

Escola Superior São Francisco de Assis
Curso de Graduação em Medicina Veterinária

Crysthofer Saager Salomão

Kaiara Aparecida Stelser

Vinícius Vilwock de Almeida

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE
POEDEIRAS CRIADAS NOS SISTEMAS CONVENCIONAL E CAGE
*FREE***

Santa Teresa

2022

Crysthofer Saager Salomão

Kaiara Aparecida Stelser

Vinícius Vilwock de Almeida

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE
POEDEIRAS CRIADAS NOS SISTEMAS CONVENCIONAL E *CAGE*
*FREE***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do curso de Medicina Veterinária da Escola Superior São Francisco de Assis, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. MSc. Nélio Cunha Gonçalves

Santa Teresa

2022

Crysthofer Saager Salomão

Kaiara Aparecida Stelser

Vinícius Vilwoc de Almeida

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE
POEDEIRAS CRIADAS NOS SISTEMAS CONVENCIONAL E CAGE
*FREE***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Medicina Veterinária da Escola Superior São Francisco de Assis como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovada em ___ de _____ de 2022.

BANCA EXAMINADORA

MSc. Nélío Cunha Gonçalves

Doutorando pelo Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Dr^a. Juliana Guimarães Laguna

Pesquisadora do Departamento de Genética da Universidade Federal de Minas Gerais

Esp. Áurea Krause

Médica Veterinária MSD Saúde Animal

EPÍGRAFE

“Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu.” Eclesiastes 3: 1.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos em primeiro lugar a Deus, nosso amigo e companheiro, por nos dar saúde, direção e iluminar o caminho ao longo de todo período de graduação, capaz de concretizar muito mais do que podemos imaginar.

Com muito carinho, agradecemos aos nossos familiares, por nos dar condições de concretizar este sonho.

Ao orientador Prof. MSc. Nélio Cunha Gonçalves, nosso singelo agradecimento pela enorme contribuição na idealização, execução e compilação dos dados da pesquisa, além paciência e incentivo durante todo período de graduação.

A todos os nossos professores, pela inspiração, auxílio e contribuição em tornar-nos melhores a cada dia.

À Médica Veterinária MSc. Valéria Sampaio Costa Salomão, do Instituto de Defesa Sanitária e Florestal do Estado do Espírito Santo (IDAF), por auxiliar no trâmite do transporte das aves e execução das necrópsias.

À Granja Salomão e Granja Saager pela contribuição na fase de campo da pesquisa e a disponibilidade das aves para o estudo.

À família Stange, proprietária do abatedouro frigorífico “Saudáveis” pela contribuição na fase de obtenção das amostras.

Ao Prof. Gabriel Taufner, pelas orientações na escrita do trabalho e contribuição da fase de transporte das amostras de tecido hepático até a UFMG.

Ao Prof Dr. Vasco Vasco Ariston de Azevedo, ao doutorando MSc. Tales Fernando Silva e à pesquisadora Dr. Juliana Guimarães Laguna, pela contribuição nas análises de expressão gênica.

Ao Prof. Dr. Guilherme Rocha, por contribuir com a realização das análises estatísticas.

Ao Enio Ferreira, pela contribuição na obtenção, interpretação e avaliação das lâminas histopatológicas.

Aos nossos colegas de turma, por estarem presentes nos momentos vividos durante a graduação.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na elaboração desta pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Instalação utilizada nas etapas de cria e recria.....	24
Figura 2 - Aves alojadas no galpão no sistema de criação convencional, tipo californiano.....	25
Figura 3 - Fluxograma utilizado nas etapas de seleção, transporte e abate das aves.....	26
Figura 4 - Fotos tiradas no período de obtenção do tecido hepático.....	27
Figura 5 - Expressão relativa do gene HSP70 nos dois sistemas de criação.....	35
Figura 6 - Cavidade celomática e lâmina histopatológica obtida das aves criadas no sistema convencional.....	37
Figura 7 - Cavidade celomática e lâmina histopatológica obtida das aves criadas no sistema cage free.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição (kg/ton) e níveis nutricionais da dieta	23
Tabela 2 - Concentração de RNA (ng/ μ L) e razão entre as absorvâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm.	30
Tabela 3 - Gene, número de acesso no GenBank, direção e sequência dos primers na espécie aviária (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	32
Tabela 4 - Cálculo das fontes de variação e graus de liberdade.	34
Tabela 5 - Médias e desvios padrão para abundância relativa de mRNA (Δ CT, log ₂) obtidas nos tratamentos	34
Tabela 6 -: Escore de acometimento do tecido hepático.	35
Tabela 7 - Comparação das medianas dos valores de escore hepático obtidas nos tratamentos	36
Tabela 8 - Estatística descritiva para avaliação do peso ao abate, sem penas e sem inglúvio	41
Tabela 9 - Estatística descritiva da produção em comparativo nos referidos sistemas de criação em estudo.	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação da produtividade entre os dois tratamentos da pesquisa. ..42

Gráfico 2 - Comparação da viabilidade entre os dois tratamentos da pesquisa.....42

LISTA DE SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ACTB	β -actina
CEAP	Centro de Assessoria e Pesquisa e Mercado
Cepea	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EMA	Energia Metabolizável Aparente
EPS	Poliestireno expandido
EUA	Estados Unidos da América
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutathione Peroxidase
GTA	Guia de trânsito animal
HE	Hematoxilina-eosina
HSP70	<i>Heat shock protein 70</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDAF	Instituto de Defesa Agropecuário e Florestal do estado do Espírito Santo.
LGCM	Laboratório de Genética Celular e Molecular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ONG	Organizações não governamentais
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PIB	Produto Interno Bruto
RNA	Ácido ribonucleico
RT-Ppccr	Reverse Transcriptase Quantitative PCR
SFGH	Síndrome do Fígado Gorduroso e Hemorrágico
SOD	Superóxido Dismutase
EU	União europeia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRPE	Departamento de Estatística e Informática da Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. ARTIGO CIENTÍFICO	20
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	22
Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	22
Local.....	22
Animais e Dieta.....	23
Desenho Experimental	24
Instalações.....	24
Seleção das aves e obtenção das amostras	26
Genes selecionados para análise de expressão diferencial em tecido hepático	28
Extração e purificação do RNA das amostras de tecido hepático.....	28
Análise da concentração, pureza e integridade do RNA extraído	30
Determinação da expressão gênica diferencial em tecido hepático	31
Preparo e avaliação das lâminas hepáticas.....	33
Delineamento experimental e testes estatísticos.....	33
RESULTADOS	34
Expressão hepática do HSP70	34
Escore de acometimento do tecido hepático	35
Avaliação macroscópicas e microscópicas do tecido hepático.....	37
Peso das aves post mortem	41

Dados zootécnicos relativos à produção e viabilidade	41
DISCUSSÃO	43
Expressão hepática do gene HSP70	43
Avaliação macroscópicas e microscópicas do tecido hepático	44
Peso das aves ao abate.....	45
Dados zootécnicos relativos produção e viabilidade	46
CONCLUSÃO.....	47
5. REFERÊNCIAS.....	48
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
7. APÊNDICES	53
8. ANEXOS	54

1. INTRODUÇÃO

Dados do quarto trimestre do ano de 2021, publicados pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), indicam que o Produto Interno Bruto (PIB) agropecuário representa 27% do total no Brasil. Neste contexto está a avicultura, a qual possui destaque mundial em produção de carne e ovos.

O bem-estar animal é consideravelmente comprometido no sistema de criação convencional de poedeiras (OLIVEIRA et al., 2014). Com o confinamento das aves em gaiolas, sua capacidade de expressar seus comportamentos naturais é reduzida, o que compromete, não apenas o conforto destes animais, mas também a produtividade (RODRIGUES, 2016).

Dados os impactos do sistema de criação sobre o bem-estar animal, metodologias diversas são estudadas a fim de se quantificar este último parâmetro de forma acurada. Avaliações podem incluir desde a observação de alterações comportamentais, até métodos de monitoramento de alterações em nível celular e molecular, como, por exemplo, variações na expressão hepática de genes que codificam enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e análise histopatológica do tecido hepático.

O presente estudo objetivou comparar os efeitos do sistema de criação de aves de postura, convencional e cage free, sobre a expressão hepática do gene codificador da proteína HSP70, relacionada ao estresse oxidativo; sobre aspectos relacionados à integridade macro e microscópica do fígado; e sobre dados zootécnicos de peso ao abate, taxa de postura e viabilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O bem-estar na criação animal tem se tornado pré-requisito para o consumidor, o qual está atento ao modelo de criação e sustentabilidade garantidos pela cadeia produtora de proteína animal. Com isso, mudanças tem ocorrido em função de fornecer ao animal o ambiente adequado para a produção e, dessa forma, atender as exigências do consumidor final (AZEVEDO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2014). Neste cenário de produção estão presentes o setor de avicultura de corte e postura.

Dados publicados no relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2022), revelam que em 2021 foram produzidos 55 bilhões de unidades de ovos, valor 42,6% superior à produção de 10 anos atrás. O setor da carne de frango, seguida por anos crescentes, registrou produção de 14.329 milhões de toneladas de carne. O consumo destes produtos pela população brasileira também registrou aumento: foram 257 ovos e 45,56 Kg de carne de frango per capita em 2021.

A ABPA em parceria com o Centro de Assessoria e Pesquisa e Mercado (CEAP), identificou que, em 2021, 98,5% da população brasileira consumia algum tipo de proteína animal, com destaque para o ovo, consumido por 96% dos entrevistados, e para a carne de frango, consumida por 94% deles (ABPA, 2021). Segundo a ABPA, houve aumento do consumo per capita de ovos no país em 2021, elevação está relacionada, principalmente, à pandemia de COVID-19. Nesse novo contexto socioeconômico, com elevados preços de outras fontes de proteína animal mais tradicionais, como a carne bovina e suína, o consumo de ovos se mostrou a alternativa mais viável para muitos. A divulgação do excelente valor nutricional dos ovos também tem colaborado com o aumento do consumo e produção destes.

O ovo é um alimento nutritivo, barato e de fácil obtenção pelos consumidores, comercializado em casca ou industrializado, com diversas aplicações na alimentação. Além disso, seu alto valor nutricional pode contribuir para a promoção e melhora da saúde humana (HENRIQUES; RODRIGUES; UCZAY, 2018). Classificado como um alimento completo, o ovo fornece nutrientes essenciais como proteínas de alto valor biológico, minerais, vitaminas e ácidos graxos (ALCÂNTARA, 2012).

