloacal e para a manutenção da vigilância imunológica (BOCKMAN & COOPER, 1973).

Cada folículo é subdividido em uma área cortical e uma medular. Estas áreas são delimitadas por uma membrana basal, sob a qual existe uma rede de capilares sangüíneos. O córtex folicular é composto, em sua maior parte, por pequenos linfócitos e por isso, mais intensamente corado por Hematoxilina e Eosina do que a porção medular. O suprimento sangüíneo dessa área é pouco desenvolvido, apesar da existência de algumas arteríolas, vênulas e capilares. A região medular do folículo, principalmente a sua porção externa, é formada predominantemente de linfoblastos e poucos linfócitos médios e pequenos. Por isto esta região, quando examinada ao microscópio óptico, apresenta-se mais clara que a área cortical. Tanto o córtex quanto a área medular são praticamente destituídas de plasmócitos, que são encontrados somente no tecido conjuntivo interfolicular e imediatamente abaixo da cobertura epitelial das pregas bursais. A porção medular, em qualquer fase do desenvolvimento, é praticamente isenta de capilares sangüíneos (HODGES, 1974).

É na bolsa cloacal que ocorre a diferenciação e a maturação dos linfócitos B, sabidamente responsáveis pela imunidade humoral nas aves. A bolsa cloacal apresenta alguma semelhança embriológica com o timo, principalmente no que diz respeito à origem epitelial e a natureza linfóide. A bolsa cloacal e o timo também são semelhantes em muitos aspectos de desenvolvimento na fase inicial da vida pós-eclosão. Como os dois órgãos sofrem involução com a maturidade sexual, são encontrados somente em aves jovens, desde a eclosão, até dez semanas de vida aproximadamente (HODGES, 1974).

Para que ocorra imunossupressão induzida por corticosteróides endógenos ou exógenos, há necessidade de que estas substâncias atinjam em torno de 80 vezes a concentração sangüínea normal. Quando isso ocorre, há imediata lise de linfócitos imaturos da bolsa cloacal e do timo, ocasionando hipotrofia dos referidos órgãos e involução precoce do tecido linfóide (COMPTON et al. 1990).

Atualmente sabe-se que o processo de depleção linfocitária é mediado por intensificação da morte celular programada, também conhecida como apoptose; principalmente na bolsa cloacal, tanto que este órgão tornou-se um dos mais importantes para estudo deste tipo de morte celular no sistema linfóide de aves (PARAMITHIOTIS & RATCLIFFE, 1994). Neste caso, a eliminação maciça de linfócitos se dá por este processo de morte celular.

O termo apoptose que em grego, significa “queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores” com o objetivo de renovação, é empregado para descrever a morte celular programada, induzida em vertebrados, por mecanismos decorrentes da ativação de um programa genético intrínseco da célula. É um processo que depende de energia, de síntese de RNAm e de

expressão de proteínas específicas. A apoptose é o resultado da ativação e transdução de uma cascata de sinais intracelulares onde o estímulo inicial depende de receptores na membrana celular. O alto nível de corticosteróides na corrente sanguínea é determinante para a indução da apoptose nas células do tecido linfóide (KERR et al. 1972). Para que isto ocorra há participação de receptores da superfície celular, que ativam quinases e fosfatases e produzem outras moléculas sinalizadoras denominadas “segundos mensageiros”. Estas, por sua vez, desencadeiam uma cascata de sinais, ativando um programa genético intrínseco. A partir desta ativação, há produção de AMPc, hidrólise do fosfatidilinositol e ativação da adenilciclase e fosfolipase C mediada por acoplamento de proteína G (McCONKEY et al. 1993).

Em condições normais, a apoptose é considerada um evento fisiológico, indispensável ao desenvolvimento e manutenção da homeostasia dos tecidos. Também faz parte de mecanismos essenciais à regulação do tamanho individual dos órgãos. Sob situação de anormalidade, este tipo de morte celular é responsável pela eliminação de células alteradas por agentes físicos, como no caso das radiações ionizantes, químicos e de agentes virais. Este tipo de eliminação altruística de células portadoras de danos irreparáveis do genoma protege o indivíduo, inibindo a propagação de defeitos genéticos, capazes de comprometer o organismo com um todo (VASCONCELOS et al. 1996).

Estudos histomorfométricos da bolsa cloacal em aves submetidas a condições de estresse (calor e frio) e de conforto térmico (termoneutralidade) concluíram que o estresse térmico afeta o desenvolvimento e maturação das bolsas cloacais das aves diminuindo a quantidade de parênquima. Além disso, o estresse térmico, causado tanto pelo calor quanto pelo frio, aumenta o índice de apoptose dos linfócitos nas bolsas cloacais de aves em desenvolvimento. Resultados de termoneutralidade (B) mostram o desenvolvimento normal da bolsa cloacal, onde durante as três primeiras semanas existe um crescimento acelerado do tecido linfóide, entre a quarta e quinta semanas de vida ocorre uma estabilização e posterior regressão fisiológica a partir da sexta semana (GLICK, 1956). No tratamento A (calor) não há diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, o tratamento C (frio) mostra-se determinante na redução do parênquima e esta diferença acentua-se significativamente ao longo da vida das aves. Assim, o estresse por frio apresenta efeito de maior intensidade do que o calor e, conseqüentemente, determina uma maior retração do tecido linfóide das aves (Tab. 1). A determinação da porcentagem de parênquima das bolsas cloacais é realizada através de analisador de imagens dos cortes histológicos do órgão (Fig. 5).

