

**PAULA HORÁCIO CESAR**

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS QUE DETERMINAM ESTRESSE EM  
POEDEIRAS COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Eliseu Gewehr

**LAGES  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Cesar, Paula Horácio Avaliação de metodologias  
que determinam estresse em poedeiras comerciais /  
Paula Horácio Cesar. Lages , 2017.

69 p.

Orientador: Clóvis Eliseu Gewehr  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Corticosterona. 2. Estresse oxidativo. 3.  
Muda induzida . 4. Relação heterófilo/linfócito.  
I.

Gewehr, Clóvis Eliseu. II. Universidade do Estado de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III.

Título.

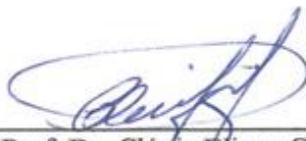
**PAULA HORÁCIO CESAR**

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS QUE DETERMINAM ESTRESSE EM  
POEDEIRAS COMERCIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

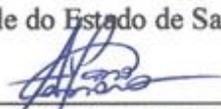
**Banca examinadora**

Orientador:



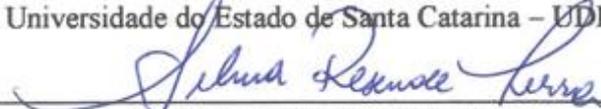
Prof. Dr. Clóvis Eliseu Gewehr  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro interno:



Prof. Dr. Ademir Cassiano da Rosa  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro externo:



Prof.ª Dr.ª Silvia Resende Terra  
Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL

**Lages, 24/fevereiro/2017.**



Com todo meu amor dedico a dissertação presente, símbolo de uma superação conjunta, aos meus digníssimos pais Adriana e José Carlos.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, quem me enche de fé e espiritualidade, por me proporcionar força para concluir lindamente a jornada em Lages. Iluminando-me ao colocar em meu caminho pessoas abençoadas que pude desfrutar das amizades e, portanto, descrevo meus sentimentos de gratidão e reconhecimento a estas.

Aos meus pais Adriana e José palavras pouco simbolizam. Agradeço-os pela educação, valores e princípios ensinados, e por tornar tão presente e estimulante os estudos na minha vida: lembro-me mãe, quando me ensinavas a estudar quando eu era criança e elaboravas uma prova para me avaliar. Eu a agradeço por isso. Obrigada pai por estar presente de uma maneira delicadamente amorosa. Hoje eu tenho filmagens quando pequena, aprendendo a estudar na cadeira de plástico vermelha, e isso me enche os olhos de emoção. Eternamente grata pelos pequenos e grandes gestos de amor, família.

A UDESC pela formação acadêmica e aos professores que compõem a Instituição. Agradeço a todos os Mestres que, admiravelmente, estiveram presentes durante a graduação de Medicina Veterinária e Pós-graduação no CAV/UDESC, pelos ensinamentos e possibilidades de crescimento profissional.

Ao professor Clóvis Gewehr agradeço pela oportunidade de ingresso no mestrado, uma vivência enriquecedora, positiva e desafiante. Obrigada professor pela orientação, conhecimentos compartilhados, por me escutar em momentos de dificuldades, pelas palavras sábias que muito me auxiliaram, e especialmente, pela confiança depositada.

A Aline Schneider, quem me ensinou durante a graduação sobre a avicultura, e com muito amor me fez me apaixonar também pela área. Obrigada pela professora que fosses, sabes a diferença que fez na minha vida.

Ao Setor de Avicultura do CAV/UDESC, pelas instalações e aves para execução do presente estudo. Mas muito mais que isso, ao Setor existe “dedicação e afeto” pois conheci pessoas maravilhosas que juntas, em um trabalho em equipe, fizemos muitas coisas acontecerem. Agradeço por todas as rotinas, pelas várias instalações que montamos para alojar pintos, as idas de madrugada verificar o aquecimento das aves, as coletas e análises de ovos, os



finais de semana intensamente trabalhados: lavando, limpando, esfregando, varrendo e carregando. Às risadas e gargalhadas, comidas e cucas da Aline, churrascos na casa do professor. Enfim, a todas as lembranças gostosas e a todos os esforços dedicados às aves durante vários anos fazendo do “Setor” grande parte da minha vida em Lages. Muito obrigada.

A equipe do Setor de Avicultura do CAV/UEDESC que auxiliou durante toda a execução do presente estudo à campo. Aos meus colegas da Pós-graduação Aline Schneider, Cleverson de Souza, Flávio Manabu e Jaqueline Mayer. Aos bolsistas de trabalho Hélio Schlemper e Leonardo Henrique e às bolsistas de Iniciação Científica Vanessa Mattei e Giovana Ghislandi. Muito obrigada pela dedicação, responsabilidade, paciência e atenção, tornando possível o estudo planejado.

Ao Cleverson de Souza, um presente que Deus colocou em minha vida. Obrigada pela nossa amizade e pelo bem que ela me faz. Quero poder um dia lhe retribuir toda minha gratidão.

Ao Juliano Uczay, pelas análises laboratoriais de estresse oxidativo e pela parceria desenvolvida durante o estudo. Obrigada por sempre se demonstrar muito atencioso e disposto a contribuir para a execução do experimento.

A Jane Daum, pedagoga do CAV/UEDESC, pela profissional e pessoa maravilhosa, encantadora e acolhedora que é. Meu respeito e admiração por você que foi meu anjo em muitos momentos.

A Dr. Adriana Cardozo, querida psicóloga, quem desfruto das suas deliciosas sessões de muita sabedoria e amor, profissionalismo e dom, conforto e equilíbrio do coração e da alma. Você não sabe o bem que me faz e nada seria possível sem sua ajuda, muito obrigada.

Aos professores que compuseram a banca de mestrado, professor Ademir da Rosa e professora Silvia Terra por aceitarem o convite e por contribuir com suas arguições, obrigada.

Às demais pessoas que auxiliaram de alguma forma para a concretização desse sonho,

Obrigada.



Tudo posso naquele que me conforta, Amém.

(Arlete Ione Corrêa Horácio, *in memoriam*)



## RESUMO

CESAR, Paula Horácio. **Avaliação de metodologias que determinam estresse em poedeiras comerciais.** 2017. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal - Área de Concentração: Produção Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Com o objetivo de avaliar metodologias que indicam estresse em poedeiras comerciais, um experimento foi conduzido no Setor de Avicultura do CAV/UEDESC, utilizando 48 poedeiras da linhagem HyLine Brown com 79 semanas de idade. As aves foram alojadas em gaiolas apropriadas e submetidas a um período de muda induzida durante 10 dias de jejum alimentar, avaliando cinco metodologias para indicativo de estresse (concentração de corticosterona plasmática - CORT, relação heterófilo/linfócito - H/L, catalase - CAT, glutathiona reduzida - GSH e níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS), em seis dias de coleta de amostras de sangue (zero, dois, quatro, seis, oito e 10 dias do período de jejum alimentar). Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições por dia de coleta, sendo cada ave considerada como uma unidade experimental. As coletas para as metodologias CORT e relação H/L iniciaram às 16 h e as demais às 8 h. Para determinar a concentração de CORT e a relação H/L foi coletado sangue da veia ulnar e as demais a veia jugular. Em cada coleta, oito aves foram selecionadas aleatoriamente, e após o procedimento, retornavam às gaiolas. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade dos dados e as variáveis apresentaram distribuição normal. Realizou-se estudo de regressão polinomial para determinar o momento de máximo estresse para cada metodologia. Como todos os métodos fornecem resultados quantitativos foi possível utilizar a correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS (2009). As metodologias que avaliaram a concentração de CORT, GSH e TBARS apresentaram comportamento quadrático na regressão polinomial com momentos de máximo estresse aos 4,3; 4,3 e 5,5 dias de jejum alimentar, respectivamente. As aves no dia zero apresentaram uma média de CORT plasmática de 1,76 ng/ml, com posterior aumento progressivo do hormônio até atingir o pico de estresse (4,3 dias). A relação H/L apresentou comportamento linear crescente no estudo de regressão polinomial, com momento de máximo estresse aos 10 dias de muda induzida. A atividade da CAT apresentou comportamento linear decrescente na análise de regressão polinomial. Para os coeficientes de correlação de Pearson, considerando todos os momentos de coleta, não houve uma alta correlação entre as metodologias, não sendo possível a substituição de um método pelo outro. Conclui-se que as metodologias da concentração de CORT plasmática, relação H/L, concentração de GSH e atividade da enzima CAT são indicadas para mensurar estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida por jejum alimentar, porém, cada uma apresenta um momento diferente de máximo estresse, impossibilitando a utilização de apenas um método em substituição aos demais.

**Palavras-chave:** Corticosterona. Estresse oxidativo. Muda induzida. Relação heterófilo/linfócito



## ABSTRACT

CESAR, Paula Horácio. **Evaluation of methodologies that measure stress in commercial laying hens**. 2017. 69f. Dissertation (MSc in Animal Science – Area: Animal Production) – Santa Catarina State University. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2017.

With the aim to investigate methodologies that indicate stress in commercial laying hens, the study was conducted at Poultry Sector of the CAV/UDESC, using 48 HyLine Brown hens, with were 79 wk of age. The hens were housed in appropriate cages and the molt was induced by feed withdrawal for 10 days, five methodologies were investigated (corticosterone plasmatic level - CORT, heterophil:lymphocyte ratio - H/L, catalase - CAT, reduced glutathione - GSH and level of thiobarbituric acid reactive substances - TBARS), in six days of blood samples collect (zero, two, four, six, eight and 10 days of feed withdrawal). The experimental design was completely randomized with eight replicate per day of collection, each hen was considered as an experimental unit. The collections for methods CORT and H/L ratio were obtained at 1600 h and the rest at 0800 h. To determine CORT level and H/L ratio the blood samples were collected from wing vein and jugular vein for other methodologies. In each collection, eight hens were randomly assigned and after procedure they returned to the cages. The Shapiro-Wilk test was applied to verify the normality of the data and the variables presented normal distribution. It was used polynomial regression analysis to determine the moment of maximum stress for each methodology. As all methods provide quantitative results it was possible to use Pearson correlation. Data analysis was done with the SAS (2009). CORT levels, GSH and TBARS there were a quadratic effect in polynomial regression analysis with moment of maximum stress to 4,3; 4,3 and 5,5 days of feed withdrawal, respectively. The hens at day zero had a mean plasma CORT of 1.76 ng/ml with subsequent progressive increase of the hormone until reaches the peak of stress (4.3 days). The H/L ratio had growing linear effect in polynomial regression analysis, with moment of maximum stress to 10 days of forced molted. The enzyme activity of CAT had decreasing linear effect in polynomial regression analysis. For the Pearson correlation coefficients, considering all collection moments, there was not a high correlation between the methods, therefore it is not possible to substitute one method with another. It was concluded that the methodologies of CORT plasmatic levels, H/L ratio, concentration of GSH and activity of the CAT enzyme are indicated to measure stress in commercial laying hens submitted to forced molted induced by feed withdrawal, however, each one has a different moment of maximum stress, making it impossible to use only one method to replace the others.

**Keywords:** Corticosterone. Forced molted. Heterophil:lymphocyte ratio. Oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo catalítico da glutathiona .....	37
Figura 2 - Exemplos de células utilizadas para o cálculo da relação H/L. H, heterófilo, L, linfócito. Todas as células foram encontradas em aves com 80 semanas de idade submetidas à muda induzida por jejum alimentar. Microscopia óptica 100x (óleo).....	43



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Concentração (média) de corticosterona (CORT) plasmática de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias de CORT plasmática a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média. ....	45
Gráfico 2 – Relação (média) heterófilo/linfócito (H/L) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da relação H/L a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média. ....	47
Gráfico 3 - Atividade da enzima catalase (CAT) (média) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da CAT a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média. ....	49
Gráfico 4 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (média) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da GSH a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média. ....	51
Gráfico 5 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (médias) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da quantificação de malondialdeído (MDA) a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média. ....	52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado das avaliações das diferentes metodologias que indicam estresse em poedeiras comerciais submetidas.....	67
Tabela 2 - Coeficientes de Correlação de Pearson (r) de metodologias que avaliam o estresse em .....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH: hormônio adrenocorticotrópico
- CAT: catalase
- CRH: hormônio de liberação da corticotropina
- CV: coeficiente de variação
- EPM: erro padrão da média
- EROS: espécies reativas de oxigênio
- GSH: glutatona reduzida
- GSH-Px: glutatona peroxidase
- GR: glutatona redutase
- GSSG: glutatona dissulfeto
- H/L: relação heterófilo/linfócito
- H<sub>2</sub>O: água
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio
- HPA: eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical
- MDA: malondialdeído
- OH<sup>°</sup>: radical hidroxila
- O<sub>2</sub>: oxigênio molecular
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>: ânion superóxido
- SOD: superóxido dismutase
- TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>ESTRESSE.....</b>	<b>29</b>
2.2	MUDA INDUZIDA .....	30
2.3	CORTICOSTERONA .....	31
2.4	RELAÇÃO HETERÓFILO/LINFÓCITO .....	32
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO .....	35
2.6	OBJETIVOS.....	38
<b>2.6.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>38</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>38</b>
2.7	HIPÓTESES.....	39
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1	LOCAL E INSTALAÇÕES .....	41
3.2	AVES.....	41
3.3	ESTÍMULO ESTRESSOR .....	41
3.4	METODOLOGIAS .....	42
<b>3.4.1</b>	<b>Corticosterona .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Relação heterófilo/linfócito.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Estresse oxidativo .....</b>	<b>44</b>
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A fisiologia do estresse é utilizada para descrever a soma dos mecanismos de defesa do organismo animal frente a qualquer estressor capaz de induzir repostas defensivas (SELYE, 1950; ROMERO, 2004). Consiste em um processo bastante complexo, com o envolvimento dos sistemas nervoso e endócrino, e ocorrência de uma sequência de eventos compensatórios para reestabelecer o *status* homeostático do corpo (DHABHAR e McEWEN, 1997). O estresse pode alterar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical (HPA) (SIEGEL, 1971), aumentando a concentração sanguínea de hormônios glicocorticóides, em especial, a corticosterona (CORT) em aves (ROOS, 1960). O aumento plasmático desses hormônios solicita mecanismos adaptativos, preparando o organismo animal para responder às mudanças impostas. Há influência sobre o número de leucócitos sanguíneos e consequente comprometimento do sistema imunológico das aves (DHABHAR et al., 1994; DHABHAR, 2009), além de interferir na regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras (EILER, 2012), alterar o comportamento animal, reduzir o desempenho zootécnico (MUMMA et al., 2006) e induzir a processos de estresse oxidativo (BOZKURT et al., 2016).