Para abastecer essa demanda de produtos, o sistema de produção de ovos é predominante em gaiolas nos principais países produtores, com uso de modelos californiano e verticalizado em níveis de baterias. Entretanto, nos últimos anos, a preocupação com o bem-estar dos animais tem provocado mudanças na avicultura no mundo todo (AMARAL et al., 2016).

Tal mudança no modelo de criação está relacionado a forte pressão exercida pelos consumidores na década de 90, desde então, preocupados com o bem-estar garantido aos animais, o qual impulsionou a aprovação da Diretiva 1999/74/CE de 19 julho de 1999 (EUROPEAN UNION, 1999). A referida legislação estabelece normas mínimas para a proteção das galinhas poedeiras na UE, nos sistemas de criação convencional, em gaiolas enriquecidas e livre de gaiolas segundo o Relatório da Human Society International (HSI, 2013).

Dados importantes, destacados por Amaral et al., 2016, mostram que em 2013, na União Européia (UE), 57,4% dos ovos são provenientes de criação em gaiolas enriquecidas, e apenas 0,2% advinda de aves criadas em gaiolas convencionais. Além disso, 26,4% da produção de ovos era de origem livre de gaiolas (*cage free*) e 16% livre de gaiolas com acesso a área externa (*free range*). Da mesma forma, nos EUA, alguns estados aderiram ao controle mais rigoroso quanto ao bem-estar animal, com a aprovação de legislações que regulamentam os modelos de criação (HSI, 2013).

Em contrapartida, a China, maior produtora de ovos em nível mundial, com 40% da produção, está inserida em outro contexto, o de industrializar o setor, visto que 80% daquela produção tem por origem a criação em pequena escala. Esta preocupação em adequar o setor para a tecnificação e industrialização ocorre devido as fortes críticas sobre o modelo de criação, o qual é questionado sobre a garantia de saúde e sanidade, tanto para a ave, como para o contexto de epidemias, com a disseminação de doenças altamente perigosas (AMARAL et al., 2016).

O Brasil, até 2019, participava de 3% da produção de ovos mundial, com aproximadamente 95% da criação dessas poedeiras realizada com a utilização de gaiolas convencionais (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2019), em grande parte dos

casos no sistema verticalizado, também conhecido como automático. A região que possui vasta produção é a sudeste, que corresponde a cerca de 50% do total brasileiro. Em nível nacional, não estão previstas leis que regulamentem a criação de poedeiras em gaiolas, tão pouco leis que proíbem esta forma de criação. No ano de 2012 foi proposta uma lei (SÃO PAULO, 2012), ainda não aprovada, para proibir a criação de galinhas em gaiolas no estado de São Paulo, maior produtor nacional de ovos (SOUSA, 2016).

Existem duas instruções, não normativas, para a criação de aves no sistema convencional em território brasileiro, que são: o “Protocolo de Boas Práticas de Produção de Ovos” publicado pela Associação Brasileira de Proteína Animal – (ABPA, 2008) e “Boas Práticas de Produção na Postura Comercial” desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – (EMBRAPA, 2006). Além disso, cada linhagem possui especificações particulares, as quais estão descritas no respectivo guia do produto.

No mundo globalizado são maiores os contatos entre as pessoas e a disseminação de informações e, neste contexto, logo, é possível notar a crescente adesão à causa animal, ao ponto dos consumidores estarem mais atentos e preocupados com a origem do produto (RODRIGUES, 2016). Uma limitação à maior disseminação de sistemas de criação sustentáveis tem a ver com a o poder aquisitivo dos indivíduos, os quais, em países em desenvolvimento, muitas vezes não estão dispostos a pagar um valor maior por produtos oriundos de criações comprometidas com o bem-estar animal (ROMANO, 2017). É o que aponta a pesquisa feita pelo Instituto Ipsos em 2016, encomendada pela World Animal Protection, a qual comprova que 82% dos consumidores brasileiros comprariam produtos que possuíssem selo de bem-estar animal. Porém, destes, 72% comprariam apenas se o produto com certificação apresentasse preços equivalentes àqueles dos produtos sem certificação (WAP, 2016).

Com isso, é possível indicar que existe a demanda, porém, até o momento, esta se enquadra em um nicho de mercado restrito que tem sido explorado pelos produtores, com intuito de atender aos consumidores aptos a pagarem a mais pelo produto com

selo de bem-estar animal. Com esta mesma demanda, grandes empresas do ramo de alimentação exercem pressão sobre o setor de produção de ovos, o qual vê a necessidade de atender as exigências solicitadas (HSI, 2013). A necessidade em aderir a novos sistemas de criação implica, invariavelmente, no aumento dos custos operacionais na avicultura. Até certo ponto, estes maiores custos podem ser compensados pelo fato de seu valor de mercado ser maior comparado ao de criação convencional (GODINHO JÚNIOR et al., 2022). Outro motivo pelo qual as empresas se veem na necessidade de aderir ao bem-estar, é quanto a valorização de sua marca. Além disso, a empresa ganha indiretamente com a adesão ao bem-estar animal, pois ganha na valorização de sua marca, e este último, para os consumidores brasileiros, segundo o instituto Ipsos em 2016, em grau de importância, vem antes da preocupação com o sistema de criação (AMARAL et al., 2016, GODINHO JÚNIOR et al., 2022; HSI, 2013; WAP, 2016).

Diante desses fatos, sistemas alternativos aos convencionais ganham força, como por exemplo os sistemas de criação denominados como *cage free*, *free-range*, caipira e orgânico, cada qual com suas respectivas especificações. O *cage free* e *free-range* possuem semelhanças quanto ao modo de criação, com diferenciação no acesso ao piquete que esta última exige. São dois sistemas de criação que possuem como padrão o referencial de bem-estar animal para galinhas poedeiras da ONG Humane Farm Animal Care (HFAC, 2018), com origem dos trabalhos científicos mais atuais em associação com o comitê formado por diversos profissionais atuantes na área. No caso do sistema de criação descrito como caipira, colonial ou capoeira, existe a norma brasileira ABNT NBR 16437, elaborada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016), que compreende a produção, classificação e identificação do ovo produzido por essas aves. Por fim, o sistema de criação tipo orgânico que possui como base a Portaria nº 52 de 15 de março de 2021 (BRASIL, 2021), a qual estabelece o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção, com indicação para o setor de produção avícola.

Ainda sobre o sistema de criação convencional e *cage free*, alguns dos principais manejos que os diferenciam é referente a medida disponível para a circulação das aves. O primeiro, por recomendação dos guias de manejo citam que a densidade deve

ser de 350 cm² ou mais, por ave, na gaiola, e no caso das aves livres de gaiola com espaçamento de 1429 cm² por galinha no piso do galpão, o mesmo que 7 aves por m².

O sistema convencional tem sido alvo de críticas relacionadas ao bem-estar animal, especialmente por oferecer espaço reduzido à ave, assim, limita a expressão de seus comportamentos naturais, como ciscar, empoleirar e tomar banho de areia, dessa forma, estão mais sujeitas ao estresse (AMARAL et al., 2016). Oliveira (2014) ainda descreve que em situações de estresse térmico a aves possui dificuldade na manutenção do balanço térmico, que possui relação com a densidade de alojamento. Além disso, outros fatores que as comprometem é o supercrescimento das unhas e a fragilidade no esqueleto da ave, que as torna mais susceptível a fratura desses ossos (GODINHO JÚNIOR et al., 2022).

É de se levar em consideração que o modelo tradicional de criação impulsionou a avicultura nacional, e permitiu maior acesso ao ovo, produto altamente versátil. Outra vantagem deste modelo de criação é o maior controle quanto a biossegurança, por evitar que a ave tenha contato direto com as fezes acumuladas na cama e a higienização dos ovos. Estes últimos, assim que postos, tem por destino esteiras que o transportam até a indústria de beneficiamento, com o mínimo de pressão de contaminação (SACCOMANI, 2015). Outros sistemas alternativos a este são alvo dos produtores, como já citados nesta revisão.

O sistema *cage free* é um desses exemplos, que possibilita a ave exercer mais comportamentos naturais, como por exemplo o acesso ao ninho, ao poleiro, ao hábito de ciscar e de tomar banho de poeira. Rodrigues (2016) indica que por esses motivos, alguns fatores de estresse são reduzidos, pois permite que a ave circule pelas dependências do galpão e realize seus comportamentos naturais. Aspectos negativos, no entanto, devem ser considerados, como a falta de acesso das aves ao ambiente externo e a maior exposição a riscos de contaminação devido ao contato direto com a cama aviária. Além disso, por mais que o manejo seja efetivo, é possível que algumas aves façam a postura fora dos ninhos, e isso possui relação direta com

a qualidade microbiológica do ovo, o qual, nesses casos, apresenta contaminação superior aos ovos postos no sistema convencional (SACCOMANI, 2015).

Diante do exposto, as condições fornecidas para a ave em cada sistema de criação são motivos de discussão, pois o ambiente e o bem-estar são os principais parâmetros a serem abordados.

Componentes ambientais exercem influência direta ao animal, os quais são classificados em “físicos: como área por animal, luz, som, pressão e equipamentos; sociais: densidade populacional, comportamento animal e dominância; térmicos: como temperatura, umidade relativa, ventilação e radiação (THIMOTHEO, 2016, p.4).”

O bem-estar animal é definido pelas 5 liberdades, que leva em consideração o conhecimento da espécie em questão e sua relação com o meio em que vive.

Segundo Rodrigues (2016, p.5), as 5 liberdades são descritas da seguinte forma:

“As aves devem ser livres de medo e angústia: deve ter o conhecimento do comportamento destes animais, para evitar estresse; Livres de dor, sofrimento e doenças: as aves devem ser manejadas em um ambiente, sem elementos que possa provocar dor; Livres de fome e sede: sempre ter acesso a uma boa dieta, sem competitividade e acesso a vontade de água limpa e potável; Livres de desconforto: o ambiente deve proporcionar proteção, prevenindo desconfortos térmicos e físicos; Livres para expressar seu comportamento normal: as instalações devem ter espaços suficientes, para as aves expressar seu bem-estar.”

Além da implementação da avaliação do bem-estar por meio das 5 liberdades, há também a avaliação das alterações comportamentais, parâmetros fisiológicos de frequência cardíaca, respiratória, temperatura, condição corporal, pressão arterial, dentre outros e os bioquímicos que incluem enzimas e hormônios relacionados ao estresse (FRASER, 2008), ou seja, métodos mais objetivos que incluem a dosagem de glicocorticoides, catecolaminas, catalase, glutathione redutase, dentre outros.