Tabela 1 – Porcentagem média de parênquima das bolsas cloacais das aves sacrificadas no início do experimento e ao final de cada semana, durante as fases de criação e experimental (0-6 semanas de vida)

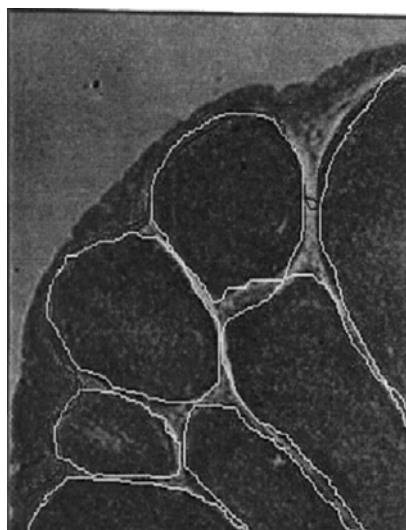
Tmt	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 5	Sem 6
A	31,0 ^a	59,0 ^a	81,0 ^a	72,0 ^a	65,0 ^{a,b}	70,5 ^a	61,5 ^{a,b}
B	31,0 ^a	59,0 ^a	79,0 ^b	78,0 ^a	76,0 ^a	78,5 ^a	72,0 ^a
C	32,5 ^a	47,0 ^a	67,0 ^b	62,0 ^b	52,0 ^b	53,0 ^b	48,0 ^b

A, B e C = Tratamentos correspondentes ao calor, termoneutro ou controle e frio, respectivamente.

^{a,b} Médias com letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Duncan

Fonte: Guimarães, 2001

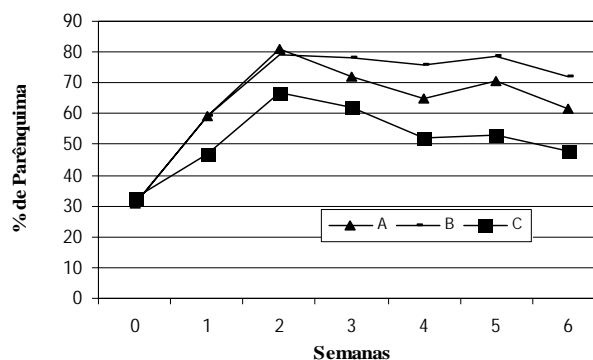
Figura 5 – Determinação do percentual de parênquima da bolsa cloacal.



Fonte: Guimarães, 2001. (HE 200X).

A figura a seguir ilustra a evolução do parênquima da bolsa cloacal nos três tratamentos. O frio retardou o desenvolvimento e o calor acelerou a involução. A involução fisiológica iniciou-se a partir da 5^a semana (Fig. 6). Estas diferenças na porcentagem de parênquima demonstram a influência dos fatores ambientais sobre o tecido linfóide. Em condições de conforto a ave apresenta maior área de parênquima e conseqüentemente maior imunocompetência uma vez que dispõe de maior quantidade de tecido linfóide na bolsa cloacal.

Figura 6 – Porcentagem de parênquima da bolsa cloacal de aves com idade entre 0 e 6 semanas.



Fonte: Guimarães, 2001.

Também foi demonstrado que em relação à porcentagem dos folículos das bolsas cloacais, a área cortical do tratamento de termoneutralidade (B) permaneceu maior mostrando que o conforto térmico é fundamental para desenvolvimento normal do tecido linfóide. E a causa principal da diminuição da quantidade de parênquima nos tratamentos por frio e calor foi a evolução deficiente da área cortical durante o processo de maturação do órgão (GUIMARÃES, 2001) (Tab. 2). Mais uma vez foi verificou-se o efeito positivo do conforto sobre o tecido linfóide. O fato da ave em conforto térmico apresentar maior porcentagem de córtex dos folículos das bolsas cloacais nos permite dizer que estas aves também apresentam melhores condições de resposta frente a desafios infecciosos.

Tabela 2 – Porcentagem do córtex dos folículos das bolsas cloacais nas aves dos três tratamentos com 5 semanas de idade

Tratamento	% Área cortical
Calor	45,16983 ^b
Neutro	59,43138 ^a
Frio	36,04376 ^c

^{a,b,c} Médias com letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Duncan
Fonte: Guimarães, 2001

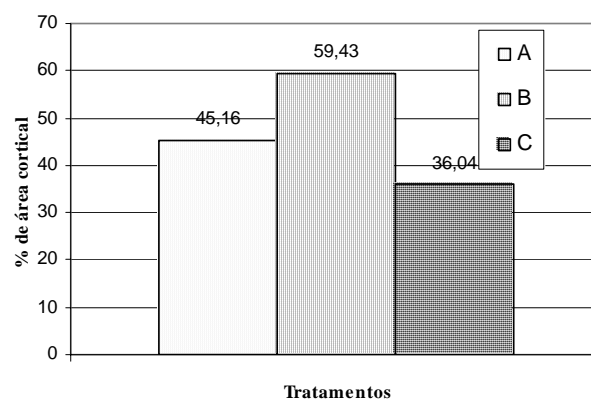
Figura 7 – Determinação do percentual de córtex do folículo linfóide.



Fonte: Guimarães, 2001. (HE 280X).

A determinação da porcentagem de córtex dos folículos linfóides é realizada através de analisador de imagens (Fig. 7). Na 5ª semana, a porcentagem média do córtex da bolsa cloacal foi estatisticamente diferente nos três tratamentos e se associou com a intensidade de maturação do órgão (Fig. 8).