Dentre os estímulos estressores, a muda induzida é uma prática comumente utilizada na produção avícola comercial (ZULKIFLI, 1999) e considerada altamente estressante. O objetivo desse manejo é interromper temporariamente a produção de ovos, permitindo um descanso ao sistema reprodutor feminino e reciclagem das aves para o segundo ciclo de produção (LEE, 1982). O método convencional de induzir as aves à muda consiste em submetê-las ao jejum alimentar completo com duração variável, por isso é descrita como um procedimento fortemente estressante para as aves (HOSHINO et al., 1988; KOELKEBECK e ANDERSON, 2007). Essa informação foi primordial para a escolha do estímulo estressor do presente estudo, pois assim, as aves estariam estressadas e as metodologias poderiam estimar o estresse. Além disso, observou-se na literatura que não se tem dada a mesma atenção para a muda induzida em analisar as repostas fisiológicas desencadeadas, como para outros estressores (MAXWELL, 1993). A maioria dos estudos sobre a muda testam protocolos alternativos de indução, comparando com o método convencional que utiliza o jejum alimentar, em caráter de substituição e ênfase para a preocupação com o bem-estar das aves (ALODAN e MASHALY, 1999; WEBSTER, 2003; GONGRUTTANANUN et al., 2013; BOZKURT et al., 2016).

Na avicultura é possível estimar o estresse de poedeiras a partir da execução de metodologias adequadas (ALM et al., 2016). Entretanto, não existe um consenso favorável para avaliar o bem-estar das aves (BLOKHUIS et al., 2007). Mormède et al. (2007) descrevem a

concentração de CORT plasmática como o “método ouro” para investigação do estresse. Scanes (2016) considera a CORT plasmática e a relação heterófilo/linfócito (H/L) como os métodos mais comumente utilizados quando o objetivo é avaliar estresse em aves. Já é sabido que o estresse causa aumento na concentração de CORT, e que este hormônio esteróide exerce influência sobre o número de heterófilos e linfócitos sanguíneos, sendo que aves estressadas tendem a apresentar maior relação H/L, em função da heterofilia e linfopenia observados (GROSS e SIEGEL, 1983).

O estresse oxidativo também é um evento que pode ser desencadeado nas aves perante a presença de determinados agentes estressores (PANDA e CHERIAN, 2014). O organismo apresenta enzimas e substâncias não enzimáticas como via de defesa contra o acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROS) e, conseqüente, efeitos destrutivos nas células e tecidos corporais (SURAI, 2000). Quando há um desbalanço entre substâncias antioxidantes e oxidantes, o estresse oxidativo é estabelecido (XIE et al., 2015). Para as metodologias é amplamente utilizado a quantificação de malondialdeído (MDA), que dá uma estimativa da lipoperoxidação (ECHEVERRY et al., 2016), além de outros métodos que estimam a quantidade de substâncias antioxidantes.

Diante do contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar metodologias que indicam estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ESTRESSE

O termo estresse pode se referir ao conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais que o organismo desenvolve perante a um estímulo estressor, procurando se adaptar às pressões internas e externas do ambiente. Se houver persistência do estressor, os desafios enfrentados pelo organismo se agravam e a capacidade de resposta do sistema imune se reduz, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de enfermidades ou injúrias (ROMERO, 2004). A resposta ao estresse envolve uma sequência de eventos fisiológicos com a liberação de neurotransmissores, hormônios, peptídeos e outros fatores na circulação sistêmica ou em tecidos locais, como mensageiros do cérebro para o organismo (DHABHAR e McEWEN, 1997), sendo que o sucesso da resposta de uma ave vai depender da gravidade do estressor e da integridade do sistema neuroendócrino (SIEGEL, 1971, 1980).

O sistema neuroendócrino está envolvido com a produção de metabólitos energéticos, para que os mecanismos de defesa do organismo utilizem essa suplementação de energia contra o estressor (MORMÈDE et al., 2007). A primeira fase de resposta do organismo ao estresse envolve o aumento da secreção dos hormônios catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) promovido pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático, que prepara o animal para a atividade fisiológica de “luta ou fuga” em situações de estresse agudo (MAXWELL, 1993; DHABHAR, 2009).

Em termos biológicos, a duração do estresse para a maioria dos organismos pode ser classificada como agudo ou crônico, sendo que estressores de curta duração perduram por minutos ou horas e estressores crônicos persistem por horas a dias, durante semanas ou meses (DHABHAR, 2002), sendo que essa classificação é bastante variável entre as espécies animais.

A resposta ao estresse continua com a segunda fase que está relacionada com a alteração do eixo HPA (SIEGEL, 1971), denominado de circuito supra-renal (EILER, 2012). A percepção do estresse se dá pelo cérebro a partir de estímulos neurais, que induzem a um aumento na secreção do hormônio de liberação da corticotropina (CRH) por axônios de neurônios hipotalâmicos para o sistema porta hipofisário. O CRH estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) por corticotropos na adeno-hipófise. Em resposta ao nível de ACTH sanguíneo, o córtex da adrenal aumenta a produção dos hormônios glicocorticóides (SIEGEL, 1971). Dessa forma, a CORT circulante é distribuída para todas as células do corpo, exercendo uma regulação metabólica nas células-alvo, as quais são células com receptores

específicos para CORT (EILER, 2012). Entretanto, Scanes (2016) diz que nem todos os agentes estressores são capazes de causar efeito na concentração dos hormônios glicocorticóides em aves, isto é, o estímulo no eixo HPA difere entre agentes biológicos, nutricionais e fatores como a luminosidade, por exemplo.

Os hormônios glicocorticóides desempenham um papel importante na preparação do animal durante a experiência estressante, como por exemplo, enviando um sinal para o tráfico dos leucócitos para outros compartimentos corporais (DHABHAR et al., 1994; 2009). Conseqüentemente, há alterações na função imunológica da ave que pode ser observada pelo indicador da relação H/L (GROSS e SIEGEL, 1983). Além disso, os glicocorticóides regulam o metabolismo de carboidratos pois promovem maior disponibilidade de glicose para o coração, sistema nervoso e músculos esqueléticos, perante a síntese de glicogênio e subsequente armazenamento no fígado (EILER, 2012). Assim como, estimulam a gliconeogênese hepática, na qual em uma das rotas bioquímicas ativadas ocorre a glicogenólise que proporciona o substrato glicose-6-fosfato para a produção de glicose livre na circulação (BACILA, 2003; MORMÈDE et al., 2007). Há redistribuição da gordura corporal em algumas áreas do corpo (EILER, 2012), e, negativamente, podem suprimir o crescimento, alterar o comportamento animal, reduzir o desempenho zootécnico como a menor produção de ovos durante o período estressor (MUMMA et al., 2006) e induzir ao estresse oxidativo (BOZKURT et al., 2016).

## 2.2 MUDA INDUZIDA

A partir da manipulação do fotoperíodo e privação de água e alimento é possível induzir as aves à muda. O objetivo do manejo é interromper temporariamente a produção de ovos para reciclar as aves para o segundo ciclo produtivo (GILDERSLEEVE et al., 1982; GONGRUTTANANUN et al. 2013), sendo possível reduzir os custos de produção, como os da substituição por frangas (BRAKE e THAXTON, 1979b). A prática é comumente utilizada na produção avícola comercial (ZULKIFLI, 1999) e possibilita um período de descanso ao sistema reprodutor feminino que involui após o início do tratamento e retorna, gradativamente, à produção após o retorno do alimento (LEE, 1982). O método convencional é realizado pelo jejum alimentar completo e ressalta-se que é considerado altamente estressante para as aves (HOSHINO et al., 1988; KOELKEBECK e ANDERSON, 2007).

A muda induzida apresenta diferentes protocolos. Pode ser obtida pelo fornecimento limitado de ração (ZIMMERMANN e ANDREWS, 1990), formulação de dietas com baixos níveis de sódio (ROSS e HERRICK, 1981), excesso de zinco (BERRY et al., 1987; ALODAN

e MASHALY, 1999) associado com baixo nível de cálcio (BREEDING et al., 1992), infusão de hormônios como a progesterona (ADAMS, 1955; DICKERMAN e BAHR, 1989) e o método convencional com remoção do alimento e/ou água e redução do fotoperíodo para o natural (NOLES, 1966; BRAKE et al., 1979, 1981, 1982, 1984; BRAKE e THAXTON, 1979ab; GILDERSLEEVE et al., 1982; BERRY, 2003). A retirada de alimento pode perdurar até 10 dias (CHRISTMAS et al., 1985), 14 dias ou mais (KOGUT et al., 1999; WEBSTER, 2003), sendo que quando as aves atingem uma redução de massa corporal de 30 % tem-se melhor desempenho pós-muda (BAKER et al., 1983).

### 2.3 CORTICOSTERONA

A CORT é o hormônio esteróide encontrado em maior quantidade no plasma das aves (ROOS, 1960) e considerada por muitos pesquisadores um indicador confiável para mensurar o *status* de estresse. Todos os hormônios esteróides são sintetizados a partir do colesterol, que é convertido na célula em pregnenolona e, sequencialmente, em progesterona. A partir da progesterona, existem três vias principais: aldosterona, cortisol e androgênios, sendo que a síntese dos esteróides depende da disponibilidade enzimática em cada área histológica (EILER, 2012). Em função do efeito hiperglicêmico, glicocorticóides é o nome genérico dado a substâncias semelhantes ao cortisol e no caso de substâncias semelhantes à aldosterona, o nome genérico é mineralocorticoide, por causa das propriedades de retenção de sódio e excreção de potássio (EILER, 2012). Os glicocorticóides são sintetizados pela zona fasciculada-reticular e os mineralocorticóides pela zona glomerulosa, ambas do córtex da adrenal (COOPER e HAUSMAN, 2007). Além disso, a glândula adrenal secreta pequenas quantidades de esteróides gonadais (estrogênios, androgênios) pelo córtex e catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) pela medula da adrenal (EILER, 2012).

Os esteróides supra-renais secretados e liberados para a corrente sanguínea encontram-se na forma livre, porém, são rapidamente anexados a proteínas transportadoras no sangue (transcortina e albuminas) (EILER, 2012). Em aves, cerca de 80 a 90 % dos corticosteróides circulantes encontram-se vinculados a globulinas de ligação (GOULD e SIEGEL, 1978), as quais desempenham funções como proteção contra à excreção renal e inativação hepática (EILER, 2012). Aquelas livres ou não ligadas desempenham papel de importância no controle do estresse, pois se assume que somente os corticosteróides livres são biologicamente ativos, isto é, capazes de atravessar a membrana celular do tecido alvo e exercer efeitos específicos (THOMPSON e LIPPMAN, 1974; SCANES, 2016).

As respostas fisiológicas da ave doméstica durante a privação alimentar foram sequenciadas por Webster (2003) em três fases. Destaca-se a primeira fase, com duração aproximada de três dias e caracterizada por ajustes fisiológicos e comportamentais das aves, redução do catabolismo protéico e energético, e aumento temporário de CORT plasmática que os autores relacionaram com um maior estado de alerta para busca por alimento. O ritmo circadiano de CORT foi avaliado por Beuving e Vonder (1977) durante um período de 24 horas a partir de amostras de plasma de poedeiras. Constataram maior concentração do hormônio no final do período escuro e menor no início do período noturno. Além disso, verificaram que 44 minutos antes do ato de postura houve maior concentração de CORT, com retorno aos valores normais uma hora após a ovoposição.

Existem poucos estudos de CORT plasmática durante a fase de retirada do alimento na muda induzida (WEBSTER, 2003). Hoshino et al. (1988) utilizou o jejum alimentar por oito dias e jejum hídrico pelos dois dias iniciais para indução da muda em poedeiras. A CORT plasmática foi determinada pela técnica de radioimunoensaio e observaram aumento na concentração hormonal no início do período da muda, atingindo quantidade máxima no pico da muda, o que mostra que o jejum é um potente agente estressor capaz de ativar o eixo HPA. Nos resultados de Davis et al. (2000) houve aumento significativo da CORT plasmática durante a muda e mesmo após o retorno da alimentação a CORT continuou a aumentar, identificando o estresse fisiológico da ave. Para Freeman et al. (1983) a junção do jejum alimentar e hídrico em aves durante um período de 24 horas não apresentou efeito aditivo sobre o *status* de estresse desses animais quando aplicado a metodologia da concentração de CORT.

Com relação à metodologia Scanes (2016) relata que existem diferentes marcadores na literatura referentes à concentração basal de corticosteróides, sugerindo maior atenção ao método, uma vez que os ensaios em plasma, excretas, penas ou gema devem ser validados. Mumma et al. (2006) em modelo de estudo de estresse por infusão contínua de ACTH em poedeiras, concluíram que a concentração de CORT e todos os parâmetros imunológicos como a relação H/L apresentaram resultados bastante semelhantes entre poedeiras e frangos de corte.