Fatores citados por Thimotheo (2016), quando em desequilíbrio, retiram da ave a estabilidade fisiológica, que leva a um quadro conhecido como estresse térmico, e em associação, culmina no estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes.

Para atender o aumento da produção de compostos oxidantes, fisiologicamente, ocorre aumento da produção de antioxidantes enzimáticos, os quais, de forma crônica, apresentam-se elevados devido sua necessidade em função do ambiente que esta ave está presente. Esses antioxidantes são: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (BARBOSA et al., 2010).

A Síndrome do Fígado Gorduroso e Hemorrágico (SFGH) apresenta-se clinicamente como morte súbita em galinhas poedeiras super condicionadas nutricionalmente. O exame patológico revela reservas de gordura celômica abundantes e aumento do fígado, o qual poderá se apresentar pálido, marrom a amarelo, friável com hematomas e hemorragias subcapsulares e parenquimatosas. Frequentemente há uma ruptura capsular com sufusão intracelômica associada a hemorragia (hemoabdome), com um grande coágulo de sangue sobrepondo a cápsula do fígado, e a carcaça está visivelmente pálida devido à anemia hipovolêmica (TROTT et al., 2014).

Alguns distúrbios metabólicos, como a SFGH, estão associadas ao sistema de gaiola (SHINI; SHINI; BRYDEN, 2019). Estudos sugeriram que o aumento do peso corporal teve um grande impacto na mortalidade das galinhas e, em muitos casos, foi associada a fígados gordurosos e SFGH. Da mesma maneira, esses estudos também sugeriram um aumento da incidência de SFGH em lotes de alta produção (SHINI; SHINI; BRYDEN, 2019).

A causa da SFGH ainda não foi totalmente elucidada, mas é provavelmente uma combinação de fatores nutricionais, genéticos, ambientais e hormonais. Uma hipótese plausível para patogênese da SFGH é que o inchaço vacuolar dos hepatócitos interrompe a estrutura reticulina das placas hepáticas devido ao estresse mecânico, o que leva à hemorragia dos sinusóides (TROTT et al., 2014). Além do estresse mecânico na arquitetura do fígado, alguns autores sugeriram que o excesso de lipídios no metabolismo, comum em galinhas poedeiras super-alimentadas, pode facilitar destruição mediada por radicais de oxigênio das fibras de reticulina. Os autores demonstraram que dietas ricas em antioxidantes reduzem a incidência de SFGH (TROTT et al., 2014).

O avanço de tecnologias relacionados a biologia molecular nas últimas décadas, permitiu apuração mais acurada e precisa (reprodutibilidade) por permitirem avaliação do metabolismo celular pela avaliação da expressão diferencial de genes relacionados aos mais diversos processos. A quantificação da expressão diferencial de genes específicos frente a genes de referência já é prática comum na área das ciências médicas, especialmente na medicina humana. Já as ciências “ômicas” (genômica, transcriptômica, metabolômica etc.) tem ganhado cada vez mais espaço na pesquisa em saúde e representam o futuro do estudo pormenorizado dos processos celulares.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estresse oxidativo em tecido hepático de poedeiras criadas em sistema convencional e livre de gaiolas, com ênfase no bem-estar animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os efeitos do sistema de criação convencional e *cage free*:

- Sobre a expressão do gene codificador da proteína HSP70, relacionada ao estresse oxidativo;
- Sobre a integridade hepática macroscópica à necropsia;
- Sobre a deposição de lipídeos, presença de infiltrado inflamatório e de infecção microbiana ao exame histopatológico;
- Sobre dados zootécnicos de peso ao abate, taxa de postura e viabilidade;

4. ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE POEDEIRAS CRIADAS NOS SISTEMAS CONVENCIONAL E CAGE FREE

SALOMÃO C. S.¹; STELSER, K. A.¹; VILWOCK, V.A.¹; LAGUNA J.G.²; DA SILVA T.F.²; AZEVEDO V.A.C.²; MOREIRA G.R.³; SALOMÃO V.S.C.⁴; GONÇALVES, N.C.⁵

¹*Graduando em Medicina Veterinária, Escola Superior São Francisco de Assis, Santa Teresa, Brasil*

²*Departamento de Genética, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil*

³*Departamento de Estatística e Informática, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil*

⁴*Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Espírito Santo, Santa Maria de Jetibá, Brasil*

⁵*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil*

RESUMO

O sistema de criação na avicultura de postura comercial pode influenciar no bem-estar dos animais. Nesta pesquisa foram avaliados, nos sistemas de criação convencional e *cage free*, as seguintes respostas em aves da linhagem Hisex Brown: expressão diferencial do gene codificador de HSP70, relacionado ao estresse térmico e oxidativo; integridade hepática macroscópica à necropsia; deposição de lipídeos, presença de infiltrado inflamatório e de infecção microbiana ao exame histopatológico do fígado e dados zootécnicos de peso ao abate, taxa de postura e viabilidade. O período experimental se deu entre a 18^a e a 78^a semanas de idade, no qual, ao final do ciclo, foi realizado o abate das aves, com subsequente coleta do tecido hepático mediante necrópsia. O peso ao abate também foi aferido e os dados zootécnicos foram fornecidos pela empresa responsável pelos lotes. A expressão do gene codificador de HSP70 foi inferior no fígado das aves criadas em sistema *cage free* ($p < 0,05$). Na avaliação morfológica macroscópica, os fígados das aves do tratamento *cage free* apresentaram menor comprometimento de sua integridade física, referente à Síndrome do Fígado Gorduroso e Hemorrágico. Na avaliação histológica de escore de vacuolização hepática, pelo modelo de Trott, foram obtidos valores semelhantes entre os dois tratamentos ($p > 0,05$). O peso ao abate foi menor para as aves criadas no

sistema *cage free* ($p < 0,05$). A avaliação da taxa de postura e da viabilidade das aves, ao longo das 60 semanas, resultou em melhores índices para o sistema convencional. No geral, os achados do presente estudo sugerem que o fígado das poedeiras criadas no sistema *cage free* está menos exposto ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: estresse oxidativo, fígado, poedeiras comerciais, *cage free*, HSP70, esteatose hepática, bem-estar animal, hisex brown

ABSTRACT

The rearing system in commercial laying poultry can influence the welfare of the animals. In this research, the following responses were evaluated in conventional and cage-free breeding systems in Hisex Brown laying hens: differential expression of the HSP70 gene, which is related to thermal and oxidative stress; macroscopic liver integrity at necropsy; lipid deposition, presence of inflammatory infiltrate and microbial infection in the histopathological examination of the liver and zootechnical data on carcass weight, laying rate and viability. The experimental period took place between the 18th and 78th weeks of age, in which, at the end of the cycle, the hens were slaughtered, with subsequent collection of liver tissue through necropsy. Carcass weight was also measured and zootechnical data were provided by the company responsible for the animals. Expression of the HSP70 gene was lower in the liver of birds reared in a cage-free system ($p < 0.05$). In the macroscopic morphological evaluation, the livers of the hens in the cage-free treatment showed less impairment of their physical integrity, referring to Fatty and Hemorrhagic Liver Syndrome. In the histological evaluation of the liver vacuolization score, using the Trott model, similar values were obtained between the two treatments ($p > 0.05$). Carcass weight was lower for laying hens reared in the cage-free system ($p < 0.05$). The evaluation of the laying rate and viability of the birds, over the 60 weeks, resulted in better rates for the conventional system. Overall, the findings of the present study suggest that the liver of laying hens reared in the cage-free system is less exposed to oxidative stress.

Keywords: oxidative stress, liver, commercial laying hens, *cage free*, HSP70, Hepatic steatosis, animal welfare, hisex brown

INTRODUÇÃO

Dados do quarto trimestre do ano de 2021, publicados pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), indicam que o Produto Interno Bruto (PIB) agropecuário representa 27% do total no Brasil. Neste contexto está a avicultura, a qual possui destaque mundial em produção de carne e ovos.

O bem-estar animal é consideravelmente comprometido no sistema de criação convencional de poedeiras (OLIVEIRA et al., 2014). Com o confinamento das aves em gaiolas, sua capacidade de expressar seus comportamentos naturais é reduzida, o que compromete, não apenas o conforto destes animais, mas também a produtividade (RODRIGUES, 2016).

Dados os impactos do sistema de criação sobre o bem-estar animal, metodologias diversas são estudadas a fim de se quantificar este último parâmetro de forma acurada. Avaliações podem incluir desde a observação de alterações comportamentais, até métodos de monitoramento de alterações em nível celular e molecular, como, por exemplo, variações na expressão hepática de genes que codificam enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e análise histopatológica do tecido hepático.

O presente estudo objetivou comparar os efeitos do sistema de criação de aves de postura, convencional e *cage free*, sobre a expressão hepática do gene codificador da proteína HSP70, relacionada ao estresse oxidativo; sobre aspectos relacionados à integridade macro e microscópica do fígado; e sobre dados zootécnicos de peso ao abate, taxa de postura e viabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

A presente pesquisa foi submetida e aprovada na CEUA da Escola Superior São Francisco de Assis (ESFA), sob o número de protocolo 012/2022.

Local

A fase de campo do experimento foi conduzida na Granja Salomão, em Rio das Pedras, Santa Maria de Jetibá, Espírito Santo. O abate das aves foi realizado no

abatedouro frigorífico Frangos Saudáveis situado à rodovia Luiz Stange, quilômetro 8, Recreio, no mesmo município da referida granja. Para serem transportadas da granja até o abatedouro, foi obtida a guia de trânsito animal (GTA) junto ao Instituto de Defesa Agropecuário e Florestal do estado do Espírito Santo (IDAF). As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte, Minas Gerais. As análises estatísticas foram realizadas no Departamento de Estatística e Informática da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em Recife, Pernambuco.