Figura 8 – Porcentagem média de área cortical nos folículos linfóides da bolsa cloacal de aves com 5 semanas de idade.



Fonte: Guimarães, 2001

Para estudos de histomorfometria com folículos linfóides de aves envolvendo a determinação da área cortical e medular foram realizados experimentos onde concluiu-se que a contagem de oito campos microscópicos seriam suficientes para garantir a visualização dos efeitos sobre o tecido linfóide com probabilidade de erro muito baixa. Estes estudos estatísticos comprovaram que o desvio padrão não se alterava a partir de oito campos por seção baseado em teste de instabilidade (RACHID et al., 2000). Assim, a histomorfometria constitui-se em uma excelente ferramenta para mensurar os efeitos do ambiente sobre os tecidos vivos.

Com a revisão desse apanhado de artigos científicos, é possível perceber o efeito dos fatores ambientais, como temperatura e densidade populacional, sobre parâmetros de desempenho, de bem-estar e imunidade das aves. Todos estes fatores relacionam-se mutuamente e o grande desafio do setor produtivo é estabelecer limites e padrões de criação que busquem o máximo desempenho, com as menores perdas em condenações, respeitando o bem-estar dos animais. O ponto de equilíbrio das variáveis como densidade populacional, condenações e imunidade somente poderá ser estabelecida através de estudos científicos. Esta revisão é o embasamento teórico para desenvolver a pesquisa proposta na área de patologia avícola.

O objetivo do trabalho científico, desenvolvido no curso de mestrado em ciência animal, foi o de quantificar e comparar, por meio de estudos histomorfométricos, a bolsa cloacal de aves (*Gallus gallus*) submetidas a três diferentes densidades populacionais, bem como avaliar o peso médio e percentual de calos de patas em frangos de corte.

Os resultados deste trabalho foram encaminhados na forma de artigo científico para a Revista Brasileira e Ciência Avícola (Brazilian Journal of Poultry Science) da FACTA – Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.

2 REFERÊNCIAS

BILGILI S.F. & HESS J.B. Placement density influences broiler carcass grade and meat yields. **Journal Applied Poultry Research**, v. 4, p.384-389, 1995.

BOCKMAN D.E. & COOPER M.D. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. **American Journal of Anatomy**, v.136, p.455-478, 1973.

BROOM D.M. & REEFMANN N. Chicken welfare as indicated by lesions on carcasses in supermarkets. **British Poultry Science**, v. 46, p.407-414, 2005.

COMPTON M.M., GIBBS P.S. & JOHNSON L.R. Glicocorticoid Activation of Deoxyribonucleic Acid Degradation in Bursal Lymphocytes. **Poultry Science**, v.69, p.1292-1298, 1990.

DOHMS J.E. & METZ A. Stress: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.30, p.89-109, 1991.

EKSTRAND C. & CARPENTER T.E. Spatial aspects of foot-pad dermatitis in Swedish broilers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p.219-228, 1998.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL (FAWC). Five Freedoms. UK. 5th floor 1A Page Street, London SW 1P 4PQ. 2004. Disponível em <<http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm>> Acesso em: 02 abr. 2004.

GLICK B. Normal growth of the bursa of Fabricius in Chickens. **Poultry Science**, v.35, p.843-854, 1957.

GUIMARÃES E.B. **Histometria, índice apoptótico da bolsa cloacal e catabolismo de anticorpos em frangos de corte em ambiente de conforto e estresse térmico**. 2001. 74 f. Tese (Doutorado em Patologia e Clínica) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

HILL J.A. Indicators of stress in poultry. **World`s Poultry Science Journal**, v.39, p.24-31, 1983.

HODGES R.D. **Histology of the bursa of Fabricius and the thymus**. In: HODGES R.D. *The Histology of the Fowl*. 1974. Academic Press, London, p.205-213.

INGLE D.J. Effect of two steroid compounds on weight of thymus of adrenalectomized rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.44, p.174-175, 1940.

KERR J.F.R., WYLLIE A.H. & CURRIE A.R. Apoptosis: A basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239-257, 1972.

MANUAL TÉCNICO DA FORÇA AVÍCOLA PFIZER. **Clipping Patologia Aviária “Doenças imunossupressoras em aves”**. Ano 04 – nº 08, 2000.

McCONKEY D.J., HARTZELL R., NICOTERA P. & ORRENIUS S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature Thymocytes. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.3, p.1843-1849, 1989.

MARSHALL P. Mercado Internacional de frangos – Barreiras e Perspectivas. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 5., 2004, Chapecó. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA, CNPSA, 2004. p.130-134.

PARAMITHIOTIS E. & RATCLIFFE M.J.H. Survivor of B cell production and emigration. **Poultry Science**, v.73, p.991-997, 1994.

RACHID M.A., VASCONCELOS A.C. & NUNES V.A. Apoptose na depleção linfocitária induzida pela toxina T-2 em frangos de corte. Histomorfometria da bolsa de Fabricius. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, p. 178-186, 2000.

SEYLE H. Studies on adaptation. **Endocrinology**, v.21, p.169-188, 1937.

VASCONCELOS A.C., MORO L. & Da SILVA P.M. Apoptose ou morte celular programada e sua importância em patologia veterinária. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v.520, p.182-193, 1996.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Influência da densidade populacional sobre o peso médio, percentual de calos de patas e histomorfometria da bolsa cloacal de frangos de corte.