## 2.4 RELAÇÃO HETERÓFILO/LINFÓCITO

O heterófilo é o granulócito mais comum em aves e desempenha função semelhante ao neutrófilo em mamíferos, isto é, atua como primeira linha de defesa do organismo, proliferando na circulação sanguínea em resposta a infecções, inflamações e ao estresse (MAXWELL, 1993; WAKENELL, 2010). Essa célula é produzida na medula óssea e distribuída na corrente

sanguínea em dois compartimentos, de acordo com a localização nos vasos. Existem os heterófilos que circulam livremente no sangue, estes considerados no compartimento circulante, e os que estão temporariamente aderidos às células endoteliais, considerados no compartimento marginal (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Os linfócitos são leucócitos não granulados que constituem o sistema imunológico do organismo, envolvidos em uma variedade de funções como o reconhecimento e a destruição de diferentes agentes patogênicos (MAXWELL, 1993). Existem dois tipos de linfócitos: linfócitos B (centro da resposta imune humoral), responsáveis pela produção de imunoglobulinas que destroem bactérias, vírus ou moléculas identificadas como estranhas; e os linfócitos T (centro da resposta imune celular), que destroem células hospedeiras infectadas por vírus, parasitas e tecidos estranhos (NELSON e COX, 2014). Os linfonodos e outros tecidos linfóides primários são os locais de síntese dos linfócitos e da mesma forma que os heterófilos, eles encontram-se distribuídos nos vasos sanguíneos conforme a localização nos mesmos (compartimento circulante ou marginal), podendo migrar para os linfonodos ou outros tecidos e executar funções (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

A relação H/L aviária foi realizada primeiramente pelas pesquisas de Gross e Siegel (1983) após observarem aumento no número de heterófilos (heterofilia) e diminuição no número de linfócitos (linfopenia) em aves submetidas a estímulos estressores. A partir de então a metodologia passou a ser utilizada para monitorar a função imunológica e para acessar o bem-estar das aves (DAVIS, 2005), sendo considerado um parâmetro confiável para mensuração do estresse (ZULKIFLI, 1999; DAVIS et al., 2008). Para executá-la é necessário a coleta de uma pequena amostra de sangue total para a confecção de estensões sanguíneas, posterior contagem diferencial dos leucócitos para realizar o cálculo através da divisão entre a percentagem de heterófilos e percentagem de linfócitos encontrados nas lâminas (GROSS e SIEGEL, 1983). Para Gross e Siegel (1983), ao comparar a relação H/L com a concentração de CORT sanguínea os autores consideraram que a relação apresentou resultados mais confiáveis, pela menor variação no número de células individuais. Além disso, relataram que a concentração de CORT é um método melhor aplicado para estressores de curto prazo e a relação H/L para os de longo prazo.

Em teoria, o estresse gera desequilíbrio no eixo HPA, aumentando a concentração de hormônios glicocorticóides circulantes, que alteram o número de leucócitos sanguíneos, sendo, a heterofilia e a linfopenia as principais respostas leucocitárias observadas em aves e que contribuem para mudanças nos valores da relação H/L (COTTER, 2015). O aumento da relação H/L é proporcional ao aumento da concentração de hormônios glicocorticóides (DHABHAR,

2002). A indução ao estresse pode ser realizada por diferentes estressores como pela administração do hormônio ACTH em aves (SHAPIRO e SCHECHTMAN, 1949; MUMMA et al., 2006) ou pela inclusão de corticosterona na dieta (GROSS et al., 1980), sendo que estudos mostram que a aplicação de ACTH e glicocorticóides exógenos geram leucocitose (heterófilos) e leucopenia (linfócitos) (SIEGEL, 1968; GROSS et al., 1980). Mumma et al. (2006) estudaram o modelo de estresse em poedeiras a partir da infusão contínua de ACTH dissolvida em solução salina durante sete dias. A relação H/L diferiu significativamente no grupo de aves em estresse ( $1,35 \pm 0,12$ ) em comparação ao grupo controle ( $0,34 \pm 0,02$ ) que recebeu somente solução salina. Ainda no mesmo estudo, a concentração de CORT foi mensurada e houveram diferenças estatísticas entre o grupo controle (4,470 ng/ml) e as aves do tratamento com ACTH (10,280 ng/ml), entretanto, os autores discutem que a CORT não é totalmente aceita pelos estudos como um indicador confiável de estresse para poedeiras, perante a diversidade de resultados descritos na literatura.

A explicação para as alterações leucocitárias de heterófilos e linfócitos em aves durante o estresse são pouco discutidas nos estudos que avaliam a relação H/L. Bishop et al. (1968) explicam que o aumento no número de heterófilos pode estar relacionado com o maior fluxo das células da medula óssea para a corrente sanguínea ou devido a menor taxa de migração para os tecidos corpóreos. Já, a linfopenia pode estar associada com a destruição dos linfócitos na circulação sistêmica por ação dos glicocorticóides (CLAMAN, 1975). Contudo, essa teoria não é totalmente aceita. Dhabhar (2002) descreve que a redução significativa dos linfócitos está associada com alterações no tráfico ou na redistribuição dessas células do sangue para outros compartimentos corporais por ação dos hormônios glicocorticóides, sendo que os linfócitos se aderem às células endoteliais dos vasos sanguíneos e, subsequentemente, transmigram da circulação para dentro dos tecidos, onde são sequestrados.

Outro estudo mostra que a restrição alimentar durante seis, 10 e 14 dias em frangos de corte resultou em aumento significativo da relação H/L em comparação às aves que receberam ração *ad libitum* (MAXWELL et al., 1991). Em poedeiras comerciais foi observado aumento gradativo da relação H/L das 20 às 64 semanas de idade, atingindo valor máximo durante o período de muda e posterior declínio pós-muda (DAVIS et al., 2000). O resultado significativamente maior da relação H/L durante a muda é explicado pelos autores como um mecanismo de defesa da ave ao estresse fisiológico decorrente da perda de peso corporal.

O uso da relação H/L como um único indicador para acessar o estresse de poedeiras, avaliadas em gaiolas convencionais e gaiolas enriquecidas de 18 a 77 semanas de idade, não foi considerada apropriada no estudo realizado por Cotter (2015). Os baixos valores da relação H/L

acompanhados de uma alta média da contagem total de células sanguíneas brancas e a alta frequência de células atípicas, confirmados microscopicamente, foram as principais limitações relatadas pelo autor, perante o uso isolado da relação H/L. Destaca-se que os resultados foram fortemente associados a bacteremia e fungemia, e que a relação H/L não diferiu significativamente entre as formas de alojamento das aves. Além disso, Cotter (2015) observou uma alta variabilidade dos dados hematológicos, como coeficientes de variação (CV) entre 58 a 67 % nas análises com 18 semanas de idade das aves, suportando outra restrição do método. Lentfer et al. (2015) concordam em não recomendar a relação H/L como parâmetro de mensuração do estresse em aves, utilizando-o de forma singular, pois consideram os resultados de difícil interpretação.

Não existem valores de referência adequados para a relação H/L que permitam a comparação dos estudos, além disso, distinguir o tipo de estresse em que as aves foram submetidas (agudo ou crônico) são outras dificuldades relatadas na literatura sobre a metodologia (COTTER, 2015). Em adição, o estresse quando muito severo (restrições alimentares prolongadas) pode resultar em heteropenia, diminuindo a relação H/L, e, conseqüentemente, gerando interpretações erradas, como a menor capacidade da ave em responder ao estresse (MAXWELL, 1993). As recomendações complementares ao método da relação H/L são: análises de comportamento animal (LENTFER et al., 2015) ou a contagem total e diferencial dos leucócitos sanguíneos, comparando-o com a relação H/L (COTTER, 2015). Entretanto, observações comportamentais por si só não são suficientes para afirmar que as aves estão estressadas ou não (ALM et al., 2016).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

A porção celular do sangue é representada pelos eritrócitos, leucócitos e trombócitos e a porção líquida, que é o plasma sanguíneo, apresenta uma vasta gama de proteínas, nutrientes, metabólitos, produtos de excreção, íons inorgânicos e hormônios (NELSON e COX, 2014). Os eritrócitos das aves quando maduros são elípticos, bicôncavos, nucleados (THRALL et al., 2006), providos de mitocôndrias e apresentam membrana celular formada por uma bicamada fosfolipídica (VOET et al., 2014). O papel dos eritrócitos é basicamente transportar O<sub>2</sub> para os tecidos através da hemoglobina (Hb) e remover o CO<sub>2</sub> (MAXWELL, 1993). Para que esta proteína intracelular desempenhe sua função o Fe deve se encontrar no estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>). Entretanto, como a Hb apresenta grande quantidade de Fe na sua estrutura isso torna mais passível a oxidação da Hb para meta-hemoglobina, devido às características do metal

(COMPORTI, 2002). Essa susceptibilidade está relacionada com a capacidade de um elétron do Fe ligado ao grupo heme tornar-se desemparelhado, passando do estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para o estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), o que restringi suas funções.

O oxigênio é uma molécula necessária nas células eucarióticas para a produção de energia em forma de ATP (COOPER e HAUSMAN, 2007). A energia é gerada a partir da redução completa do oxigênio nas mitocôndrias, as quais apresentam a cadeia transportadora de elétrons e complexos respiratórios, tendo como produto final a água (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Nesse processo, o oxigênio pode receber um elétron e se reduzir, formando substâncias intermediárias altamente instáveis conhecidas como as EROS (PANDA e CHERIAN, 2014). As EROS podem ser classificadas como radicais livres ou não- radicais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e apresentar um ou mais elétrons desemparelhados no exterior da sua órbita molecular (HALLIWELL e CROSS, 1994), como o radical hidroxila ( $^{\circ}\text{OH}$ ), o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\circ}$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Já as EROS não- radicais são aquelas que não apresentam elétrons ímpares, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), porém, também são quimicamente reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; TRACHOOTHAM et al., 2009).

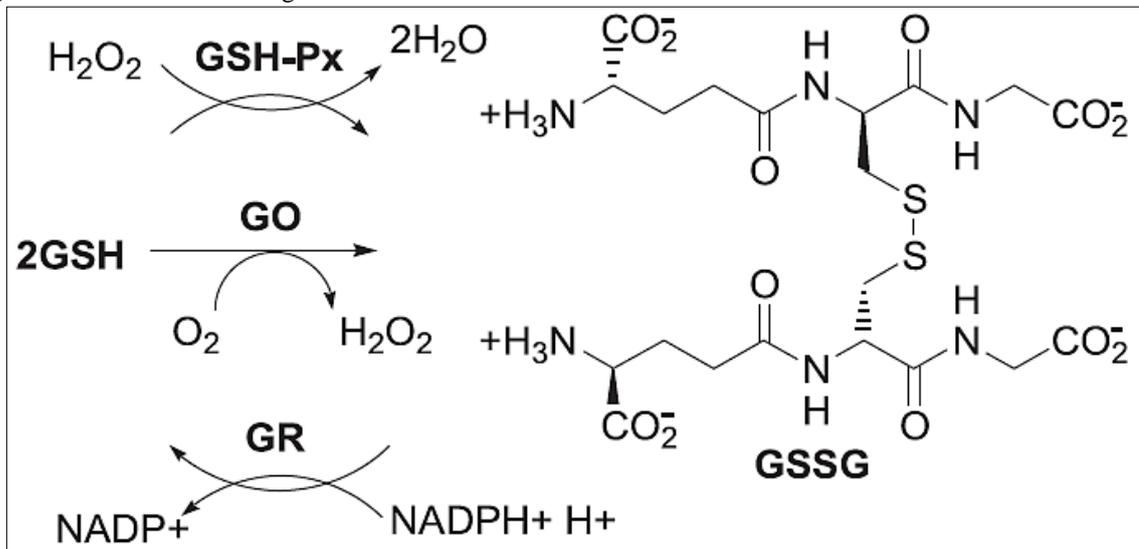
O metabolismo fisiológico dos tecidos produz constantemente as EROS (PANDA e CHERIAN, 2014) que são removidas pelo sistema de defesa antioxidante, mantendo, assim, a homeostasia. O sistema de defesa antioxidante enzimático é composto pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione reductase (GR) (WANG et al., 2016). Moléculas como a glutathione,  $\beta$ -caroteno, vitaminas C e E representam a linha de defesa não enzimática (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Quando o oxigênio molecular recebe um elétron a primeira ERO a ser formada é o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que é convertido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela atuação da enzima SOD. Posteriormente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é transformado em (água)  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  através de reações enzimáticas catalisadas pela CAT ou GSH-Px, eliminando eficazmente as EROS (FANG et al., 2002).

A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos que são organelas que realizam reações de oxidação, levando à produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é tóxico para as células animais, os peroxissomos possuem a enzima CAT, que decompõe esse composto, convertendo-o em água ou utilizando-o para oxidar outros compostos orgânicos (COOPER e HAUSMAN, 2007). A glutathione (GSH) está presente em plantas, animais e em algumas bactérias, frequentemente em níveis altos, pode ser considerada um tampão redox, sendo derivada dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina (NELSON e COX, 2014), sintetizada no meio

intracelular, principalmente pelo fígado, e transferida para a corrente sanguínea, por onde circula e é fornecida para outros tecidos corpóreos via circulação entre-órgãos (ANDERSON et al., 1980). Desempenha funções como síntese de precursores do DNA e proteção das células contra os efeitos deletérios dos radicais livres (MEISTER, 1983) a partir do sistema *redox* da glutathiona, no qual atua em ciclos entre sua forma reduzida e sua forma oxidada (HUBER e ALMEIDA, 2008).