Animais e Dieta

Foram utilizadas galinhas poedeiras da linhagem Hisex Brown, criadas a partir da 16ª semana de vida até a 78ª semana em sistema convencional (californiano) e sistema *cage free*. As aves em ambos os sistemas foram alimentadas com dieta isoenergética e isoproteica a base de fubá de milho, farelo de soja, calcário, farinha de carne e ossos, premix vitamínico-mineral, cloreto de sódio, DL-metionina e L-lisina. A composição e os níveis nutricionais da dieta estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição (kg/ton) e níveis nutricionais da dieta

Ingredientes (Kg)	16° - 45° semana	46° - 78° semana
Milho	642,8	643,2
Farelo de soja	226	218
Farinha de carne e ossos	35	34
Calcário	87	96
Sal comum	3,5	3,5
Premix vitamínico-mineral*	3	3
Metionina	1	0,8
Lisina	0,5	0,3
Adsorvente**	1	1
Probiótico***	0,2	0,2
Níveis Nutricionais (%)		
Matéria Seca		
Proteína Bruta	17,04	16,57
Extrato Etéreo	3,13	3,1
Matéria Mineral	12,5	13,23

Cálcio	4	4,3
Fósforo	0,51	0,5
Energia Metabolizável Aparente (Kcal/Kg)		
EMA	2.776,62	2.758,52

Legenda: dados fornecidos pela granja.

Valores de referência para preparo de 1000 kg de concentrado.

* Níveis nutricionais balanceados com base no composto comercial da empresa MCassab.

** Composto a base de Bentonita.

*** Produto a base de *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Bifidobacterium bifidum*.

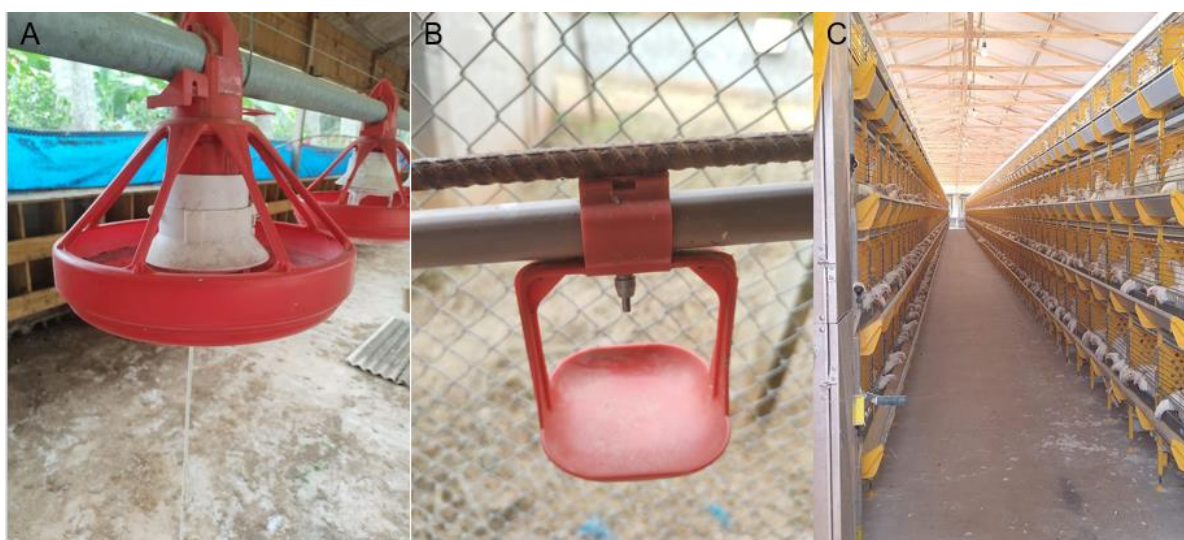
Desenho Experimental

Para a obtenção das amostras e análises laboratoriais foram selecionadas, aleatoriamente, 10 poedeiras de um galpão que continha 9500 aves (densidade de alojamento: 423 cm²/ave) criadas no sistema convencional e 10 poedeiras de um galpão que possuía 1.420 aves (densidade de alojamento no galpão: 9 aves por m² que corresponde a 1.100 cm²/ave) criadas no sistema *cage free*.

Instalações

A etapa de cria e recria das aves foi realizada em comum para ambos os sistemas de criação (Figura 1), com as aves alojados no mesmo galpão, com as mesmas condições de manejo, nutrição e sanidade.

Figura 1 - Instalação utilizada nas etapas de cria e recria



A: comedouro do sistema cage free. B: bebedouro nipple com tacinha. C: recria em sistema de criação verticalizado. Fonte: Arquivo Pessoal.

Na etapa de produção, as aves, no sistema convencional, foram criadas em galpão, em orientação nordeste-sudoeste, com 76 metros de comprimento e 8 metros de largura (área total igual a 608 m²). O galpão era coberto com telhas de amianto e o piso era revestido em alvenaria nas áreas de circulação de pessoas e solo sem revestimento nas áreas abaixo das baterias de gaiolas. Estas últimas possuíam 50 cm de largura, 55 cm de comprimento e 40 cm de altura, com espaço disponível de 2.750 cm². As gaiolas estavam arranjadas em 12 baterias do tipo californiano, com 3 baterias em cada lado e dois corredores de circulação (Figura 2).

Figura 2 - Aves alojadas no galpão no sistema de criação convencional, tipo californiano



Fonte: Arquivo Pessoal.

As aves criadas no sistema *cage free* foram alojadas em galpão, em orientação leste-oeste, com 35 metros de comprimento e 4,5 metros de largura (área total igual a 157,5 m²). O pé direito possuía 4,2 metros no ponto mais alto. A cobertura do galpão era feita com telhas de zinco e o piso era de alvenaria em toda extensão do galpão. A área total de produção era destinada a circulação das aves, e era coberta por raspas de serragem, a qual formava a chamada cama aviária.

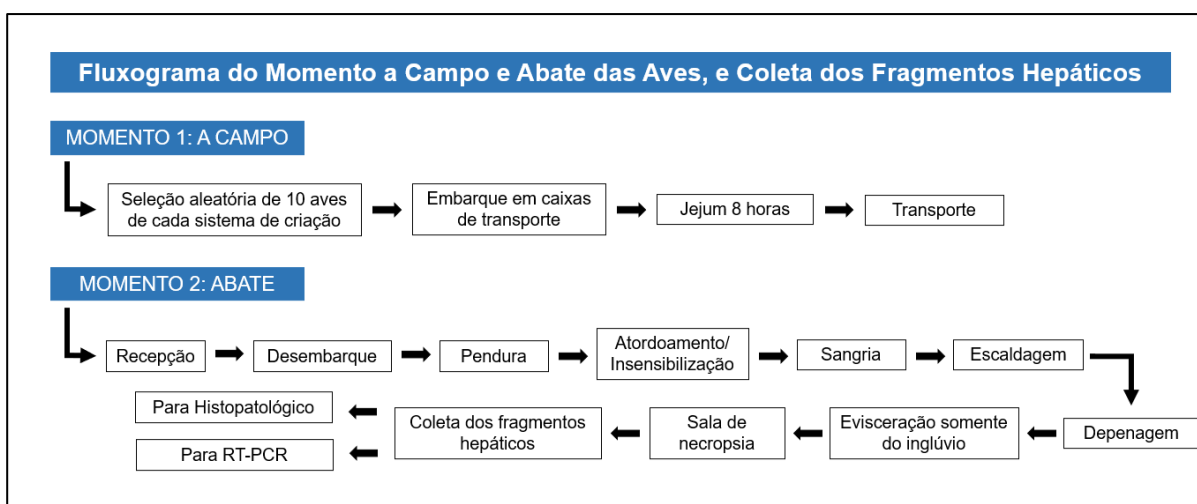
Seleção das aves e obtenção das amostras

Foram selecionadas 10 aves de cada tratamento de forma aleatório, por meio sorteio, ao longo do galpão de criação. Após a pega, os animais foram acomodados em caixas de transporte, devidamente identificadas, e foram transportadas da granja até o frigorífico em veículo apto a garantir o nível de circulação de ar adequado a cada uma delas.

Desde o momento da pega até o início do abate, as aves permaneceram em jejum de no mínimo 8 horas, conforme recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como medida de bem-estar e para minimizar contaminação advinda do conteúdo presente em todo sistema digestório.

A figura 3, a seguir, expõe o fluxograma utilizado nas etapas de seleção, transporte, abate e obtenção das amostras hepáticas. O processo de abate seguiu a linha de processamento industrial, com a necropsia das aves realizada após a evisceração do ingluvío.

Figura 3 - Fluxograma utilizado nas etapas de seleção, transporte e abate das aves

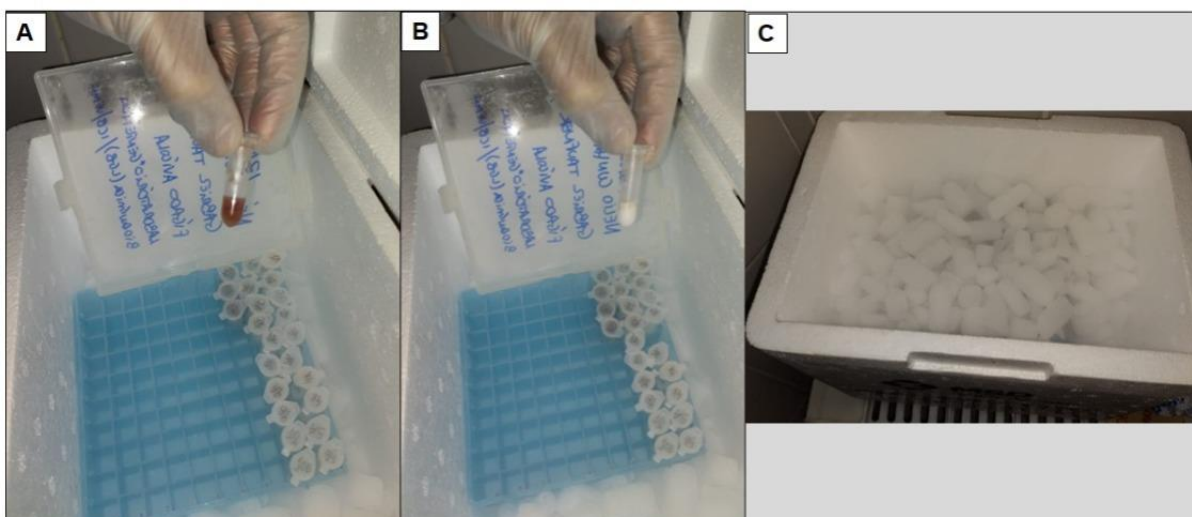


Imediatamente após a necrópsia, o tecido hepático foi coletado, fracionado e acondicionado em quarenta tubos eppendorf livres de RNase e DNase (cerca de 50 mg de tecido em cada tubo), com capacidade para 2mL. Cada dupla de eppendorf recebeu amostras de tecido hepático de cada uma das dez aves dos dois tratamentos. O conteúdo presente nos tubos foi destinado às análises para quantificação de RNA

e, portanto, em cada um destes foram adicionados, previamente, 500 μ L de solução estabilizadora de RNA (RNAlater®, Ambion™).