Muniz EC¹, Fascina VB¹, Pires PP², Carrijo AS³, Guimarães EB³

¹ Pós-graduando, Ciência Animal - UFMS

² Pesquisador, CNPQC/EMBRAPA - MS

³ Professor, Departamento de Medicina Veterinária – UFMS

Eduardo Correa Muniz

Av. Senador Filinto Miller, nº 2443

Bairro Vila Ipiranga

Caixa Postal 549

CEP 79.070-900 – Campo Grande – MS

e-mail: ecmuniz@zipmail.com.br

RESUMO

O estresse exerce influência sobre o sistema imunológico das aves causando imunodepressão. O objetivo desse estudo foi o de quantificar o percentual da área cortical da bolsa cloacal, peso corporal e percentual de calos de patas de frangos de corte submetidos a três diferentes densidades populacionais. Os tratamentos foram compostos de três grupos de aves alojadas em boxes de 6 m² em galpões climatizados, sendo que a densidade foi de 10, 15 e 20 aves/m² em cada grupo. Ao final da primeira e da última semana, uma ave de cada tratamento foi sacrificada, colhendo-se as bolsas cloacais que, após processamento através de histopatologia, foram avaliadas sob microscopia de luz. Aos 42 dias de idade também foram determinados o peso médio das aves e o percentual de calos de patas dos animais dos diferentes tratamentos. Foi possível observar uma influência diretamente proporcional da densidade sobre o percentual de calos de patas e inversamente proporcional sobre o peso corporal e o percentual de córtex do folículo linfóide. A densidade populacional recomendada está entre 10 e 15 aves/m².

Palavras chaves: Frangos de corte, densidade populacional, bolsa cloacal, calos de pé, bem-estar animal.

ABSTRACT

Brazilian livestock industry has been effective in poultry meat with low cost of production. One of the factors to get the low cost is a high stocking density used in broiler houses. During the last years there has been considerable interest in the effects of stocking density on welfare and immunity because stress causes immunodeficiency in broilers, decreasing cellular and humoral response. The immunodeficiency can increase risks to infections and can increase condemnation compromising quality of food. The aim of this study was to evaluate morphologically the bursa of Fabricius of broilers submitted to three different stock densities. Body weight and foot-pad dermatitis were also studied at 42 d. Birds were raised from hatch to 42 d of age in pens of 6 m² with 10, 15 and 20 birds/m² corresponded to 60, 90 and 120 birds per pen, respectively. Water and feed were provided *ad libitum* and light was provided 20 h/d. Three birds of each group were killed at days 7 and 42. Bursa of Fabricius were collected, fixed and processed to histomorphometric evaluation using an image analyser Kontrom KS 400. Data were analysed by Biostat 3.0 (Tukey Test). The average percentage of cortical area in bursal follicles in birds with 6 weeks of age was 45,12a (10 birds/ m²), 30,43b (15 birds/ m²) and 23,77b (20 birds/ m²). The average weight in birds with 6 weeks of age was 2,583a Kg (10 birds/ m²), 2,557a Kg (15 birds/ m²) and 2,470b Kg (20 birds/ m²). The percentage of foot-pad dermatitis in birds with 6 weeks of age was 3,33a (10 birds/ m²), 17,76b (15 birds/ m²) and 49,17c (20 birds/ m²). Conclusions: Higher stocking densities decrease the percentage of parenchyma of bursa of Fabricius. It was also possible to realize that body weight and foot-pad dermatitis is negatively affected at higher stocking densities. The recommended stocking density is between 10 and 15 birds/ m².

Keywords: Broilers, stocking density, bursa of Fabricius, foot-pad dermatitis, welfare animal.

INTRODUÇÃO

O frango de corte requer condições ótimas de ambiência e bem-estar animal para expressar todo o seu potencial genético. Todo e qualquer desvio nas condições ambientais podem contribuir para redução no desempenho. Vários estudos tem mostrado o impacto da densidade populacional no desempenho dos frangos de corte. No entanto, o alojamento em altas densidades é prática comum para reduzir custos fixos e maximizar a rentabilidade da atividade de produção.

Lesões nas carcaças são usadas como índices do nível de bem-estar das aves. Dados recentes mostram que a extensão destas lesões relacionam-se com as condições de alojamento e métodos de manejo das aves. Analisando a qualidade da carcaça no abatedouro é possível perceber diferenças entre lotes criados em diferentes densidades populacionais. Lotes criados em altas densidades apresentam problemas de dermatite, calo de pé e calo no joelho resultando em aumento dos índices de condenações durante a inspeção sanitária (Bilgili & Hess, 1995) O sistema de produção Sueco tem avaliado a relação entre os calos de patas e a densidade populacional como um parâmetro de bem-estar animal (Ekstrand & Carpenter, 1998).

O estresse exerce significativa influência negativa no sistema imune dos animais e conseqüentemente implica no aumento do risco de doenças. Por este motivo, a resposta do sistema imune das aves é considerada um tópico de importância econômica, social e científica (Dohms & Metz, 1991). Atualmente sabe-se que o processo de depleção linfóide é mediado pela intensificação da morte celular programada, também conhecida como apoptose; principalmente na bolsa cloacal. Tanto que este órgão tornou-se o mais importante para o estudo deste tipo de morte celular no tecido linfóide das aves (Paramithiotis & Ratcliffe, 1994). Estudos com a bolsa cloacal de aves submetidas a estresse (calor e frio) e em condições de conforto concluíram que o estresse térmico afeta o desenvolvimento e maturação do órgão diminuindo a quantidade de parênquima. Além disso, o estresse térmico aumenta o índice de apoptose dos linfócitos da bolsa cloacal em aves em desenvolvimento (Guimarães, 2001).