A figura 1 mostra o ciclo catalítico da glutathiona necessário para formação da enzima GSH-Px, a qual é utilizada para remover peróxidos tóxicos formados durante o curso normal do crescimento e do metabolismo em condições aeróbicas (COOPER e HAUSMAN, 2007). Inicialmente, ocorre a oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) por ação da GSH-Px e glutathiona oxidase (GO). Posteriormente, a GSH é regenerada a partir da GSSG pela enzima glutathiona redutase (GR), utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como fonte de elétrons (HUBER et al., 2008). A forma oxidada da glutathiona contém duas moléculas de glutathiona ligadas por meio de uma ligação dissulfeto (COOPER e HAUSMAN, 2007). As reações de óxido-redução da glutathiona acontecem somente no meio intracelular, pois não existem mecanismos para redução da GSSG no meio extracelular. Logo, a GSH deve ser continuamente fornecida a partir da célula (MEISTER, 1983).

Figura 1 - Ciclo catalítico da glutathiona



Fonte: Huber et al. (2008)

Ressalta-se que em animais saudáveis a produção e destruição das EROS são mantidos em equilíbrio (REUTER et al., 2010). No entanto, quando há um maior contrapeso em favor da produção das EROs, isto é, disparidade entre substâncias oxidantes e antioxidantes, estabelece-

se o estresse oxidativo (WANG et al., 2016). Os efeitos deletérios das EROS estão relacionadas com a capacidade de se combinarem inespecificadamente com qualquer molécula integrante da estrutura celular como lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (SURAI, 2000), provocando uma reação de oxidação em cascata que pode resultar em disfunções e morte celular. Isso dependerá de fatores como a natureza do estressor, tempo de exposição e mecanismos de ação ativados (HALLIWELL e CROSS, 1994).

Para avaliar a peroxidação lipídica é comumente utilizada a quantificação do MDA, principal substância que reage com o ácido tiobarbitúrico (YAGI, 1976; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990). Essa metodologia diz que a partir do aumento na quantidade de MDA maior são os danos aos lipídios de membrana celular e conseqüentemente maior é o estresse oxidativo (YAGI, 1976; ECHEVERRY et al., 2016).

Na avicultura, poucos estudos têm avaliado o *status* oxidante de poedeiras comerciais durante a muda induzida. Estudos investigam métodos alternativos de indução da muda em caráter de substituição ao convencional de jejum alimentar e comparam os *status* oxidantes das aves (BOZKURT et al., 2016), ou estudos investigam a capacidade antioxidante de ingredientes na ração de frangos de corte a partir de uma indução artificial (YU et al., 2015; ZHENG et al., 2016), ou, ainda, a literatura descreve outros tipos de estressores (BAO et al., 2011; LIU et al., 2014).

## 2.6 OBJETIVOS

### 2.6.1 Objetivo geral

Avaliar metodologias que indicam estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida através do jejum alimentar.

### 2.6.2 Objetivos específicos

Determinar o momento de máximo estresse através das metodologias da concentração de CORT plasmática, relação H/L, atividade da enzima CAT, concentração da GSH e níveis de TBARS em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida através do jejum alimentar.

Correlacionar as diferentes metodologias incluídas que indicam estresse em poedeiras comerciais.

## 2.7 HIPÓTESES

As metodologias da concentração de CORT plasmática, relação H/L, concentração de GSH, atividade da enzima CAT e níveis de TBARS são indicadas para determinar estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida por jejum alimentar.

O momento de máximo estresse é diferente entre as metodologias incluídas.

Existe uma alta correlação positiva entre as metodologias e, portanto, um método pode ser utilizado para representar os demais como indicativo de estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida por jejum alimentar.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL E INSTALAÇÕES

O experimento foi realizado na sala de ensaios de metabolismo do Setor de Avicultura CAV/UEDESC, na cidade de Lages/SC. Foram utilizadas 12 gaiolas (0,5 x 0,5 m) dotadas de comedouro tipo calha, bebedouros tipo *nipple* e bandeja coletora de excretas. O ambiente da sala foi controlado de acordo com a temperatura de conforto para a idade das aves segundo o manual da linhagem (24 °C), com o auxílio de um termo higrômetro posicionado na altura das mesmas. O controle da ambiência era aferido no mínimo três vezes ao dia (8, 11 e 16 h), concomitante a observação do comportamento das aves.

O projeto foi submetido e avaliado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UDESC, sendo o protocolo de aprovação sob o número 5377250116.

#### 3.2 AVES

Foram utilizadas 48 poedeiras comerciais com 79 semanas de idade, da linhagem HyLine® Brown, sendo alocadas quatro aves em cada gaiola, as quais tiveram origem do plantel da própria Instituição, adquiridas com um dia de idade e criadas conforme o manual da linhagem.

#### 3.3 ESTÍMULO ESTRESSOR

As aves foram submetidas a um período de adaptação às gaiolas e ao ambiente de sete dias recebendo ração isonutritiva com formulação indicada para a fase de postura e água clorada *ad libitum* (5 ppm). No primeiro dia de adaptação as aves foram anilhadas para identificação e distribuídas aleatoriamente nas gaiolas. A pesagem individual das aves foi realizada ao término da adaptação e ao final do período da muda induzida, para determinar o percentual de perda de massa corporal. Os comedouros foram removidos das gaiolas para início do estímulo estressor que consistiu na muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos, sendo a água fornecida *ad libitum*. Não foram observados mortalidade e canibalismo durante o período experimental.

### 3.4 METODOLOGIAS

O experimento consistiu na execução de cinco metodologias que avaliam o estresse:

- › Corticosterona (CORT)
- › Relação heterófilo/linfócito (H/L)
- › Catalase (CAT)
- › Glutationa reduzida (GSH)
- › Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Durante o processo foram realizadas seis coletas de amostras de sangue, aos zero, dois, quatro, seis, oito e 10 dias do período de jejum alimentar. Em cada coleta, oito aves foram selecionadas aleatoriamente, procedendo-se a coleta, e retornando as aves em seguida às gaiolas para completar o período total estipulado para o processo de muda. Nenhuma ave foi reutilizada para coleta de sangue.

Após 10 dias de jejum alimentar e alcançada a perda média de  $\pm 30\%$  de massa corporal, as aves passaram a receber ração controlada de acordo com as quantidades (g/ave/dia) recomendadas pelo manual da linhagem, possibilitando retorno à capacidade produtiva.

Para as metodologias CAT, GSH e TBARS foi padronizado o horário de início das coletas às 8h e utilizado seringas plásticas descartáveis de 10 ml e agulhas descartáveis 30 x 0,8 mm, utilizando como via de coleta a veia jugular.

Para as metodologias CORT plasmática e relação H/L foi padronizado o horário de início das coletas às 16 h, considerando o ritmo circadiano de CORT e com o objetivo de eliminar a influência do hormônio sobre a postura (BEUVING e VONDER, 1977). Após as coletas de amostras para CORT, foram elaboradas as estensões sanguíneas para H/L, ambas executadas com o auxílio de seringas plásticas descartáveis de 5 ml e agulhas descartáveis 20 x 0,55 mm, sendo a via de coleta a veia ulnar.

#### 3.4.1 Corticosterona

Foi coletado 3-4 ml de sangue por ave em frascos com anticoagulante heparina, seguido da centrifugação das amostras durante 10 min a 3.500 rpm para obtenção de plasma. Amostras de plasma foram acondicionadas em freezer  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o transporte para o laboratório, devidamente refrigeradas, onde foi realizada a técnica de radioimunoensaio pelo *kit* NPBio Radioimunoensaio® pelo laboratório Bet Labs/RJ.

A contenção manual das aves para a coleta de sangue não excedeu 45 segundos, cujo tempo foi cronometrado para evitar aumento na concentração de CORT em função da imobilização manual (BEUVING e VONDER, 1978).

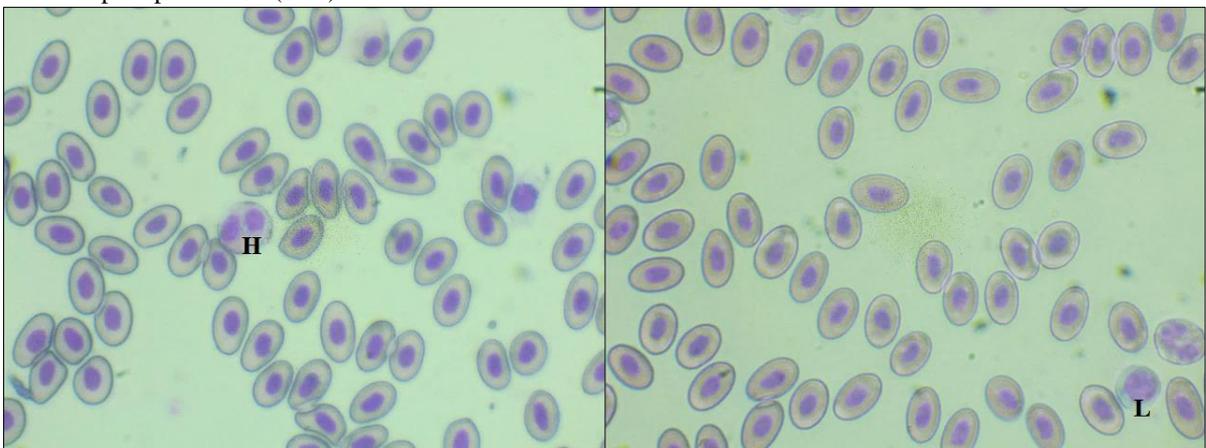
### 3.4.2 Relação heterófilo/linfócito

Foram confeccionadas estensões sanguíneas, em duplicata, a partir da coleta de 1 ml de sangue por ave da veia ulnar. A partir de uma pequena gota de sangue total liberada da seringa para a extremidade da lâmina foi realizada o movimento de extensão com o auxílio de uma outra lâmina, formando uma película de sangue uniformemente distribuída. Imediatamente, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e coradas com Giemsa e May Grunwald New Prov®, segundo as recomendações do fabricante.

A leitura foi realizada em microscópio óptico Opticam Microscopia® com captura de imagem 100x (óleo de imersão), com contagem de 200 células por lâmina para diferenciação em granulócitos (heterófilo, eosinófilo e basófilo) e agranulócitos (monócito e linfócito). A leitura das lâminas foi executada por uma única pessoa e posteriormente as imagens foram capturadas. A figura 2 demonstra exemplo de células que foram utilizadas para o cálculo da relação H/L.

Para o reconhecimento celular foram utilizadas as características morfológicas descritas por Lucas e Jamroz (1961) e a relação H/L foi calculada pela divisão entre a percentagem de heterófilos pela percentagem de linfócitos (GROSS e SIEGEL, 1983), sendo obtida pela média de duas lâminas por ave.

Figura 2 - Exemplos de células utilizadas para o cálculo da relação H/L. H, heterófilo, L, linfócito. Todas as células foram encontradas em aves com 80 semanas de idade submetidas à muda induzida por jejum alimentar. Microscopia óptica 100x (óleo)



Fonte: elaborado pela própria autora

### 3.4.3 Estresse oxidativo

Coletou-se 3 a 4 ml de sangue por ave para cada metodologia pela veia jugular em tubos EDTA. As amostras identificadas foram imediatamente armazenadas em freezer -80 °C até o envio para o processamento no Laboratório de Piscicultura e Bromatologia da Universidade Federal de Santa Maria. Todas as análises foram realizadas em amostras de sangue total.

Para avaliar a atividade da CAT o tecido sanguíneo foi inicialmente homogeneizado em solução salina 150 mM e o teor de proteína foi medido utilizando o método de Coomassie (BRADFORD, 1976). A atividade da CAT foi avaliada seguindo o decréscimo na absorção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm e expressa em µmol/mg de proteína/min (BOVERIS e CHANCE, 1973).

Para avaliar a concentração de GSH foi utilizado o método indireto do conteúdo de tióis não proteicos (NPSH), avaliado a 412 nm após reação com o DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)]. As proteínas foram eliminadas por meio da adição de 0,5 M de ácido perclórico (ELLMAN, 1959) e os resultados do conteúdo de NPSH estão apresentados em µmol/de SH/g de tecido sanguíneo.

A lipoperoxidação foi mensurada pela quantidade de MDA obtida pelo método de TBARS descrito por Buege e Aust (1978). MDA é o produto final da peroxidação dos ácidos graxos que reage com o ácido tiobarbitúrico para formar um complexo colorido, sendo a absorbância mensurada em espectrofotômetro a 532 nm (BOZKURT et al., 2016). Os resultados são reportados em nmol/MDA/g de tecido sanguíneo.

## 3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As aves foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco metodologias de avaliação de estresse e seis momentos de coleta de amostras, com oito repetições cada, sendo cada ave considerada uma unidade experimental.