Ao término das necrópsias a campo, todos os tubos com amostras de tecido hepático foram transportados, devidamente acondicionados em caixas de fibras de papelão com rack para microtubos (Kasvi®), dentro de caixas de poliestireno expandido (EPS) com gelo seco (Figura 4), até o armazenamento em freezer à -80°C , no Laboratório de Genética Bioquímica do ICB-UFMG.

Figura 4 - Fotos tiradas no período de obtenção do tecido hepático.



A: microtubo com amostra de tecido hepático em solução estabilizadora de RNA. B: microtubo com material congelado após 30 min em contato com gelo seco. C: rack coberto por gelo seco em toda sua extensão. Fonte: Arquivo Pessoal.

Potes estéreis para coleta universal, providos de solução de formaldeído a 10%, receberam fragmentos de tecido hepático para confecção de lâminas histopatológicas e foram mantidos em temperatura ambiente.

Durante todos os procedimentos listados anteriormente, necrópsias e coletas de tecido hepático, foram utilizadas toucas, máscaras e luvas descartáveis. A equipe de trabalho contou com, no mínimo, quatro integrantes: (i) um responsável pela necrópsia da ave durante todos os procedimentos, (ii) um responsável pela coleta do tecido hepático, (iii) um responsável pelos procedimentos de acondicionamento do tecido

hepático nos tubos Eppendorf e congelamento, (iv) um responsável pelos procedimentos de acondicionamento do tecido hepático nos potes de coleta universal.

Genes selecionados para análise de expressão diferencial em tecido hepático

O gene codificador para *Heat Shock Protein 70* (HSP70) foi selecionado para as análises. A referida proteína está relacionada ao estresse térmico e oxidativo, conforme demonstrado em estudo prévio *in vivo* com frangos de corte (RIMOLDI et al., 2015). Foram quantificados ainda os níveis de mRNA de dois genes de referência: β -actina (ACTB) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Extração e purificação do RNA das amostras de tecido hepático

Todos os procedimentos foram realizados em laboratório climatizado e os locais de trabalho, nas bancadas, foram higienizados com álcool 70% e forrados com papel pardo. Além disso, durante todos os procedimentos, os laboratoristas utilizaram luvas de nitrila, toucas e máscaras descartáveis. Previamente ao início dos procedimentos, a centrífuga refrigerada foi ligada para que a temperatura atinja 4°C. Após a retirada do freezer e enquanto não manipulados, todos os reagentes e os eppendorfs, com as amostras e a solução RNAlater, foram mantidos em caixa de EPS com gelo triturado.

A primeira etapa da homogeneização do tecido hepático envolveu sua retirada da solução RNAlater™, com o auxílio de pinça cirúrgica autoclavada, e deposição em microtubo estéril, com saia, tampa de 6 mm e capacidade para 2 mL (Loccus®), o qual continha duas beads em aço de 2,8 mm (Loccus®). Os tubos também continham 1 ml do reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific™, lote 317903). Em seguida foram levados à homogeneização em aparelho Precellys 24 Tissue Homogenizer™ (Bertin Instruments™), por 15 segundos a 6.000 RPM. Imediatamente após homogeneizados, os tubos foram submersos em Nitrogênio líquido, para congelamento instantâneo, a fim de se evitar perdas de integridade do RNA pelo calor gerado com o atrito.

Na sequência, as amostras homogeneizadas foram descongeladas em gelo triturado, em seguida permaneceram em temperatura ambiente por 5 min para então serem centrifugados a 4°C, por 10 min a 12.000 x g, segundo as recomendações do fabricante do reagente TRIzol™. A centrífuga refrigerada, utilizada nessa e em todas

as etapas seguintes, era da marca Eppendorf™, modelo 5415 R. Após a referida centrifugação, as amostras foram cuidadosamente transferidas para um novo microtubo, no qual foram adicionados 200 µL de clorofórmio P.A. 100% (Synth®). Após vigorosa agitação manual por 15 segundos, as amostras foram acondicionadas em caixa de poliestireno com gelo triturado por 3 min. Os microtubos foram então centrifugados a 4°C, por 15 min a 12.000 x g, segundo as recomendações do fabricante do reagente TRIzol™. Em seguida, aproximadamente 400 µL de sobrenadante foram removidos e transferidos para outro tubo. A esta fração, a qual continha RNA, foram adicionados e homogeneizados volumes iguais de etanol absoluto para biologia molecular (Sigma-Aldrich™), a fim de iniciar a purificação do RNA por kit comercial, descrita a seguir.

As etapas seguintes envolveram a purificação do RNA em coluna, por meio do kit comercial RNeasy Mini Kit™ (Qiagen™). Inicialmente o conteúdo do microtubo da etapa anterior foi vertido na coluna, mini spin column, fornecida no referido kit, a qual, em seguida, foi levada à centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. Na sequência, após descarte do eluído, foram adicionados 350 µL do tampão RWI, fornecido no kit, e foi realizada nova centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. Após descarte do eluído, foram adicionados 80 µL de solução com DNase I (Qiagen™) e tampão RDD (Qiagen™), na proporção 1:7, não fornecida pelo kit. Após reação por 15 min em temperatura ambiente, foram adicionados 350 µL do tampão RWI e realizou-se nova centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. Após descarte do eluído, foram adicionados à coluna 500 µL de tampão RPE, fornecido no kit, seguida de centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. Após descarte do eluído, a etapa anterior foi repetida, porém com o dobro do tempo para centrifugação. O microtubo para coleta do eluído, com capacidade para 2 mL, foi substituído por um novo. Realizou-se então nova centrifugação a 4°C, por 2 min a 8.000 x g. O microtubo para coleta do eluído foi novamente substituído, por um com capacidade para 1,5 mL. Finalmente, foram adicionados à coluna 50 µL de água ultrapura para biologia molecular (Phoneutria Biotecnologia®) e foi realizada a última centrifugação a 4°C, por 1 min a 8.000 x g. Desta vez, o eluído no microtubo com capacidade para 1,5 mL e que continha RNA purificado, foi armazenado em ultrafreezer, à -80°C.

Análise da concentração, pureza e integridade do RNA extraído

A estimativa da concentração de RNA, em ng/ μ L, na solução obtida após a extração, bem como a análise da pureza da mesma, foi realizada em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™) e os dados obtidos estão expostos na Tabela 2. O grau de pureza foi avaliado pela razão entre as absorvâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm. Segundo Desjardins e Conklin (2010), RNA puro produz valores próximos de 2 para a referida razão.

Tabela 2 - Concentração de RNA (ng/ μ L) e razão entre as absorvâncias nos comprimentos de onda 260/280 nm.

Tratamento Convencional			Tratamento Cage free		
Amostra	[RNA]	260/280	Amostra	[RNA]	260/280
1	1944,4	2,09	9	1205,7	2,03
2	1209,0	2,08	10	199,9	2,01
3	2146,7	2,05	11	1108,3	2,08
4	254,9	1,99	12	1343,7	2,09
5	1673,0	2,08	13	580,0	1,85
6	151,9	1,94	14	216,3	2
7	585,9	2,01	15	1729,0	1,89
8	554,3	1,94	16	871,5	1,91

A integridade do RNA extraído foi avaliada por corrida em gel de eletroforese a fim de detectar as bandas de RNA ribossomal 28S e 18S. Inicialmente foi preparada uma

solução tampão, necessária para produção do gel e para a corrida (tampão TAE). A solução continha Tris-Aminometano (54,2% p/v), ácido acético glacial (5,7% p/v), EDTA 0,5M pH 8,0 (10% v/v) e água Milli-Q qsp 1L. Para o preparo do meio de corrida, para cada 16 amostras, foram preparados 60 mL de gel a 1% de agarose (0,6 g de agarose em 60mL de TAE diluído em água destilada na proporção de 1:50). A solução foi aquecida em micro-ondas por cerca de 40 segundos, até a completa solubilização. Após alcançada a temperatura de contato foi adicionado brometo de etídeo, na concentração de 1 μ L para cada 20 mL de solução. Em seguida, a solução foi depositada em cuba com 2 pentes, para 13 poços cada, e aguardou-se a polimerização e solidificação do gel.

Para a corrida foi utilizado o conjunto Bio-Rad wide mini-sub cell™. Após a inclusão da cuba com o gel solidificado dentro do referido conjunto, um volume de cerca de 500 mL do tampão TAE foi adicionado, quantidade esta suficiente para cobrir o gel. Nos poços de corrida do padrão (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen by Thermo Fischer Scientific™, lote 00821660) foram adicionados 10 μ L de uma solução preparada com 1 μ L do padrão, 1 μ L do tampão de amostra presente no kit do padrão e 8 μ L de água Milli-Q. Nos demais poços foram adicionados 10 μ L de solução preparada com 1 μ L do tampão do kit do padrão e 9 μ L de outra solução preparada com o produto da extração do RNA e água Milli-Q. Essa última foi produzida de modo a se obter um total de 150 ng do referido ácido nucléico. Para a realização dos cálculos dos volumes pipetados da solução de RNA, foram utilizados os dados de concentração obtidos em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™).

Após a alocação do padrão e das amostras nos poços do gel, deu-se o início à corrida por meio da aplicação de corrente elétrica (90 V). A foto documentação foi realizada após 40 min do início da corrida em aparelho transiluminador (Loccus®). Os resultados obtidos nesta etapa, para as 48 amostras, evidenciaram satisfatória integridade do RNA extraído, haja vista a nitidez das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S,

Determinação da expressão gênica diferencial em tecido hepático

A síntese do DNA complementar (cDNA), a partir do RNA extraído das amostras de fígado das aves, foi realizada por meio do kit comercial High-Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit™ (AppliedBiosystems, Thermo Fisher Scientific™), conforme orientações do fabricante. Para as reações de PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizou-se o equipamento Rotor-Gene Q (número de série R0716146, Qiagen, Venlo, Holanda). As reações ocorreram segundo o protocolo padrão do equipamento. A sequência dos binômios tempo-temperatura foram: 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Após 45 ciclos, se deu a determinação da curva de dissociação (melting), por meio da variação de temperatura, de 55°C até 95°C, com elevação de 1°C a cada minuto.