O objetivo deste trabalho foi quantificar e comparar, por meio de estudos histomorfométricos, a bolsa cloacal de aves (*Gallus gallus*) submetidas a três diferentes densidades populacionais, bem como avaliar o peso médio e percentual de calos de patas em frangos de corte.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado com frangos de corte machos oriundos das mesmas matrizes da marca comercial Ross 308 em condições de campo normais. O experimento foi conduzido em uma propriedade rural de sistema integrado de parceria de aves, em Sidrolândia, MS. Foram utilizados 810 pintinhos criados em aviário de ambiente climatizado, com água e ração *ad libitum* até os 42 dias de idade. As condições de luminosidade, temperatura, umidade relativa e manejo foram as mesmas para todos os animais. Foi utilizado um programa de luz de 20 h/d. As dietas foram formuladas de acordo com os requerimentos nutricionais padrões para aves (Rostagno *et al.*, 2000).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três diferentes densidades populacionais (10, 15 e 20 aves/m²) e três repetições cada. Os boxes apresentavam seis metros quadrados de área.

Ao final da primeira e da última semana de vida uma ave de cada tratamento foi retirada aleatoriamente. A ave foi sacrificada e, imediatamente, após foi realizada a necrópsia observando-se minuciosamente o aspecto geral dos órgãos e colhendo a bolsa cloacal destinada a histopatologia.

Após retirar a ave, outro animal de mesma idade, marcado na asa, foi repostado no cercado para conservar a densidade do tratamento. Esta ave marcada não servia de amostras na colheita seguinte mesmo se fosse selecionada. Assim, foram colhidas três bolsas cloacais por tratamento, sendo uma de cada repetição.

As amostras destinadas a histopatologia foram fixadas em formol a 10% neutro tamponado; desidratadas em passagens sucessivas no álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, infiltradas e incluídas em parafina. Posteriormente, foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes histológicos com espessura máxima de 2 µm, que foram corados pela hematoxilina-eosina (Luna, 1968). Esse material foi processado no Laboratório de Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da UFMS.

A porcentagem do córtex do folículo linfóide bursal foi determinada através de imagens microscópicas capturadas com microcâmera de alta resolução JVC-Color Vídeo TK1270 e transferidas para um microcomputador com analisador de imagens Kontron Elektronik GMBH dotado do programa KS400 versão 3.0 em objetiva planapocromática 20 X, de 10 folículos

bursais completos, em três lâminas correspondentes a três aves por tratamento por semana. Foram escolhidos folículos em que o corte passava pela região central. Os folículos selecionados foram circundados por uma linha obtendo-se a área folicular total. Em seguida delimitamos a porção medular do mesmo folículo, passando uma linha sobre a membrana basal que dividia as duas áreas foliculares. Dessa forma, foi possível calcular a percentagem de córtex folicular subtraindo-se a área medular da área total de cada folículo. Esse material foi analisado no Laboratório de Patologia Veterinária da EMBRAPA CNPGC em Campo Grande.

Além disso, ao final dos 42 dias todas as aves foram pesadas e neste momento as patas foram analisadas para determinar se haviam calos individualmente nas aves dos nove boxes.

Os valores médios da área cortical folicular, o percentual de calos de patas e o peso final das aves foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se o programa BIOESTAT versão 3.0 (Santos et al., 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de peso corporal e percentual de calos de patas aos 42 dias encontram-se ilustrados nas Figuras 1 e 2. Para as densidades de 10, 15 e 20 aves/ m² os pesos médios foram de 2,583 Kg, 2,557 Kg e 2,470 Kg respectivamente.

Os resultados obtidos no experimento encontram-se em conformidade com a literatura, onde o peso corporal das aves é inversamente proporcional à densidade populacional (Feddes *et al.*, 2002). Houve diferença significativa entre o tratamento de 20 aves/m² e os tratamentos de 10 e 15 aves/m². Sendo que a densidade de 20 aves/m² mostrou-se desvantajosa em relação à densidade de 10 e 15 aves/m². Por outro lado, não houve diferença significativa entre o tratamento de 10 aves/m² para 15 aves/m². A não ocorrência de diferença estatística pode ser explicada pelo fato das aves serem criadas em ambiente climatizado. Assim, o efeito estressante da densidade de 10 para 15 aves/m² foi abrandado por um bom controle de temperatura e umidade relativa do ar. Já na densidade de 20 aves/m², nem mesmo o controle ambiental do aviário climatizado foi suficiente para compensar o estresse da alta densidade e da conseqüente disputa por ração e água. Dessa forma, baseado simplesmente em critérios econômicos e em rentabilidade por área, a melhor densidade populacional seria a de 15 aves/m², pois o efeito redutor sobre o peso corporal foi pequeno.

Trabalhos de densidade populacional com frangos de corte recomendam 17 aves/m² de forma a conseguir a máxima performance sem que haja o efeito negativo da competição das altas densidades. Isto é uma forma de reduzir os custos fixos e aumentar a rentabilidade ao máximo com um enfoque meramente econômico (Puron *et al.*, 1995). Evidentemente a densidade populacional dependerá do peso médio das aves no momento do abate.