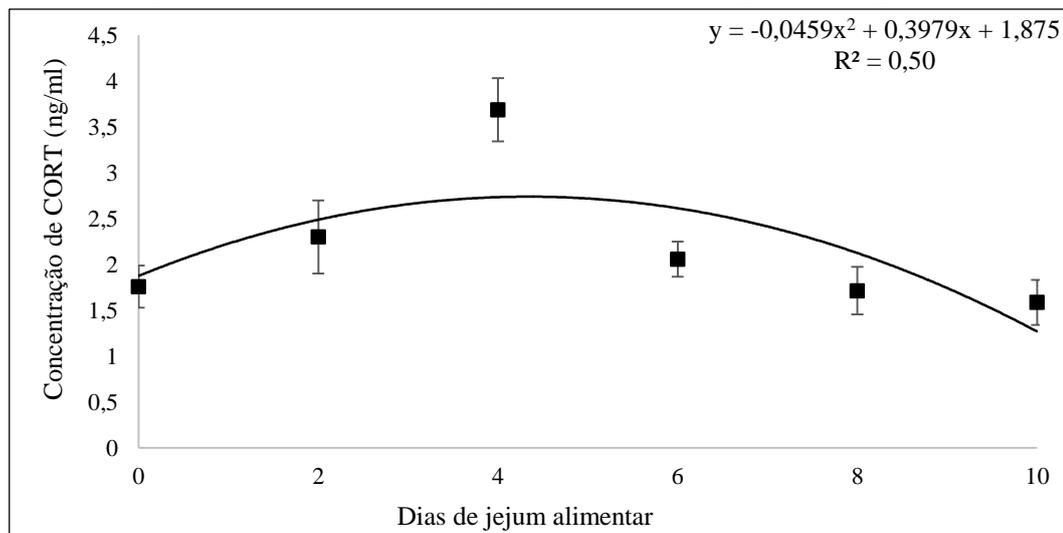
Inicialmente, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados. As variáveis apresentaram distribuição normal e foi realizado estudo de regressão polinomial para determinação do dia ótimo de cada metodologia, isto é, o momento de máximo estresse. Em função de todas as metodologias fornecerem resultados quantitativos foi possível correlacioná-las através da correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico SAS (2009).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura média mínima e máxima observadas durante o experimento foram, respectivamente, 20,2 °C e 26,3 °C. As aves apresentaram peso médio no início da muda induzida de 2.072g ± 137, e no final de 1.501g ± 126, resultando em perda média de massa corporal de 27,7 %. Na tabela 1 é apresentado os resultados das metodologias que avaliam o estresse em poedeiras comerciais em função dos momentos de coleta (Anexo A).

A concentração de CORT apresentou comportamento quadrático na regressão polinomial com momento de máximo estresse aos 4,3 dias de jejum alimentar conforme indica o gráfico 1. As aves apresentaram uma média de CORT plasmática de 1,76 ng/ml, com posterior aumento progressivo do hormônio até atingir o pico de estresse (4,3 dias) com 3,69 ng/ml, e após houve um declínio contínuo até o término da muda induzida.

Gráfico 1 – Concentração (média) de corticosterona (CORT) plasmática de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias de CORT plasmática a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média.



Os resultados indicam que a muda induzida é um estímulo estressor capaz de alterar o eixo HPA aumentando os níveis plasmáticos de CORT. Siegel (1971) explica que diante do estresse, estímulos neurais atuam sobre o hipotálamo e aumentam a secreção do CRH que estimula a adeno-hipófise a liberar o ACTH. O ACTH em altas concentrações sanguíneas estimula o córtex da adrenal a liberar os hormônios esteróides para a circulação sistêmica (SIEGEL, 1971), sendo que a primeira alteração endócrina observada em poedeiras submetidas ao jejum alimentar é a maior concentração de CORT plasmática (BERRY, 2003). O envio de CORT à corrente sanguínea é realizado de acordo com as necessidades do organismo em

mobilizar energia, pois esse hormônio promove a gliconeogênese, auxiliando na manutenção dos níveis plasmáticos de glicose na fase inicial da privação alimentar (WEBSTER, 2003). Os lipídios, especialmente os triglicerídeos, são mobilizados pelos glicocorticóides do tecido adiposo em poedeiras (SAHIN e KUCUK, 2001).

Como método de indução de muda em poedeiras Etches et al. (1984) alternaram dias com e sem água e alimento, sendo fornecido à vontade aveia inteira nos dias de arraçoamento, durante um período de 14 dias. A concentração plasmática de CORT foi mensurada pela técnica de radioimunoensaio durante todo o tratamento e detectaram o momento de máximo estresse das aves após 48 horas do início da muda, com valores entre 3 a 4 ng/ml, e posteriormente a concentração hormonal diminuiu. Os resultados de Etches et al. (1984) assemelham-se com o do presente estudo, no qual com dois dias de jejum alimentar as aves apresentaram 2,30 ng/ml de concentração de CORT plasmática.

No estudo de Hoshino et al. (1988), a CORT plasmática foi mensurada em poedeiras submetidas à muda induzida através do jejum alimentar por oito dias e jejum hídrico pelos dois dias iniciais. As coletas de amostras de sangue ocorreram em: antes da muda (postura), início da muda, pico da muda, final da muda e pós-muda, sendo a técnica de radioimunoensaio utilizada em plasma para determinar a CORT. Os autores encontraram um aumento significativo de CORT plasmática do início ao pico da muda com valores de 154,6 e 186,8 ng/ml, respectivamente, e ao final da muda a CORT diminuiu para 36,1 ng/ml, demonstrando que a muda é um potente agente estressor imposto à ave. Destaca-se que esse estudo foi um dos poucos encontrados na literatura que mostra a CORT plasmática em poedeiras durante a muda induzida. Destaca-se a ampla distância numérica dos resultados encontrados por Hoshino et al. (1988) comparada com a maior concentração de CORT plasmática (3,69 ng/ml) obtida no presente estudo. Isso representa uma limitação deste indicador de estresse que é descrita por Mumma et al. (2006), a ampla variedade de resultados da literatura.

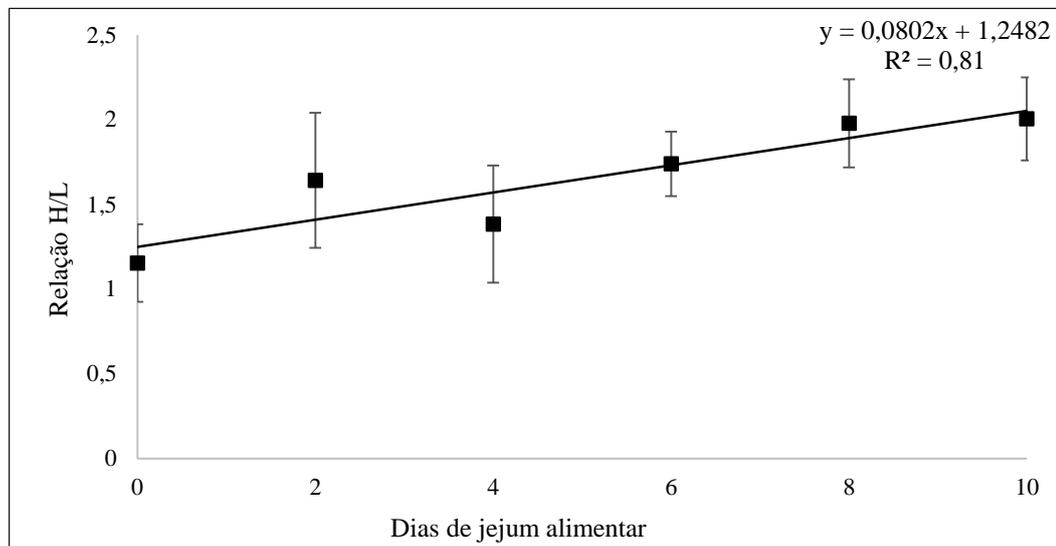
A avaliação da eficácia de dois ingredientes para induzir a muda, durante o fornecimento por 12 dias, em poedeiras com 83 semanas de idade, foi realizada por Bozkurt et al. (2016). As coletas de amostras ocorreram após 6 dias de início da muda, e o soro obtido foi utilizado para mensurar a CORT plasmática, utilizando o método de ELISA, diferentemente do presente estudo. Os autores obtiveram um aumento significativo do hormônio nas aves em muda comparada com aquelas que recebiam ração isonutritiva de postura, com valores de 4,99 e 2,96 ng/ml, de modo respectivo.

Outros estudos envolvendo muda induzida indicam resultados diferentes como diminuição nos níveis de CORT (GILDERSLEEVE et al., 1982), picos de estresse aos quatro

e 14 dias de tratamento de muda (BRAKE et al., 1979). Segundo Decuypere e Verheyen (1986) os resultados de CORT plasmática reportados na literatura durante a muda induzida em poedeiras são inconsistentes pela ampla variação. Scanes (2016) também concorda e relaciona o fato à necessidade de se validar a metodologia para o tipo de amostra utilizada.

A relação H/L do sangue das aves apresentou comportamento linear na análise de regressão polinomial, conforme apresentado no gráfico 2. À medida que aumenta os dias de jejum alimentar, a relação H/L também aumentou, o que indica que essa prática foi interpretada pelo organismo como uma ameaça constante. O método utilizado demonstrou-se eficaz como um indicador para avaliar o estresse em aves e, especificamente, para o estímulo da muda induzida a metodologia reconheceu o momento de maior estresse aos 10 dias de jejum alimentar. O aumento na relação H/L durante a muda induzida é interpretado como uma tentativa do organismo em combater o estresse fisiológico proveniente da ausência de alimento e consequente perda de peso corporal (DAVIS et al., 2000).

Gráfico 2 – Relação (média) heterófilo/linfócito (H/L) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da relação H/L a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média.



Os resultados obtidos confirmam que a muda induzida é capaz de alterar o eixo HPA, gerando o estresse. Conforme discutido na metodologia anterior, a muda foi capaz de elevar os níveis sanguíneos de hormônios glicocorticóides (Tabela 1) que têm importante atuação sobre o número de leucócitos sanguíneos (GROSS e SIEGEL, 1983). A privação alimentar causa alteração na CORT plasmática podendo levar a mudanças no número de heterófilos e linfócitos (WEBSTER, 2003). O aumento induzido pelo estresse na relação H/L pode ser atribuído, parcialmente, pelos efeitos da CORT elevada, pois nem todos os agentes estressores causam

aumento da relação e consequente aumento de CORT (SCANES, 2016). No presente estudo, as aves demonstraram maior estresse ao final do manejo da muda. Quanto maior a relação H/L maior é a indicação de estresse da ave (GROSS e SIEGEL, 1983)

Os mecanismos que explicam a heterofilia e linfopenia em aves em estresse são incertos. Fisiologicamente, Stockham e Scott (2011) relatam que a concentração de neutrófilos sanguíneos pode ser influenciada por alguns fatores, tais como: a proliferação e diferenciação de células-tronco, a liberação a partir da medula óssea, a distribuição entre os compartimentos circulante e marginal, e a migração do sangue para os tecidos. E para os linfócitos sanguíneos, a migração para os linfonodos e outros tecidos. Bishop et al. (1968) ao induzir a granulocitose em humanos a partir da administração de cortisol observaram um aumento no número de granulócitos e sugeriram que o mecanismo se dá pela maior produção de células na medula óssea, elevando a taxa de egresso na corrente sanguínea, ou, devido a menor taxa de saída das células para outros tecidos. Maxwell (1993) complementa que o ACTH sanguíneo apresenta ação quimiotáxica sobre os heterófilos, produzindo aumento na relação H/L. Com relação aos linfócitos, a linfopenia induzida por estresse pode estar associada com a maior taxa de migração dos linfócitos para outros compartimentos corpóreos (DHABHAR, 2002).

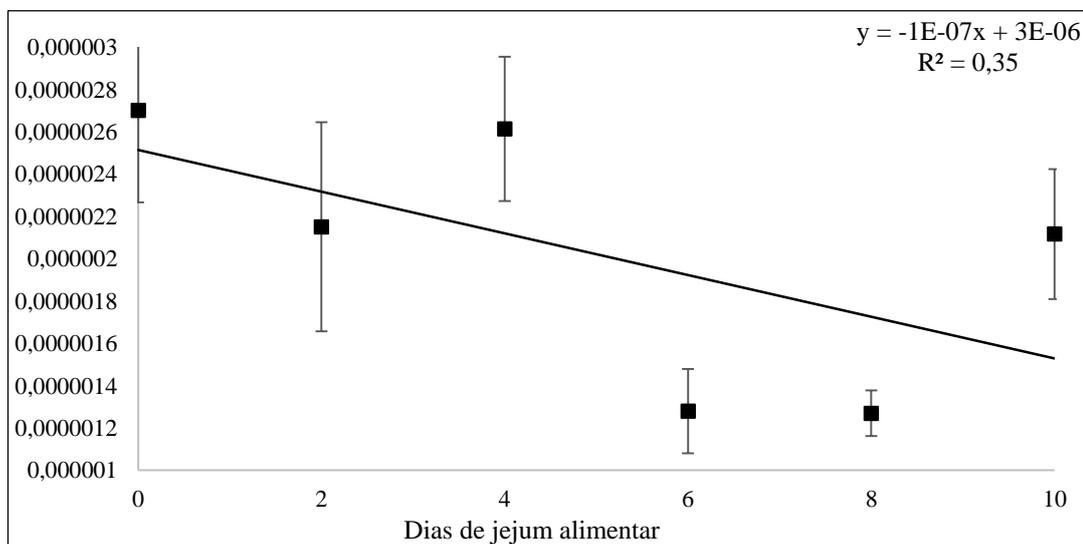
Não existem valores de referência apropriados para a relação H/L em aves (COTTER, 2015). No presente estudo os resultados da relação variaram entre 1,153 e 2,003 durante o período de jejum alimentar (Tabela 1). Davis et al. (2000) obtiveram uma relação H/L de 0,71 em poedeiras durante o pico da muda induzida, sendo que quando essas aves encontravam-se com 20 semanas de idade os valores eram significativamente menores, 0,082. Gongruttananun et al. (2013) avaliaram a capacidade de alguns ingredientes na ração de induzir a muda em poedeiras e encontraram valores da relação H/L entre 0,39 e 0,67, aos 14 dias de muda. Nesse estudo os autores calcularam a relação somente ao término do tratamento e não durante o processo. Alodan e Mashaly (1999) compararam diferentes protocolos de muda e observaram que todos valores da relação H/L foram superiores ao grupo controle (aves não submetidas à muda), confirmando que o manejo é extremamente estressante. Os autores encontraram relações de 0,17 a 0,61, calculados em diferentes períodos de tempo durante 30 dias de tratamento. Bozkurt et al. (2016) não encontraram diferenças significativas na relação H/L entre grupo de aves em muda e aves não sujeitas à muda, apresentando valores de 0,34 e 0,33, respectivamente, durante seis dias de tratamento. Os autores sugerem uma possível adaptação das aves ao estresse fisiológico causado pelo manejo. Portanto, ao analisar os valores da relação H/L de todos os estudos citados acima percebe-se uma grande variação, mesmo que, trate-se de um único agente estressor, a muda.