Para as análises, além do cDNA, utilizou-se o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystems, Thermo Fisher Scientific™), de acordo com as orientações do fabricante. Água ultrapura para biologia molecular (Phoneutria®) também foi utilizada.

A sequência dos primers dos três genes selecionados na espécie aviária (*Gallus gallus domesticus*) estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3 - Gene, direção e sequência dos *primers* na espécie aviária (*Gallus gallus domesticus*)

Gene	Direção	Primers (5'-3')	Referência
ACTB	F	ATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	(VARASTEJ et al., 2015)
	R	TTTATGCGCATTATGGGTTTTGT	
GAPDH	F	GAGGGTAGTGAAGGCTGCTG	(HE et al., 2018)
	R	CATCAAAGGTGGAGGAATGG	
HSP70	F	CTCTCATCAAGCGTAACACCAC	(SANTOS et al., 2019)
	R	CTCTCACCTTCATACACCTGGAC	

direção do primer (F = forward; R = reverse). Adaptado de (RIBEIRO et al., 2022)

Inicialmente foi feita a padronização dos primers (Integrated DNA Technologies™) e do cDNA, para se definir as concentrações ótimas para ambos. Assim, foram testadas três concentrações de cDNA (50, 100 e 200 ng/μL) frente a três concentrações de primer (5, 10 e 15 μM). De modo geral, os melhores desempenhos foram obtidos com o binômio 200 ng/μL de cDNA e 5 μM de primer. O cálculo dos volumes das soluções a serem pipetados para que se obtivesse, para todas as amostras, 200 μg de cDNA, foram feitos com base nas concentrações deste último medidas em espectrômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific™).

Preparo e avaliação das lâminas hepáticas

Fragmentos de fígado foram fixados com solução 10% formalina, embebida em parafina, e seccionados em lâminas a 4μm. O tecido foi fixado e corado com hematoxilina-eosina (HE).

Para avaliação histopatológica, utilizou-se o sistema de escore de vacuolização hepática. Tal escore foi aferido de acordo com o modelo de Trott et al. (2014), no qual a vacuolização hepatocelular foi caracterizada por um ou múltiplos vacúolos citoplasmáticos claros e bem demarcados classificados nos seguintes critérios, conforme visto em HE, da seguinte forma: escore 0, quando não há ou é muito rara a vacuolização; escore 1, quando há menos de 50% dos hepatócitos contendo vacúolos de qualquer tamanho; escore 2, quando 50% ou mais dos hepatócitos contém vacúolos de tamanho variável ou vacuolização difusa com pequenas vacúolos; escore 3, quando há vacuolização difusa com grandes, ou médios a grandes, vacúolos. No estudo de Trott et al. (2014), quando se tinha mais de uma seção hepática, todas as seções eram visualizadas. Se houvesse uma diferença marcante entre as seções para um caso particular, aquelas seções com evidência de hemorragia eram usados para classificação.

Delineamento experimental e testes estatísticos

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos, os quais são os sistemas de criação, convencional e *cage free*, com 10 animais por tratamento.

As fontes de variação e os respectivos graus de liberdade estão expostos na tabela 4 de análise de variância a seguir:

Tabela 4 - Cálculo das fontes de variação e graus de liberdade.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade
Total	$(10 \times 2) - 1 = 19 \text{ GL}$
Tratamento	$2 - 1 \text{ GL} = 1 \text{ GL}$
Erro	$19 - 1 = 18 \text{ GL}$

Foram realizados os testes estatísticos de Komogorov (1933) e Smirnov (1948) e de Levene (1960) para averiguar a normalidade dos dados e a homoscedasticidade das variâncias, respectivamente, nas diferentes respostas analisadas. Confirmados os pressupostos para o uso da estatística paramétrica, ou seja, dados com distribuição normal e variâncias homocedásticas, as médias foram comparadas pelo teste F de Fisher com pós teste de Tukey (Sampaio, 2010), em um nível de significância de 5%. Se um dos pressupostos para o uso da estatística paramétrica não foi cumprido, as medianas foram comparadas por meio do teste Mann-Whitney (SAMPAIO, 1998), da estatística não paramétrica, também em um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Expressão hepática do HSP70

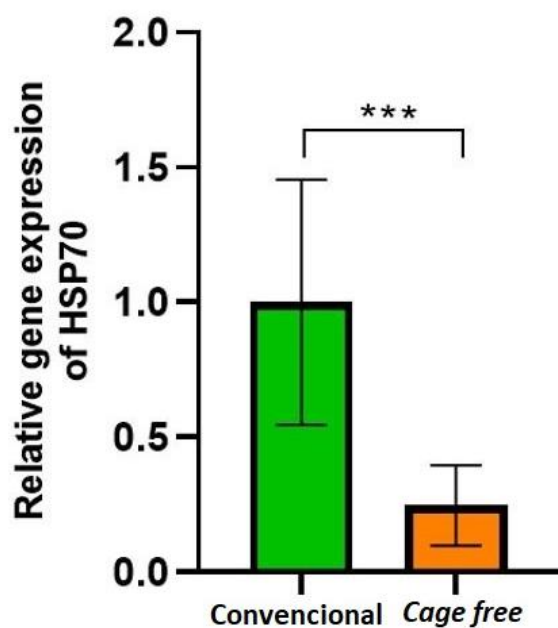
A Tabela 5, a seguir, expressa os resultados obtidos a partir da análise de RT-qPCR do tecido hepático.

Tabela 5 - Médias e desvios padrão para abundância relativa de mRNA (ΔCT , \log_2) obtidas nos tratamentos

Tratamento	ΔCT, \log_2	Desvio Padrão
Convencional	1,1086 A	0,5029
Cage free	0,2735 B	0,1656
p-valor	0,001	

Médias seguidas por letras distintas representam diferença pelo teste de F de Fisher ($p < 0,05$).

Figura 5 - Expressão relativa do gene HSP70 nos dois sistemas de criação



Escore de acometimento do tecido hepático

A Tabela 6, a seguir, expressa os resultados obtidos a partir da análise de histopatologia do tecido hepático.

Tabela 6 - Escore de acometimento do tecido hepático

Amostras	Tratamento	Escore	OBS
A	Convencional	0	
B	Convencional	0	Inflamação (Bacteria), peri-portal
C	Convencional	1	
D	Convencional	1	
E	Convencional	3	Inflamação (Bacteria), peri-portal
F	Convencional	0	
G	Convencional	0	
H	Convencional	2	
I	Convencional	0	

J	Convencional	2	Inflamação (Bacteria)
A	Cage free	0	Inflamação (Bacteria), peri-portal, Muitos neutrófilos
B	Cage free	0	
C	Cage free	0	
D	Cage free	0	Inflamação (Bacteria), peri-portal, Muitos neutrófilos
E	Cage free	1	
F	Cage free	1	Inflamação (Bacteria), peri-portal, Muitos neutrófilos
G	Cage free	0	
H	Cage free	0	
I	Cage free	0	
J	Cage free	0	

Legenda:

- 0 Menos de 5% de vesículas de gordura
- 1 Menos de 50% das vesículas de gordura
- 2 Mais de 50% de vesículas de gordura
- 3 Vesículas completamente comprometidas, grandes e médias

A Tabela 7, a seguir, expressa o resultado da análise estatística da comparação das medianas dos valores de escore hepático obtidas nos tratamentos.

Tabela 7 - Comparação das medianas dos valores de escore hepático obtidas nos tratamentos

Tratamento	Escore dos fígados
Convencional	1,0
Cage Free	0,0
p-valor	0,12

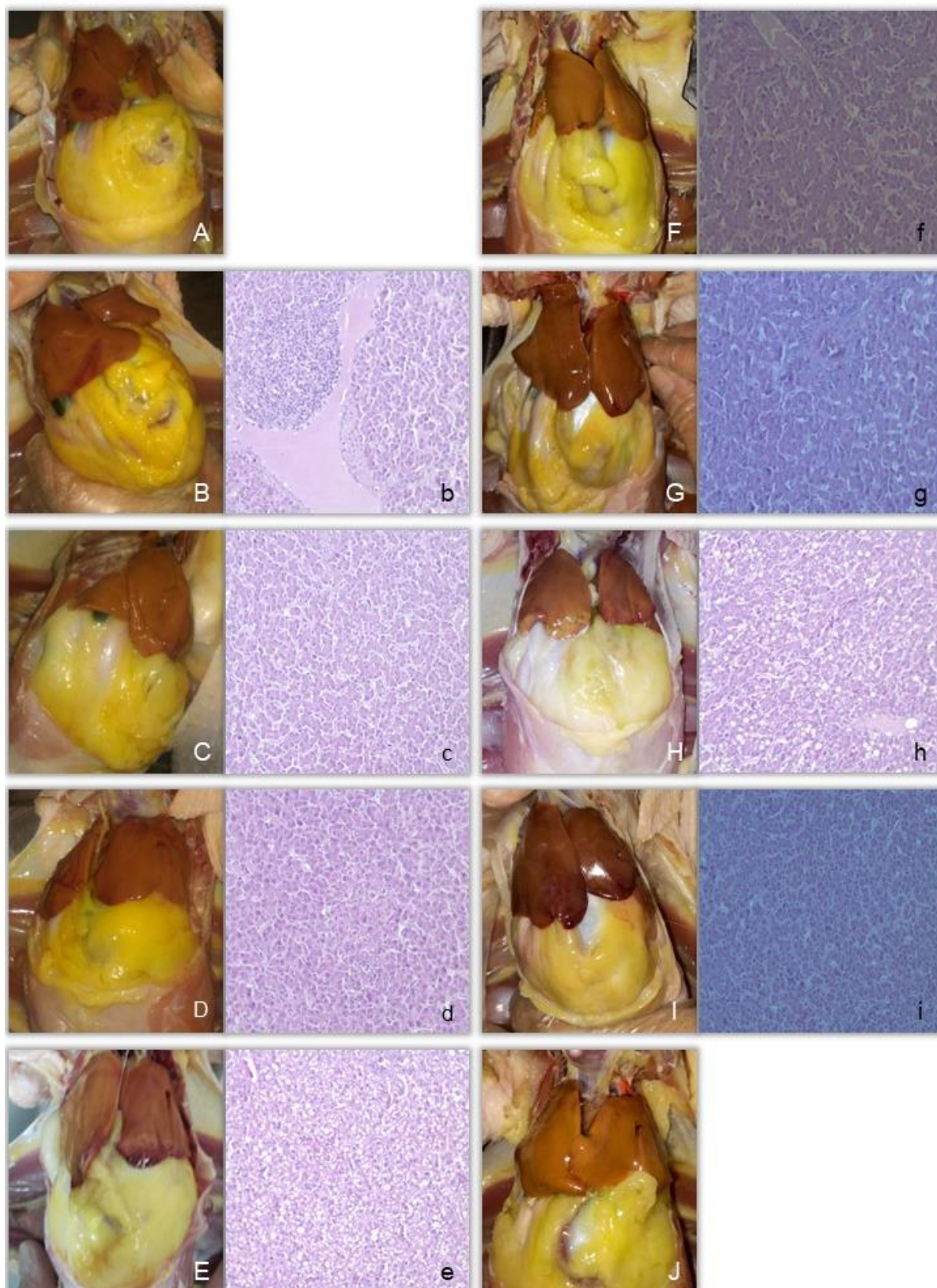
Medianas semelhantes pelo teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$)

Avaliação macroscópicas e microscópicas do tecido hepático

A figura 6, a seguir, expressa as características macroscópicas da cavidade celomática *post mortem* e as lâminas histopatológicas obtidas dos fígados das poedeiras criadas no sistema convencional.