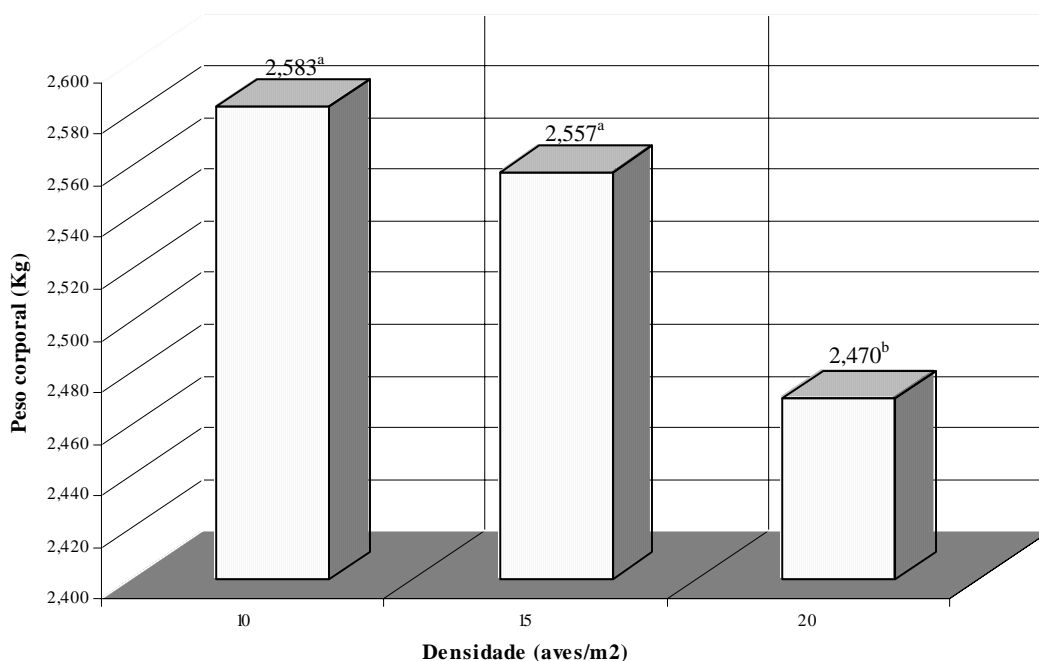


Figura 1 - Peso médio de frangos de corte submetidos a diferentes densidades populacionais aos 42 dias de idade.

^{a, b} Médias de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Ocorreram diferenças estatísticas no percentual de calos de patas entre os tratamentos de 10 aves/m², 15 aves/m² e 20 aves/m². Os resultados para estes tratamentos foram de 3,33%, 17,76% e 49,17% respectivamente. Este parâmetro é amplamente utilizado para medida do bem-estar das aves, pois existe uma correlação muito forte entre os problemas de condenação de carcaça e a pododermatite. Dessa forma, não há necessidade de registrar outros danos como calos no peito e no joelho, já que estes problemas são parcialmente causados pelos mesmos fatores que a dermatite do cochim plantar. Estes fatores são uma combinação de cama úmida, alto teor de amônia e outros fatores químicos da cama (Bruce *et al.*, 1990). A ocorrência de altos índices de condenações indicam um ambiente inadequado à criação dos animais. Nos resultados do experimento ficou claro que existe uma relação diretamente proporcional entre a densidade populacional e o percentual de calos de patas, demonstrando que a quantidade de animais por

metro quadrado interfere na condição da cama em função do volume de excrementos eliminados e, conseqüentemente, interfere negativamente na saúde e bem-estar dos animais intensamente confinados. Dessa forma, a frequência de calos de pé, bem como outras dermatites dependem das condições de manejo e principalmente da densidade populacional aplicada (Sorenson *et al.*, 2000). A melhor densidade populacional é a de 10 aves/m², onde o percentual de calos de patas mostrou vantagem significativa sobre os demais tratamentos. Além do benefício do ponto de vista do bem-estar animal, o menor percentual de calos de patas também tem um impacto positivo no aproveitamento da carcaça uma vez que esta parte do frango é exportada para o mercado Asiático a preços atraentes.