Para a variabilidade dos dados da relação H/L do presente estudo, além do erro padrão da média apresentado na tabela 1, os CV foram 21,10 (coleta 1), 37,47 (coleta 2), 32,08 (coleta 3), 30,77 (coleta 4), 29,00 (coleta 5) e 19,00 (coleta 6). Cotter (2015) apresentou CV entre 58 a 67 % para H/L e considerou a dispersão dos dados um fator limitante para o uso isolado da metodologia. Entretanto, os resultados do presente estudo não corroboram com a alta variabilidade encontrada por Cotter (2015). Isso demonstra maior homogeneidade dos valores calculados da relação H/L nesse estudo, e, portanto, representa uma eficácia da utilização isolada desse indicador de estresse quando aplicado em poedeiras comerciais estimuladas pela muda induzida.

Com relação as metodologias que avaliam o estresse oxidativo os gráficos 3, 4 e 5 indicam, respectivamente, o comportamento da enzima CAT, a concentração da GSH e o TBARS quando aplicado a análise de regressão polinomial, em poedeiras comerciais submetidas à jejum alimentar.

A avaliação da atividade da CAT apresentou comportamento linear na análise de regressão polinomial, sendo que com o avanço de dias de jejum alimentar a atividade enzimática diminuiu conforme observa-se no gráfico 3. O método é capaz de detectar o estresse, sendo considerado eficaz para o propósito, e para a muda induzida o momento de máximo estresse foi observado aos 10 dias de jejum alimentar. A prática da muda em poedeiras comerciais pode induzir ao estresse oxidativo por suprimir a capacidade antioxidante do organismo.

Gráfico 3 - Atividade da enzima catalase (CAT) (média) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da CAT a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média.



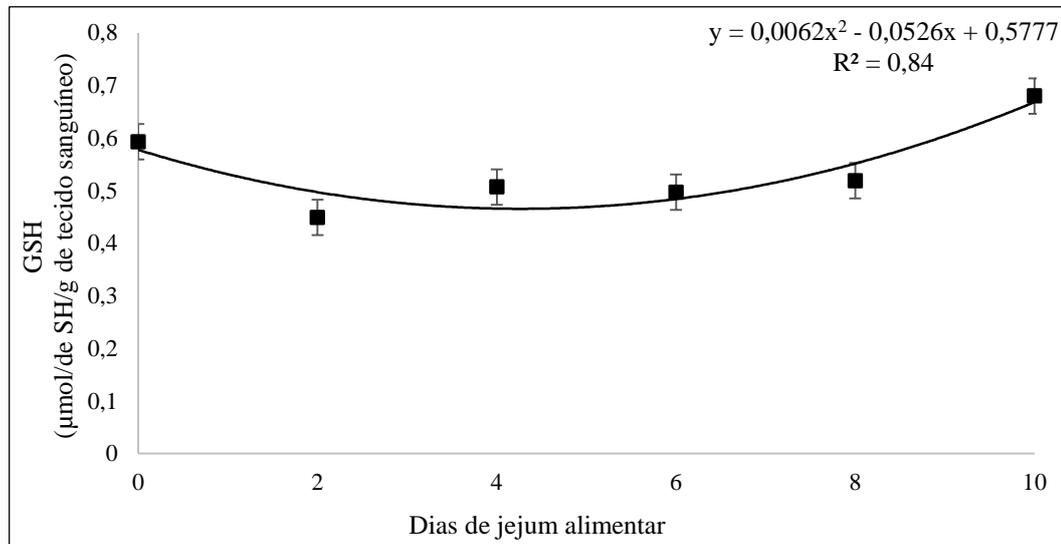
\*Catalase em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína/min

A CAT é considerada uma das substâncias celulares antioxidantes mais importantes do organismo atuando na conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$  para eliminar o efeito prejudicial do acúmulo das EROS (INCE et al., 2014), mantendo, assim, a homeostasia. Ela atua no sistema de defesa antioxidante enzimático em conjunto com a SOD e GSH-Px (WANG et al., 2016; YU et al., 2015). No entanto, quando o organismo está em estresse oxidativo, significa que há excesso de produção ou insuficiente eliminação das EROS, ocasionando desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes (CELI, 2010). O processo é semelhante a uma balança, com o maior peso representado pelas EROS e o menor peso pelas substâncias antioxidantes. Tal situação pode levar a perdas de função ou morte celular devido às ações destrutivas das EROS sobre os ácidos graxos poliinsaturados de membrana celular, DNA e proteínas (SURAI, 2000).

Relacionando a resposta da enzima CAT com o estresse oxidativo, trabalhos que envolvem a indução das aves ao estresse demonstram que há uma diminuição na atividade enzimática. Zheng et al. (2016) induziram frangos de corte a partir da administração de lipopolissacarídeos provenientes da *Escherichia coli* e observaram uma diminuição da atividade enzimática da CAT, além do aumento na concentração de MDA. Yu et al. (2015), também, ao induzir frangos de corte pela administração de ciclofosfamida, observaram uma diminuição na atividade enzimática da CAT, aumento na concentração de MDA e menor concentração de GSH. Vale ressaltar que ambos estudos apresentaram o objetivo de avaliar a resposta do organismo após incorporação de ingredientes com capacidade antioxidante na ração (YU et al., 2015; ZHENG, et al., 2016). Matur et al. (2011) ao fornecer ração contaminada com aflatoxina para matrizes observou uma diminuição da atividade da CAT, devido a atuação da enzima na decomposição do  $H_2O_2$ , na tentativa de reestabelecer o equilíbrio do organismo. Os resultados da CAT supracitados corroboram com o encontrado no presente trabalho, mesmo que a comparação seja realizada com diferentes formas de indução ao estresse. Ressalta-se que não existem trabalhos que utilizam a muda induzida como um agente estressor e que avaliam a resposta da enzima CAT.

A concentração de GSH apresentou comportamento quadrático na análise da regressão polinomial, conforme exposto no gráfico 4. Observa-se que as aves a partir do dia zero apresentaram um decréscimo contínuo na concentração de GSH até atingir o momento de máximo estresse, e isto ocorreu quando foi atingido a menor concentração de GSH, que se deu aos 4,3 dias de jejum alimentar. Posteriormente, a concentração de GSH aumentou gradativamente até o término da muda, o que pode ser atribuído ao fato das aves se adaptarem às condições ofertadas.

Gráfico 4 - Concentração de glutatona reduzida (GSH) (média) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da GSH a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média.



No estresse, há aumento na liberação de GSH do fígado e de outros tecidos para a corrente sanguínea para desintoxicação do organismo (SONG et al., 2000). Os mesmos autores demonstraram a partir da administração de um hormônio do estresse, a norepinefrina, que houve estimulação da transferência da glutatona produzida pelo fígado para a corrente sanguínea via sinusoidal e que, dessa forma, a glutatona circulante poderia ser absorvida por outros tecidos extra-hepáticos auxiliando na redução do estresse oxidativo (SONG et al., 2000). Assim, a partir do sistema *redox* da glutatona é possível realizar a dismutação do  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$  por ação da enzima GSH-Px (YU et al., 2015), a qual é obtida pela transformação da forma reduzida da glutatona para sua forma oxidada (HUBER e ALMEIDA, 2008).

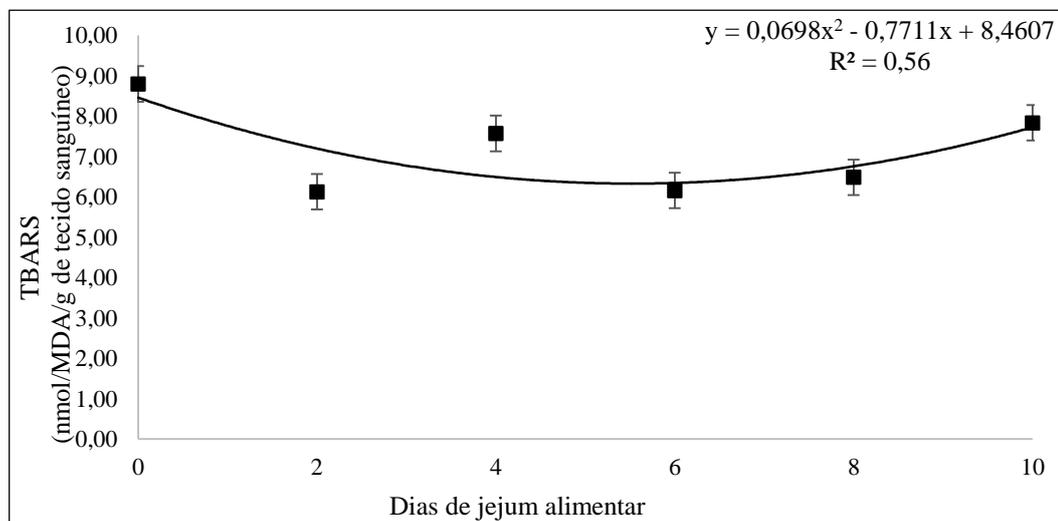
Porém, quando o sistema de defesa antioxidante se torna deficitário ou prevalece a produção das EROS, o estresse oxidativo se estabelece (SANI et al., 2015) e a concentração de GSH tende a diminuir (ZAREI e SHIVANANDAPPA, 2013). Isso pode ser observado até os 4,3 dias de jejum alimentar nas aves, em que a concentração de GSH se reduz de forma contínua, indicando que o organismo das aves não foi capaz de controlar o estresse gerado pela muda induzida até esse momento.

Diferentes estímulos estressores em aves demonstram que o organismo quando em estresse oxidativo reduz a concentração de GSH. Bao et al. (2011) submetem frangos de corte a condições de hipóxia extrema e observaram redução da concentração de GSH em amostras de fígados, indicando que as aves não superaram o estresse originado pela baixa concentração de  $O_2$ . Liu et al. (2014) ao expor frangos de corte ao calor constataram menor concentração de GSH, inibição da atividade enzimática da CAT, SOD e GSH-Px e maior valor de MDA em

comparação com frangos criados em ambiente com a temperatura controlada (LIU et al., 2014). O resultado do presente estudo mostra que a muda induzida é capaz de gerar um processo oxidativo em poedeiras comerciais submetidas ao protocolo de jejum alimentar e que a metodologia em questão é eficaz em estimar o *status* de estresse em aves.

O TBARS apresentou comportamento quadrático na análise de regressão polinomial, sendo que o momento de máximo estresse ocorreu aos 5,5 dias do período de jejum alimentar. As aves no dia zero de jejum alimentar apresentaram a maior quantidade de MDA e com o avanço da muda houve redução até a quantidade mínima determinada pela regressão (5,5 dias). Posteriormente, houve aumento do MDA até o final do tratamento. Os resultados do presente estudo demonstram-se diferentes do esperado, pois a literatura traz que aves em muda induzida apresentam níveis de MDA aumentados (BOZKURT et al., 2016). Bozkurt et al (2006) induziram aves à muda por alteração no regime alimentar e observaram aumento de MDA quando comparado com aves não submetidas à muda depois de 6 dias do processo.

Gráfico 5 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (médias) de poedeiras comerciais HyLine Brown submetidas à muda induzida por jejum alimentar durante 10 dias consecutivos. Os pontos de dados representam as médias da quantificação de malondialdeído (MDA) a cada dois dias de jejum alimentar com respectivo erro padrão da média.



A metodologia do TBARS avalia a peroxidação lipídica através da concentração de MDA e pode ser utilizada como um indicador de estresse oxidativo em aves (SQUIRES e WU, 1992). Os ácidos graxos poliinsaturados presentes na estrutura das membranas celulares podem ser alvo de destruição pelos radicais livres, provocando a lipoperoxidação (SUMIDA et al., 1989; ZHANG et al., 2011). O MDA é a principal substância que reage com o ácido tiobarbitúrico (YAGI, 1976; GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1990) formando um complexo colorido, realizado a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm

(BOZKURT et al., 2016).. O aumento na quantidade de MDA é diretamente proporcional ao aumento da peroxidação lipídica, os quais são diretamente proporcionais ao aumento do estresse oxidativo (YAGI, 1976; ECHEVERRY et al., 2016).

Ressalta-se que poucos estudos demonstram a resposta oxidativa das aves durante a muda induzida. Para o estresse do calor, aves foram expostas a 32°C durante 23 dias e a lipoperoxidação foi avaliada pela metodologia de TBARS (STAR et al., 2008). No período de adaptação das aves, o ambiente foi controlado a uma temperatura de 21°C e amostras de sangue foram coletadas nos seguintes momentos: cinco dias antes do início do estresse térmico e aos dois, oito, 15 e 22 dias durante o período estressor. Esses resultados foram demonstrados em gráfico observando-se que o grupo de aves em estresse térmico na primeira coleta (antes do início do estresse) apresentaram maiores valores de TBARS em relação aos demais momentos de coleta. O resultado obtido por Star et al. (2008) é interessante, pois no presente estudo as aves do tratamento controle, também apresentaram maiores valores de TBARS no início do tratamento em relação aos demais tempos de coleta. Contudo, Star et al (2008) não discutem esse resultado e não consideram que o TBARS diminui durante o período avaliado de 23 dias. A discussão é baseada na comparação dos resultados entre o tratamento das aves em estresse (32 °C) e as aves controle (21 °C), as quais obtiveram menores valores de TBARS e, portanto, consideraram que houve um aumento do estresse oxidativo das aves desafiadas pelo calor (STAR et al., 2008).