Figura 6 - Cavidade celomática e lâmina histopatológica obtida das aves criadas no sistema convencional.

Imagens macroscópicas (em maiúsculo), e microscópicas (em minúsculo) de aves Hisex Brown criadas no sistema Convencional



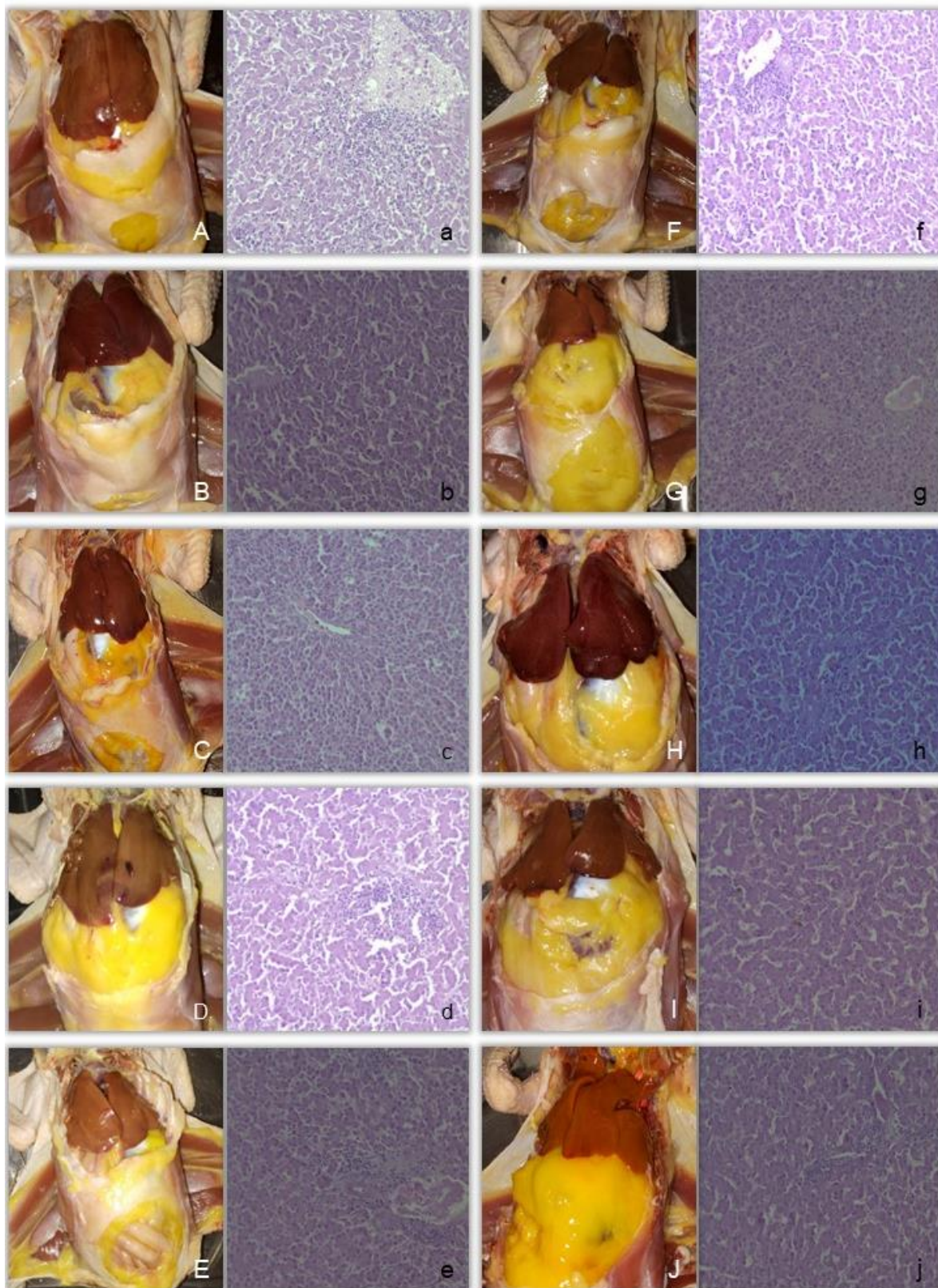
Legenda: Evidenciam nas letras maiúsculas as características macroscópicas post mortem dos fígados das poedeiras criadas no sistema convencional. Em letras minúsculas estão apresentados cortes histopatológicos dos fragmentos coletados pelo referido fígado identificado com a mesma letra, porém maiúsculas.

Os arquivos referentes às imagens microscópicas das letras “a” e “j” foram corrompidos, o que inviabilizou sua apresentação na figura acima.

A figura 7, a seguir, expressa as características macroscópicas da cavidade celomática *post mortem* e as lâminas histopatológicas obtidas dos fígados das poedeiras criadas no sistema *cage free*.

Figura 7 - Cavidade celomática e lâmina histopatológica obtida das aves criadas no sistema *cage free*.

Imagens macroscópicas (em maiúsculo), e microscópicas (em minúsculo) de aves Hisex Brown criadas no sistema Cage Free



Legenda: Evidenciam nas letras maiúsculas as características macroscópicas post mortem dos fígados das poedeiras criadas no sistema *cage free*. Em letras minúsculas estão apresentados cortes histopatológicos dos fragmentos coletados pelo referido fígado identificado com a mesma letra, porém maiúsculas.

Peso das aves post mortem

A tabela 8 a seguir expõe a estatística para avaliação do peso ao abate das aves dos sistemas convencional e *cage free*, sem penas e sem inglúvio.

Tabela 8 - Estatística descritiva para avaliação do peso ao abate, sem penas e sem inglúvio

Sistema de Criação	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Convencional	10	1760,5	187,7	1365,0	1815,0 A	1970,0
<i>Cage free</i>	10	1540,5	130,3	1405,0	1495,0 B	1775,0

Medianas diferentes pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Dados zootécnicos relativos à produção e viabilidade

A tabela 9, a seguir, expõe a estatística descritiva da produção dos sistemas convencional e *cage free*.

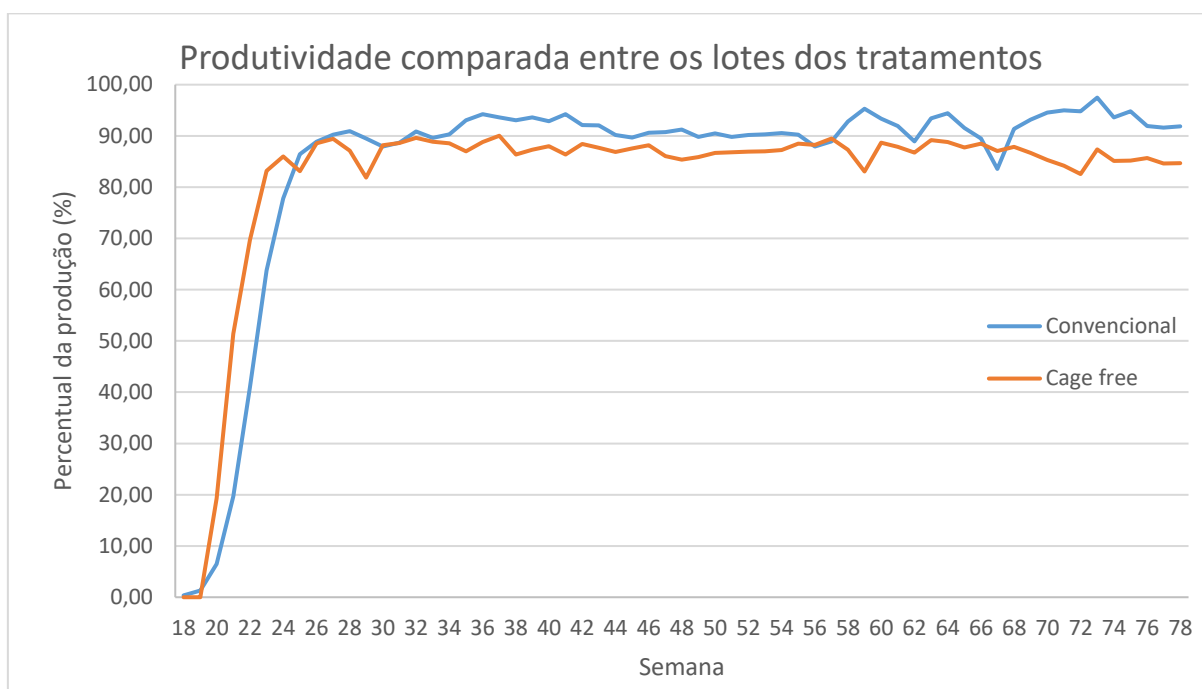
Tabela 9 - Estatística descritiva da produção em comparativo nos referidos sistemas de criação em estudo.