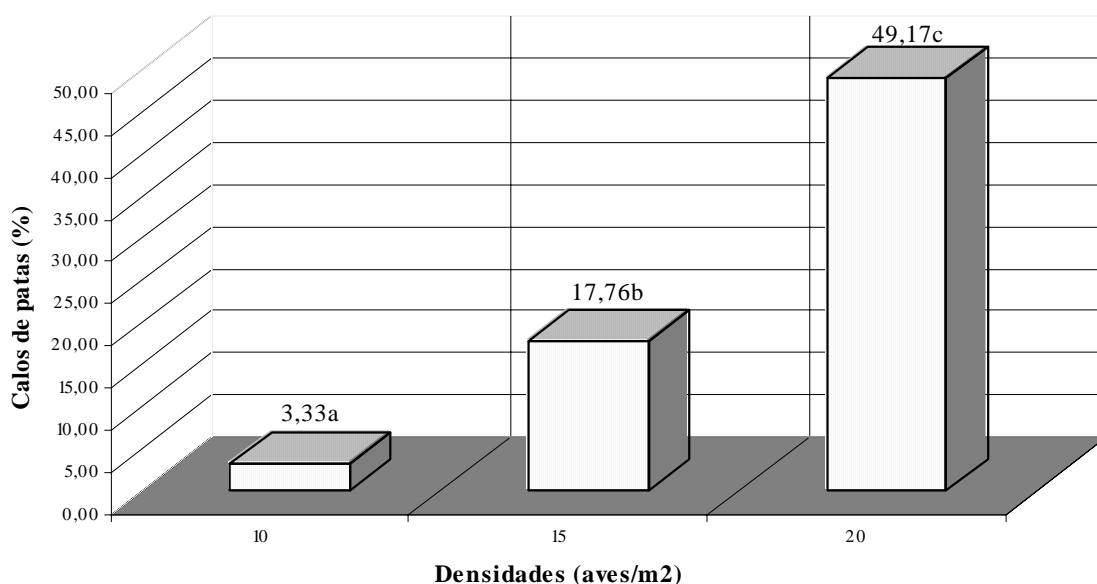


Figura 2 - Percentual de calos de patas de frangos de corte submetidos a diferentes densidades populacionais aos 42 dias de idade.

^{a, b, c} Médias de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados da histomorfometria da primeira e sexta semana das aves encontram-se expressos e ilustrados na Figura 3. Os processamentos histomorfométricos das amostras das bolsas cloacais demonstraram claramente o efeito das altas densidades populacionais sobre o percentual de córtex do tecido linfóide. Como é esperado, na primeira semana, não houve diferença entre os tratamentos, pois as aves dispõem de espaço suficiente proporcionalmente ao seu volume corporal. Logicamente nesta idade o efeito ambiental das diferentes densidades populacionais não seria suficiente para induzir a retração do tecido linfóide. Já na sexta semana

de vida, ocorreram diferenças estatísticas significativas entre o tratamento de 10 aves/m² e os de 15 e 20 aves/m². Isto mostra que, nesta idade, a ave criada em baixa densidade populacional terá o sistema imunológico mais bem preparado para responder aos desafios infecciosos. O resultado de maior percentual de córtex dos folículos linfóide nos permite afirmar que a ave criada na menor densidade populacional estará mais bem preparada para responder a qualquer desafio ambiental que acione o sistema imune. O mesmo foi demonstrado em condições de estresse por frio ou calor onde o percentual de córtex do folículo linfóide diminuiu significativamente mostrando que a bolsa cloacal da ave está sujeita ao efeito do ambiente (Guimarães *et al.*, 2001). Por outro lado, entre os tratamentos de 15 e 20 aves/m² não houveram diferenças estatisticamente significativas. Poderíamos afirmar então que não existe diferença na competência imunológica de aves criadas das duas densidades populacionais mais altas do experimento. Assim, do ponto de vista da competência imunológica, baseada no percentual de córtex do folículo linfóide, a melhor densidade populacional para a criação de frangos de corte seria a de 10 aves/m².

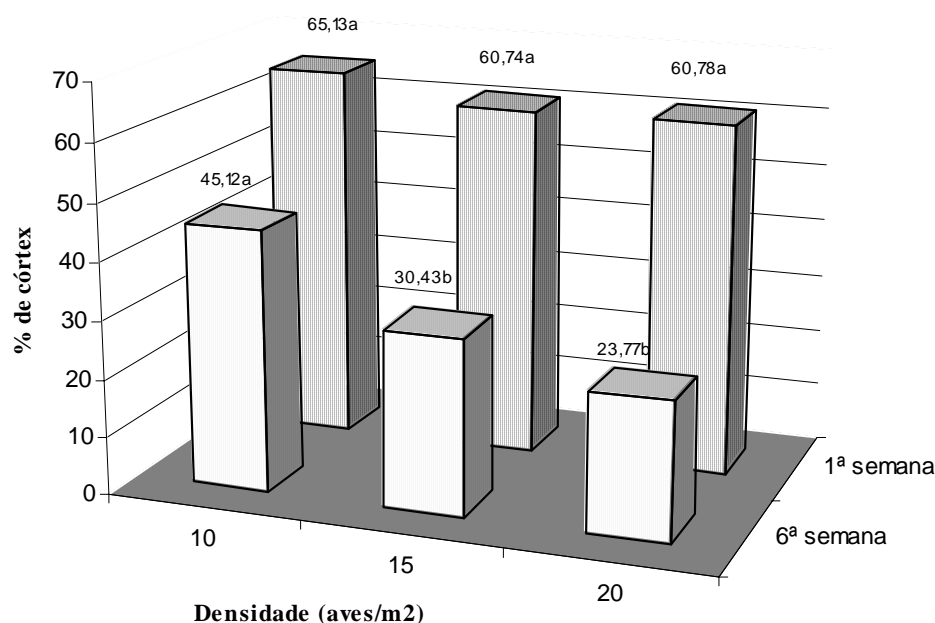


Figura 3 - Porcentagem da região cortical da bolsa cloacal de frangos de corte submetidos a diferentes densidades populacionais aos 7 e 42 dias de idade.

^{a, b} Médias de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Além da redução da área cortical do folículo linfóide, foi possível observar alterações morfológicas na avaliação qualitativa entre as aves criadas nas diferentes densidades onde o epitélio da bolsa cloacal dos animais criados com densidade populacional de 20 aves/m² apresentava-se pregueado indicando uma retração do órgão. Observaram-se folículos linfóides diminuídos de volume, com rarefação difusa de linfócitos tanto da região cortical quanto medular. Já nos animais criados com densidade de 10 aves/m² não se observou pregueamento do epitélio o que indica que o tecido linfóide não estava passando por redução de área. Nestas aves os folículos linfóides estavam bem celularizados, totalmente preenchidos por linfócitos, com definição clara das regiões cortical e medular. Estas diferenças encontram-se ilustradas na Figura 4.