Para o estresse do frio, pintos foram submetidos ao estresse agudo pelo frio por um período de 24 horas, sendo o estresse oxidativo mensurado pela metodologia de TBARS durante o estresse a partir de amostras do duodeno (ZHANG et al., 2011). Houve aumento significativo de MDA em pintos termicamente desafiados em relação ao grupo de aves controle (25 °C), sendo que o aumento foi gradativo ao longo do período avaliado. O resultado indica que no duodeno os lipídios eram fortemente peroxidados, o que pode estar associado ao aumento de radicais livres ou a uma diminuição da capacidade antioxidante do organismo.

Os valores do coeficiente de Correlação de Pearson (r) das metodologias que avaliam estresse estão apresentados na tabela 2 de acordo com o momento de coleta durante a muda induzida (Anexo B).

Os resultados das metodologias que avaliaram as aves no dia zero de jejum alimentar não apresentaram correlação entre elas. O presente resultado indica que os métodos não podem ser substituídos um pelo outro, em uma situação em que as aves não se encontram sob a forma de estresse. Ademais, a tabela 2 indica que com o avançar dos dias de jejum alimentar algumas metodologias apresentaram alta correlação positiva, isto é, possibilidades de substituições de

indicadores que mensuram estresse em aves de acordo com determinados momentos de coleta. Isso pode ser observado nos seguintes resultados: a concentração de CORT apresentou alta correlação positiva com os métodos da relação H/L e concentração de GSH, no 8º dia de coleta de amostras. Em adição, observa-se, também, alta correlação para a CAT no 6º dia de coleta e para o TBARS no 2º dia de coleta. A relação H/L demonstrou ter alta correlação positiva para a concentração de GSH no 4º dia de coleta e para TBARS no 2º dia de coleta. Já a concentração de GSH obteve alta correlação positiva para TBARS no 8º dia de coleta. Ressalta-se que os resultados acima citados expressam quando que um método pode substituir a outro, de acordo com o dia de jejum alimentar, para determinar o nível de estresse das aves durante a muda induzida. Entretanto, de forma integral do período da muda, isto é, considerando os 10 dias de jejum alimentar, nenhum indicador pode ser totalmente substituído por outro método incluído nesse estudo, perante os valores dos coeficientes de correlação de Pearson que apresentaram-se inconsistentes.

Poedeiras foram restritas ao acesso aos ninhos durante cinco dias consecutivos e múltiplos indicadores de estresse foram avaliados no estudo de Alm et al. (2016). A correlação de Pearson foi realizada com mensurações obtidas antes, durante e depois do estímulo estressor e observaram que de uma forma geral os valores de  $r$  apresentaram-se baixos e inconsistentes, exaltando a complexidade da relação entre os parâmetros de estresse. Para a relação H/L e a concentração plasmática de CORT, Star et al. (2016) apresentaram um valor de  $r = -0,21$  ( $P = 0,153$ ), não existindo relação entre ambas metodologias. A correlação positiva e consistente foi observada entre a metodologia de metabólitos de CORT fecal nas excretas e as irregularidades de casca, sendo que os autores suportam a ideia de utilizar as irregularidades de casca como indicador de bem-estar animal.

## 5 CONCLUSÃO

As metodologias da concentração de CORT plasmática, relação H/L, concentração de GSH e atividade da enzima CAT são indicadas para mensurar estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida por jejum alimentar.

O momento de máximo estresse é diferente para cada um dos indicadores incluídos. A concentração de CORT plasmática apresenta o momento de máximo estresse aos 4,3 dias de jejum alimentar. A relação H/L apresenta o momento de máximo estresse aos 10 dias de jejum alimentar, a concentração de GSH aos 4,3 dias e a atividade da enzima CAT aos 10 dias. A metodologia dos níveis de TBARS não demonstrou eficiência para mensurar o estresse de poedeiras estimuladas pela muda induzida, apresentando a maior quantidade de MDA no dia zero de jejum alimentar e a menor aos 5,5 dias.

Não existe uma alta correlação positiva entre os indicadores de estresse incluídos (concentração de CORT plasmática, relação H/L, concentração de GSH, atividade da enzima CAT e níveis de TBARS) para todos os momentos de coleta durante a muda induzida. Os baixos e inconsistentes coeficientes de correlação de Pearson impossibilitam a utilização de apenas um método em substituição aos demais para mensurar o estresse de poedeiras durante a muda induzida por jejum alimentar.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, J. L. Progesterone-induced unseasonable molt in Single Comb White Leghorn pullets. **Poultry Science**, v.34, p.702-707, 1955.

ALM, M.; TAUSON, R.; HOLM, L.; WICHMAN, A.; KALLIOKOSKI, O.; WALL, H. Welfare indicators in laying hens in relation to nest exclusion. **Poultry Science**, v.95, p.1238-1247, 2016.

ALODAN, M. A. and MASHALY, M. M. Effect of induced molting in laying hens on production and immune parameters. **Poultry Science**, v.78, p.171-177, 1999.

ANDERSON, M. E.; BRIDGES, J.; MEISTER, A. Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.96, p.848-53, 1980.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. Robe Editorial: São Paulo. 2. ed. 2003.

BAKER, M.; BRAKE, J.; McDANIEL, G. R. The relationship between body weight loss during an induced molt and postmolt egg production, egg weight, and shell quality in caged layers. **Poultry Science**, v.62, p.409-413, 1983.

BAO, H. G.; WANG, X. Y.; LI, J. Y.; WU, C. X. Comparison of effects of hypoxia on glutathione and activities of related enzymes in livers of Tibet chicken and Silky chicken. **Poultry Science**, v.90, p.648-652, 2011.

BERRY, W. D.; GILDERSLEEVE, R. P.; BRAKE, J. Characterization of different hematological responses during molts induced by zinc or fasting. **Poultry Science**, v.66, p.1841-1845, 1987.

BERRY, W. D. The physiology of induced molting. **Poultry Science**, v.82, p.971-980, 2003.

BEUVING, G and VONDER, G. M. A. Daily rhythm of corticosterone in laying hens and the influence of egg laying. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.51, p.169-173, 1977.

BEUVING, G and VONDER, G. M. A. Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. **General and Comparative Endocrinology**, v.35, p.153-159, 1978.

BISHOP, C. R.; ATHENS, J. W.; BOGGS, D. R.; WARNER, H. R.; CARTWRIGHT, G. E.; WINTROBE, M. M. XIII. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of corticosterone-induced granulocytosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.47, p.249-260, 1968.

BLOKHUIS, H. J.; FIKS VAN NIEKERK, T., BESSEI, W.; ELSON, A.; GUÉMENÉ, D.; KJAER, J. B.; MARIA LEVRINO, G. A.; NICOL, C. J.; TAUSON, R.; WEEKS, C. A; VAN DE WEERD, H. A. The LayWel project: welfare implications of changes in production systems for laying hens. **World's Poultry Science Journal**, v.63, p.101-114, 2007.

BOVERIS, A. and CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochemistry Journal**, v.134, p.707-716, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAKE, J. and THAXTON, P. Physiological changes in caged layers during a forced molt. 1. Body temperature and selected blood constituents<sup>1,2,3,4</sup>. **Poultry Science**, v.58, p.699-706, 1979a.

BRAKE, J. and THAXTON, P. Physiological changes in caged layers during a forced molt. 2. Gross changes in organs<sup>1,2,3,4</sup>. **Poultry Science**, v.58, p.707-716, 1979b.

BRAKE, J.; BAKER, M.; MORGAN, G. W.; THAXTON, P. Physiological changes in caged layers during a forced molt. **Poultry Science**, v.61, p.790-795, 1982.

BRAKE, J.; GARLICH, J. D.; CARTER, T. A. Relationship of dietary calcium level during the prelay phase of an induced molt to postmolt performance. **Poultry Science**, v.63, p.2497-2500, 1984.

BRAKE, J.; MORGAN, G. W.; THAXTON, P. Recrudescence of the thymus and repopulation of lymphocytes during an artificially induced molt in the domestic chicken: proposed model system. **Developmental and Comparative Immunology**, v.5, p.105-112, 1981.

BRAKE, J.; THAXTON, P.; BENTON, E. H. Physiological changes in caged layers during a forced molt. 3. Plasma thyroxine, plasma triiodothyronine, adrenal cholesterol, and total adrenal steroids<sup>1,2,3,4</sup>. **Poultry Science**, v.58, p.1345-1350, 1979.

BREEDING, S. W.; BERRY, W. D.; BRAKE, J. Research note: maintenance of duodenum weight during a molt induced by dietary zinc in a low-calcium diet. **Poultry Science**, v.71, p.1408-1411, 1992.

BOZKURT, M.; BINTAS, E.; KIRKAN, S.; AKSIT, H.; KUÇUKYILMAZ, K.; ERBAZ, G.; ÇABUK, M.; AKSIT, D.; PARM, U.; EGE, G.; KOÇER, G.; SEYREK, K.; TUZUN, E. A. Comparative evaluation of dietary supplementation with mannan oligosaccharide and oregano essential oil in forced molted and fully fed laying hens between 82 and 106 weeks of age. **Poultry Science**, v.0, p.1-16, 2016.

BUEGE, J. A. and AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

CELI, P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.348-363, 2010.

CHRISTMAS, R. B.; HARMS, R. H.; JUNQUEIRA, O. M. Performances of single comb White Leghorn hens subjected to 4- or 10-day feed withdrawal force rest procedures. **Poultry Science**, v.64, p.2321-2324, 1985.

CLAMAN, H. N. How corticosteroids work. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.55, p.145-151, 1975.

COMPORTI, M.; SIGNORINI, C.; BUONOCORE, G.; CICCOLI, L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Radical Biology and Medicine**, v.7, p.568-76, 2002.

COOPER, G. M. e HAUSMAN, R. E. **A célula: uma abordagem molecular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 736p.

COTTER, P. F. An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. **Poultry Science**, v.94, p.512-517, 2015.

DAVIS, A. K. Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. **Journal of Field Ornithology**, v.76, p.334-338, 2005.

DAVIS, A. K. MANEY, D. L.; MAERZ J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v.22, p.760-772, 2008.

DAVIS, G. S.; ANDERSON, K. E.; CARROLL, A.S. The effects of long-term caging and molt of single comb White Leghorn hens on heterophil to lymphocyte ratios, corticosterone and thyroid hormones. **Poultry Science**, v.79, p.514-518, 2000.

DECUYPERE, E. and VERHEYEN, G. Physiological basis of induced moulting and tissue regeneration in fowls. **World's Poultry Science Journal**, v.42, p.56-68, 1986.

DHABHAR, F. S. A hassle a day may keep the doctor away: stress and the augmentation of immune function. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.556-564, 2002.

DHABHAR, F. S. A hassle a day may keep the pathogens away: the fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. **Integrative and Comparative Biology**, v.49, p. 215-236, 2009.

DHABHAR, F. S. and McEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, Behavior and Immunity Journal**, v.11, p.286-306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; STEIN, M.; McEWEN B. S.; SPENCER, R. L. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain, Behavior, and Immunity Journal**, v.8, p.66-79, 1994.

DICKERMAN, R. W. and BAHR, J. M. Molt induced by gonadotropin-releasing hormone agonist as a model for a studying endocrine mechanisms of molting in laying hens. **Poultry Science**, v.68, p.1402-1408, 1989.

ECHEVERRY, H.; YITBAREK, A.; MUNYAKA, P.; ALIZADEH, M.; CLEAVER, A.; CAMELO-JAIMES, G.; WANG, P.; O, K.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C. Organic trace mineral supplementation enhances local and systemic innate immune responses and modulates oxidative stress in broiler chickens. **Poultry Science**, v.0, p.1-10, 2016.

EILER, H. Glândulas endócrinas. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 37.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p.70-77, 1959.

- ETCHES, R. J.; WILLIAMS, J. B.; RZASA, J. Effects of corticosterone and dietary changes in the hen on ovarian function, plasma LH and steroids and the response to exogenous LH-RH. **Journals of Reproduction and Fertility**, v.70, p.121-130, 1984.
- FANG, Y. Z., YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v.18, p.872-879, 2002.
- FREEMAN, B. M.; MANNING, A. C. C.; FLACK, I. H. Adrenal cortical activity in the domestic fowl, *Gallus domesticus*, following withdrawal of water or food. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.74A, p.639-641, 1983.
- GILDERSLEEVE, R. P.; SATTERLEE, D. G.; JOHNSON, W. A.; SCOTT, T. R. The effects of forced molt treatment on selected steroids in hens. **Poultry Science**, v.61, p.2362-2369, 1982.
- GONGRUTTANANUN, N.; GUNTAPA, P.; SAENGGUDRUA, K. The effects of a short-term molt method using cassava meal, broken rice, or corn on ovarian regression, bone integrity, and postmolt egg production and quality in older (95 week) laying hens. **Poultry Science**, v.92, p.2798-2807, 2013.
- GOULD, N. R. and SIEGEL, H. S. Effect of age and sex on the association constant and binding capacity of chicken serum for corticosteroid. **Poultry Science**, v.57, p.778-784, 1978.
- GUTTERIDGE, J. M. C. and HALLIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v.15, p.129-135, 1990.
- GROSS, W. B. and SIEGEL, H. S. Evaluation of heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Disease**, v.27, p.972-979, 1983.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B.; DUBOSE, R. T. Some effects of feeding corticosterone to chickens, **Poultry Science**, v.59, p.516-522, 1980.
- HALLIWELL, B. and CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v.102 (Suppl. 10), p.5-12, 1994.
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Internacional Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.31, p.1454-1468, 1999.