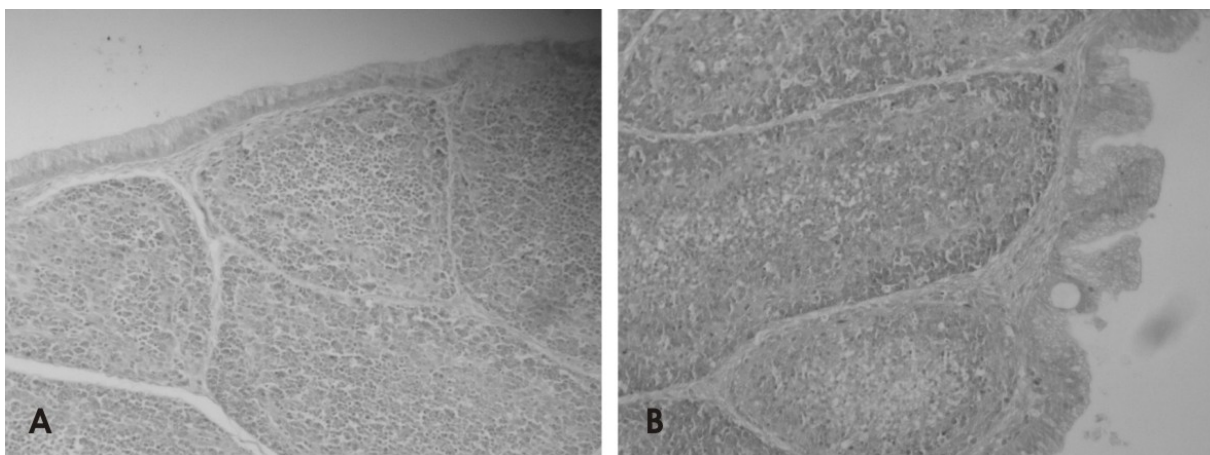


Figura 4 – Corte histológico da bolsa cloacal de frango de corte com 42 dias de idade. (A) Tecido linfóide de ave criada em densidade de 10 aves/m² com epitélio distendido. (B) Tecido linfóide de ave criada em densidade de 20 aves/m² com epitélio pregueado (HE 200X).

Com a análise das variáveis propostas no trabalho é possível fazer uma relação entre o peso corporal, o percentual de calos de patas e a morfologia da bolsa cloacal. É possível afirmar que à medida que a ave cresce e o espaço fica limitado, o estresse da densidade populacional determina efeito danoso ao tecido linfóide, ao percentual de calos de patas e ao ganho de peso dos animais. Ou seja, em maior ou menor grau, todas as variáveis estudadas foram afetadas pelo aumento da densidade populacional. Avaliando os parâmetros de bem-estar animal e de competência imunológica o melhor tratamento é o de 10 aves/m². No entanto, com relação ao peso corporal das aves, o melhor tratamento foi o de 15 aves/m², pois economicamente permite um melhor aproveitamento da área de alojamento produzindo maior volume de carne por metro

quadrado de área construída. Assim, a decisão acertada quanto à densidade populacional a ser aplicada na criação do frango de corte ficará entre 10 e 15 aves/m² e esta decisão deverá levar em conta tanto parâmetros de produção, quanto parâmetros de mercado. Para consumidores mais exigentes no quesito de bem-estar animal, os produtores deverão optar pela densidade mais baixa, já para mercados menos preocupados com bem-estar animal a densidade de 15 aves/m² poderá ser utilizada no intuito de ganhar em produção mesmo que haja perda em aproveitamento de patas e competência imunológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bilgili SF, Hess JB. Placement density influences broiler carcass grade and meat yields. *Journal of Applied Poultry Research* 1995; (4):384-389.

Bruce DW, Mcilroy SG, Goodall EA. Epidemiology of a contact dermatitis of broilers. *Avian Pathology* 1990; 19:523-538.

Dohms JE, Metz A. Stress: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology Immunopathology* 1991; (30):89-109.

Ekstrand C, Carpenter TE. Spatial aspects of foot-pad dermatitis in Swedish broilers. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1998; 39:219-228.

Feddes JJR, Emmanuel EJ, Zuidhofs MJ. Broiler performance, body weight variance, feed and water intake, and carcass quality at different stocking densities. *Poultry Science* 2002; 81:774-779.

Guimarães EB, Vasconcelos AC, Martins NRS, Moro L. Porcentagem de parênquima e índice apoptótico da bolsa cloacal em frangos de corte em ambiente de conforto e estresse térmico. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2001; v. 55, n. 2, p. 178-186.

Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed. New York: MacGraw-Hill; 1968. 258p.

Paramithiotis E, Ratcliffe MJH. Survivor of B cell production and emigration. *Poultry Science* 1994; 73(7):991-997.

Puron D, Santamaria R, Segaura JC, Alamilla JL. Broiler performance at different stocking densities. *Journal of Applied Poultry Research* 1995; (4):55-60.

Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Ferreira AS, Oliveira DC. Tabelas brasileiras para aves e suínos. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: Ed. UFV, 2000.

Santos AS, Ayres Jr M, Ayres M, Ayres DL. BIOESTAT versão 3.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Sociedade Civil Mamirauá / MCT CNPq; 2003.

Sorenson P, Su G, Kesiin SC. Effects of age and stocking density on leg weakness in broiler chickens. Poultry Science 2000; 79:864-870.