HOSHINO, S.; SUZUKI, M.; KAKEGAWA, T.; IMAI, K.; WAKITA, M.; KOBAYASHI, Y.; YAMADA, Y. Changes in plasma thyroid hormones, luteinizing hormone (LH), estradiol, progesterone and corticosterone of laying hens during a forced molt. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.90A, p.355-359, 1988.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, De A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

INCE, S.; KUCUKKURT I.; DEMIREL H. H.; ACARUZ D. A.; AKBEL E.; CIGERCI I. H. Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. **Chemosphere**, v.108, p.197-204, 2014.

KOELKEBECK, K. W. and ANDERSON, K. E. Molting layers - Alternative methods and their effectiveness. **Poultry Science**, v.86, p.1260-1264, 2007.

KOGUT, M. H.; GENOVESE, K. J.; STANKER, L. H. Effect of induced molt on heterophil function in White Leghorn hens. **Avian Diseases**, v.43, p.538-548, 1999.

LEE, K. Effects of forced molt period on postmolt performance of Leghorn hens. **Poultry Science**, v.61, p.1594-1595, 1982.

LENTFER, T. L.; PENDL, H.; GEBHARDT-HENRICH, S. G.; FROHLICH, E. K. F.; VON BORELL, E. H/L ratio as a measurement of stress in laying hens – methodology and reliability. **British Poultry Science**, v.56, p.157-163, 2015.

LIU, L. L.; HE, J. H.; XIE, H. B.; YANG, Y. S.; LI, J. C.; ZOU, Y. Resveratrol induces antioxidant and heat shock protein mRNA expression in response to heat stress in black-boned chickens. **Poultry Science**, v.93, p.54-62, 2014.

LUCAS, M. A. and JAMROZ, C. **Atlas of Avian Hematology**. Monograph 25. Washington: United States Department of Agriculture, 1961. Disponível em:  
<<http://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/6392#/summary>>

MATUR, E.; ERGUL, E.; AKYAZI, I.; ERASLAN, E., INAL, G.; BILGIC, S.; DEMIRCAN, H. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* extract on hematological parameters, immune function and the antioxidant defense system in breeder hens fed aflatoxin contaminated diets. **British Poultry Science**, v.52, p.541-550, 2011.

MAXWELL, M. H. Avian blood leucocyte responses to stress. **World's Poultry Science Journal**, v.49, p.34-43, 1993.

MAXWELL, M. H.; ROBERTSON, G. W.; ANDERSON, A.; DICK, L. A.; LYNCH, M. Haematology and histopathology of seven-week-old broilers after early food restriction. **Research in Veterinary Science**, v.50, p.290-297, 1991.

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, v.220, p.472-477, 1983.

MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C. G.; RICHARD, S.; VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, v.92, p.317-339, 2007.

MUMMA, J. O.; THAXTON, J. P.; VIZZIER-THAXTON, Y.; DODSON, W. L. Physiological stress in laying hens. **Poultry Science**, v.85, p.761-769, 2006.

NELSON, D. L. e COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298p.

NOLES, R. K. Subsequent production and egg quality of forced molted hens. **Poultry Science**, v.45, p.50-57, 1966.

PANDA, A. K. and CHERIAN, G. Role of vitamin E in counteracting oxidative stress in Poultry. **Japan Poultry Science Association**, v.51, p.109-117, 2014.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p.1603-1616, 2010.

ROMERO, L. M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends in Ecology and Evolution**, v.19, p.249-255, 2004.

ROSS, E. and HERRICK, R. B. Forced rest induced by molt or low-salt diet and subsequent hen performance. **Poultry Science**, v.60, p.63-67, 1981.

ROOS, R. In vitro production of corticosterone by chicken adrenals. **Endocrinology**, v.67, p.719-721, 1960.

SAHIN, R. and KUCUK, O. A simple way to reduce heat stress in laying hens as judged by egg laying, body weight gain and biochemical parameters. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.49, p.421-430, 2001.

SANI, M.; SEBAI, H.; GHANEM-BOUGHANMI, N.; BOUGHATTAS, N. A.; BEN-ATTIA, M. Circadian (about 24-hour) variation in malondialdehyde content and catalase activity of mouse erythrocytes. **Redox Report**, v.20, p.26-33, 2015.

SCANES, C. G. Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio. **Poultry Science**, v.0, p.1-8, 2016.

SELYE, H. The physiology and pathology of exposure to stress. **Acta Inc.**, Montreal, 1950.

SHAPIRO, A. B. and SCHECHTMAN, A. M. Effect of adrenal cortical extract on the blood picture and serum proteins of fowl. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v.70, p.440-445, 1949.

SIEGEL, H. S. Adrenals, stress and the environment. **World's Poultry Science Journal**, v.27, p.327-349, 1971.

SIEGEL, H. S. Blood cells and chemistry of young chickens during daily ACTH and cortisol administration. **Poultry Science**, v.47, p.1811-1817, 1968.

SIEGEL, H. S. Physiological stress in birds. **Bioscience**, v.30, p.529-534, 1980.

SONG, Z.; CAWTHON, D.; BEERS, K.; BOTTJE, G. Hepatic and extra-hepatic stimulation of glutathione release into plasma by norepinephrine in vivo. **Poultry Science**, v.79, p.1632-1639, 2000.

SQUIRES, E. J. and WU, J. Enhanced induction of hepatic lipid peroxidation by ferric nitrilotriacetate in chickens susceptible to fatty liver rupture, **British Poultry Science**, v.33, p.329-337, 1992.

STAR, L.; DECUYPERE, E.; PARMENTIER, H. K.; KEMP, B. Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 2. Endocrine and oxidative stress responses. **Poultry Science**, v.87, p.1031-1038, 2008.

STOCKHAM, S. L and SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUMIDA, S.; TANAKA, K.; KITAO, H.; NAKADOMO, F. Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin e supplementation. **International Journal of Biochemistry**, v.21, p.835-838, 1989.

SURAI, P. F. Effect of selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. **British Poultry Science**, v.41, p.235-243, 2000.

THOMPSON, E. B. and LIPPMAN, M. E. Mechanism of action of glucocorticoids. **Metabolism**, v.23, p.159-202, 1974.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews Drug Discovery**, v.8, p.579-591, 2009.

VOET, D.; VIET, J. G.; ORATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1168p.

WAKENELL, P. S. WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Shalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. USA: Wiley-Blackwell, 2010.

WANG, Y.; JIANG, L.; YUANFENG, L.; XUEGANG, L.; HE, J. Effect of different selenium supplementation levels on oxidative stress, cytokines, and immunotoxicity in chicken thymys. **Biological Trace Element Research**, v.172, p.488-495, 2016.

WEBSTER, A. B. Physiology and behavior of the hen during induced molt. **Poultry Science**, v.82, p.992-1002, 2003.

XIE, J.; TANG, L.; LU, L.; ZHANG, L.; LIN, X.; LIU, H.; ODLE, J.; LUO, X. Effects of acute and chronic heat stress on plasma metabolites, hormones and oxidant status in restrictedly fed broiler breeders. **Poultry Science**, v.94, p.1635-1644, 2015.

YAGI, K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. **Biochemical Medicine**, v.15, p.212-216, 1976.

YU, J.; CHEN, Y.; ZHAI, L.; ZHANG, L.; XU, Y.; WANG, S.; HU, S. Antioxidative effect of ginseng stem-leaf saponins on oxidative stress induced by cyclophosphamide in chickens. **Poultry Science**, v.94, p.927-933, 2015.

ZAREI, M. and SHIVANANDAPPA, T. Amelioration of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by the root extract of *Decalepis hamiltonii* in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.57, p.179-184, 2013.

ZHANG, Z. W.; LV, Z. H.; LI, J. L.; LI, S.; XU, S. W.; WANG, X. L. Effects of cold stress on nitric oxide in duodenum of chicks. **Poultry Science**, v.90, p.1555-1561, 2011.

ZHENG, X. C.; WU, Q. J.; SONG, Z. H.; ZHANG, H.; ZHANG, J. F.; ZHANG, L. L.; ZHANG, T. Y.; WANG, C.; WANG, T. Effects of oridonin on growth performance and oxidative stress in broilers challenged with lipopolysaccharide. **Poultry Science**, v.0, p.1-9, 2016.

ZIMMERMANN, N. G. e ANDREWS, D. K. Performance of Leghorn hens induced to molt by limited feeding of diets varying in nutrient density. **Poultry Science**, v.69, p.1883-1891, 1990.

ZULKIFLI, I. Heterophil/lymphocyte response and performance of feed and water restricted broiler chickens under tropical conditions. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.12, p.951-955, 1999.

## ANEXO A - Resultado das avaliações das diferentes metodologias que indicam estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida

Tabela 1 - Resultado das avaliações das diferentes metodologias que indicam estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida

Metodologias	Dias de Coleta					
	0	2	4	6	8	10
CORT <sup>a</sup>	1,757 (0,229) <sup>1</sup>	2,300 (0,398)	3,686 (0,345)	2,057 (0,190)	1,714 (0,260)	1,586 (0,245)
H/L <sup>b</sup>	1,153 (0,092)	1,641 (0,232)	1,383 (0,168)	1,738 (0,189)	1,977 (0,202)	2,003 (0,135)
CAT <sup>c</sup>	2,7008x10 <sup>-6</sup> (4,3325x10 <sup>-7</sup> )	2,1512x10 <sup>-6</sup> (4,9373x10 <sup>-7</sup> )	2,6138x10 <sup>-6</sup> (3,4071x10 <sup>-7</sup> )	1,2799x10 <sup>-6</sup> (1,999x10 <sup>-7</sup> )	1,2698x10 <sup>-6</sup> (1,079x10 <sup>-7</sup> )	2,1167x10 <sup>-6</sup> (3,0676x10 <sup>-7</sup> )
GSH <sup>d</sup>	0,593 (0,094)	0,449 (0,051)	0,507 (0,053)	0,497 (0,057)	0,519 (0,045)	0,680 (0,089)
TBARS <sup>e</sup>	8,797 (0,772)	6,128 (0,667)	7,573 (0,445)	6,158 (0,317)	6,486 (0,521)	7,836 (0,650)

<sup>a</sup>CORT= concentração de corticosterona (ng/ml)

<sup>b</sup>H/L= relação heterófilo/linfócito

<sup>c</sup>CAT= catalase (μmol/mg de proteína/min)

<sup>d</sup>GSH= glutationa reduzida (μmol/de SH/g de tecido sanguíneo)

<sup>e</sup>TBARS= níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/MDA/g de tecido sanguíneo)

<sup>1</sup>= erro padrão da média (EPM)

## ANEXO B - Coeficientes de Correlação de Pearson (r) de metodologias que avaliam o estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida (Continua)

Tabela 2 - Coeficientes de Correlação de Pearson (r) de metodologias que avaliam o estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida (Continua)

Metodologias		Dias de Coleta					
		0	2	4	6	8	10
CORT <sup>a</sup>	H/L	0,0091 <sup>1</sup> (0,986) <sup>2</sup>	0,5006 (0,390)	0,1598 (0,762)	0,0210 (0,969)	0,7157 (0,110)	-0,3935 (0,382)
	CAT	0,0352 (0,947)	-0,3101 (0,690)	-0,0422 (0,937)	0,6720 (0,143)	-0,1052 (0,822)	-0,4230 (0,344)
	GSH	-0,7866 (0,115)	-0,2383 (0,700)	-0,0002 (0,999)	0,1019 (0,848)	0,7000 (0,121)	-0,2777 (0,594)
	TBARS <sup>e</sup>	-0,3282 (0,590)	0,8354 (0,078)	0,1070 (0,840)	-0,5293 (0,280)	0,5554 (0,331)	0,3743 (0,465)
H/L <sup>b</sup>	CAT	-0,6956 (0,125)	-0,1381 (0,862)	-0,7412 (0,057)	0,0143 (0,978)	0,1259 (0,788)	-0,2636 (0,568)
	GSH	-0,5595 (0,327)	-0,8245 (0,043)	0,7349 (0,060)	-0,5162 (0,294)	0,2116 (0,687)	0,3801 (0,400)
	TBARS	-0,6587 (0,155)	0,6355 (0,249)	0,0121 (0,982)	-0,6048 (0,203)	0,2585 (0,621)	-0,4705 (0,287)
CAT <sup>c</sup>	GSH	0,2803 (0,648)	0,0270 (0,966)	-0,4003 (0,373)	-0,0712 (0,909)	-0,1221 (0,794)	0,2659 (0,610)
	TBARS	0,1173 (0,825)	-0,0058 (0,991)	-0,8521 (0,031)	-0,2676 (0,663)	-0,2561 (0,624)	-0,5454 (0,263)

## ANEXO B - Coeficientes de Correlação de Pearson (r) de metodologias que avaliam o estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida (Conclusão)

Tabela 2 - Coeficientes de Correlação de Pearson (r) de metodologias que avaliam o estresse em poedeiras comerciais submetidas à muda induzida (Conclusão)

Metodologias		Dias de Coleta					
		0	2	4	6	8	10
GSH <sup>d</sup>	TBARS	0,5570 (0,443)	-0,7718 (0,072)	-0,2376 (0,608)	0,3509 (0,440)	0,9871 (0,002)	-0,5044 (0,307)

<sup>a</sup>CORT= concentração de corticosterona (ng/ml)

<sup>b</sup>H/L= relação heterófilo/linfócito

<sup>c</sup>CAT= catalase ( $\mu\text{mol/mg}$  de proteína/min)

<sup>d</sup>GSH= glutationa reduzida ( $\mu\text{mol/de SH/g}$  de tecido sanguíneo)

<sup>e</sup>TBARS= níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/MDA/g de tecido sanguíneo)

<sup>1</sup>= coeficiente de Correlação de Pearson (r)

<sup>2</sup>= valor de P.