Sistema de Criação	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Convencional	61	84,39	22,21	0,36	90,76 A	97,47
<i>Cage free</i>	61	82,1	18,27	0	87,01 B	90,03

Medianas diferentes pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

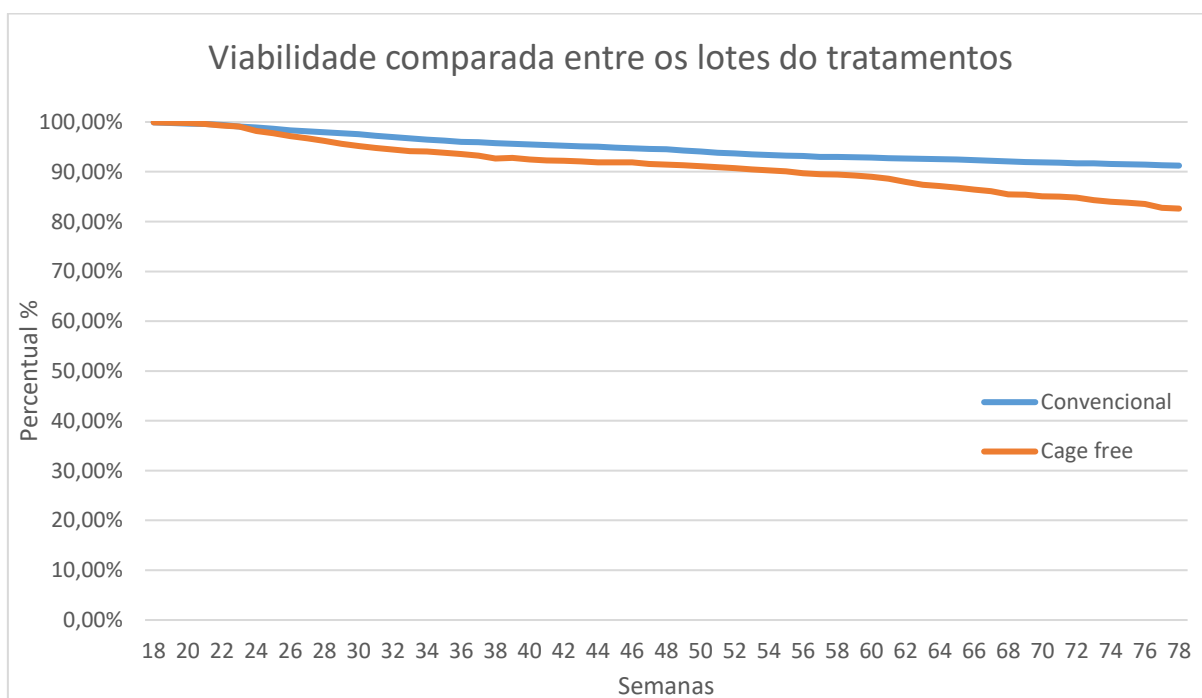
O gráfico 1, a seguir, compara a produtividade entre os dois tratamentos.

Gráfico 1 - Comparação da produtividade entre os dois tratamentos da pesquisa.



O gráfico 2, a seguir, compara a viabilidade entre os dois tratamentos.

Gráfico 2 - Comparação da viabilidade entre os dois tratamentos da pesquisa.



Os dados de produção e viabilidade foram obtidos a partir da ficha de preenchimento semanal do lote, que é realizada pelo colaborador responsável pela coleta dos ovos.

No que diz respeito a viabilidade, não foi realizada a avaliação estatística, devido a diferença entre a quantidade de aves no lote, porém, foi realizado o comparativo da viabilidade ao longo das semanas, com porcentagem final para o lote convencional em 91,24% e *cage free* em 82,61%.

DISCUSSÃO

Expressão hepática do gene HSP70

De acordo com Cedraz et al. (2017), as proteínas de choque térmico produzem respostas por alguns fatores além do calor, como infecção microbiana, trauma tecidual e lesão genética, desta forma corrobora com os resultados da pesquisa, uma vez que houve distinção na expressão de HSP70 entre os tratamentos, diferença essa que pode ser justificada por elementos do ambiente produtivo.

A proteína de choque térmico 70 (Hsp70) é uma chaperona molecular que é expressa em resposta ao estresse térmico. Nesse papel, HSP70 se liga aos seus substratos proteicos e os estabiliza contra a desnaturação ou agregação até que as condições melhorem (EVANS, 2014).

Em outra publicação do mesmo ano, Cedraz et al. (2017) compararam a expressão de HSP70 e a performance de linhagens de frangos de corte de três linhagens: Cobb 500, Caneluda e Peloco. Os autores obtiveram diferença estatística na expressão de HSP70 em função do estresse térmico artificial.

Na presente pesquisa, os níveis de expressão de HSP70 no fígado das aves criadas no sistema convencional foram maiores que aqueles obtidos nas aves criadas no sistema *cage free*. Estes resultados possivelmente foram influenciados por fatores exógenos, relacionado as condições ambientais e produtiva a qual essas aves são expostas, o qual impactam a saúde do fígado, e naturalmente a expressão de HSP70.

Baykalir & Simsek (2018) realizaram um estudo comparativo com aves da linhagem Bovans White, no qual os tratamentos eram os sistemas de criação orgânico em comparação ao convencional, obteve-se níveis mais baixos na expressão de HSP70 nas aves provenientes do sistema convencional, resultado oposto ao encontrado na presente pesquisa. No entanto, é importante ressaltar que no sistema orgânico, ao

contrário dos sistemas testados aqui, os animais têm acesso à área externa ao galpão e sua alimentação deve ser livre de promotores de crescimento, produtos de origem animal e alimentos transgênicos. Tais fatores podem, em parte, explicar a diferença nos resultados, especialmente o acesso à área externa. Apesar da esperada menor exposição a fatores estressantes, poedeiras criadas no sistema orgânico acabam por estar expostas a maior desafio imunológico, pela maior exposição a micro-organismos ambientais, fator este que pode levar à elevação do estresse oxidativo hepático e, como consequência, maior expressão do gene HSP70. Simsek et al. (2018) também evidenciaram maior estresse oxidativo em fígado e músculo esquelético em galinhas criadas no sistema orgânico, pela maior expressão do gene codificador da enzima glutathione peroxidase, importante componente do sistema antioxidante celular.

De acordo com Baykalir & Simsek (2018), os estudos sobre HSP70 em aves, em geral, estão mais relacionados ao estresse térmico, e ao que tudo indica, ainda não se fez uma comparação entre sistemas de criação, como a que se apresenta aqui. No entanto, os dados obtidos por Baykalir & Simsek (2018) em adição aos encontrados neste presente estudo dão indícios da influência dos sistemas de criação sobre a expressão de HSP70.

Outro estudo que demonstra a correlação entre HSP70 e o estresse térmico foi realizado por GU et al. (2012), no qual foi observada a super expressão daquele gene, induzida pela temperatura ambiente, bem como melhora no sistema de defesa antioxidante em frangos de corte.

Avaliação macroscópicas e microscópicas do tecido hepático

Os resultados de escore de vacuolização hepatocelular, aferidos de acordo com o modelo de Trott et al. (2014) foram analisados em associação com a presença de hemorragias na avaliação macroscópica das respectivas aves, haja vista a importância de se associar a avaliação microscópica e a presença de pontos hemorrágicos, à macroscopia, nos fígados com alta vacuolização.

A patogênese da hemorragia associada com a síndrome do fígado gorduroso e hemorrágico (SFGH) ainda não foi identificada. No entanto, a hemorragia pode

resultar da ruptura da fibra de reticulina e da cápsula devido ao inchaço excessivo do fígado causada pelo acúmulo de gordura (KUMAR, 2019).

Uma hipótese plausível para a patogênese da SFGH é que o inchaço vacuolar dos hepatócitos rompe a estrutura da reticulina das placas hepáticas devido ao estresse mecânico, e leva a hemorragias sinusóides. Além do estresse mecânico para a arquitetura do fígado, Kumar (2019) sugere que o excessivo metabolismo lipídico que ocorre em galinhas poedeiras superalimentadas pode facilitar a destruição mediada por radicais de oxigênio das fibras de reticulina. Ainda segundo aquele autor, alimentar os animais com uma dieta rica em antioxidantes reduz a incidência de SFGH.

Na macroscopia, segundo Trott et al. (2014), um dos principais indicativos de síndrome do fígado gorduroso é a abundante presença de gordura na cavidade celômica, com aumento do fígado, o qual pode se apresentar de cor pálida, marrom e amarelo, com consistência friável, hematomas e hemorragias subescapulares e parenquimatosas.

Na presente pesquisa foi possível encontrar resultados que corroboram com os achados de Trott et al. (2014), principalmente em amostras provenientes do sistema de criação convencional, visto que os desafios da alta performance produtiva podem gerar essas apresentações no tecido. As amostras F, I, E e J (Figura 6) apresentaram estado mais grave da Síndrome do fígado gorduroso e hemorrágico.

Quanto às amostras pertencentes ao sistema livre de gaiolas, não há indicativo de ocorrência da síndrome do fígado gorduroso e hemorrágico, visto a menor presença de esteatose. No, entretanto, há uma presença muito maior de infiltrado inflamatório e infecção bacteriana nas amostras do tecido provenientes das aves do sistema *cage free*, muito provavelmente em decorrência da maior interação com matéria orgânica no meio ambiente galpão.

Peso das aves ao abate

Segundo Carvalho (2019), linhagens comerciais diferenciam-se através de muitos fatores como ganho de peso, potencial produtivo, viabilidade e consumo de ração, a autora ainda comenta que linhagens com baixo consumo de ração podem se tornar

um desafio uma vez que as aves têm se tornado mais precoces com adiantamento da maturidade sexual, o que gera maiores desafios para os produtores, visto que o consumo de ração e peso corporal são difíceis de se obter após o início da postura. Ainda, a autora comenta que modelos de criação alternativos são desafiadores, pois a dinâmica de peso e conversão alimentar se modificam, uma vez que a ave é capaz de se exercitar, o que cria a necessidade de adaptação nos mecanismos de interpretação desses dados.

Dados zootécnicos relativos produção e viabilidade

As principais causas de mortalidade em sistemas alternativos, como o *cage free* ou *free range*, é canibalismo, uma prática mais comum no início da fase de postura, e que, em sistemas convencionais, parece ser um problema menor, apesar de prevalecer topo dos principais riscos à produção de ovos (BARBOZA, 2019). Outro fator que afeta a produção e induz ao canibalismo é o prolapso do oviduto, comum em aves jovens e com pouco desenvolvimento, com sobrepeso ou excesso de gordura, alta densidade, principalmente em sistemas que utilizam gaiolas, hiperatividade e corte inadequado do bico. Outra causa importante de mortalidade é a chamada “morte súbita” com manifestação de distúrbios fisiológicos que comprometem o sistema cardiorrespiratório, bem como a morte por asfixia, na qual as aves se amontoam uma sobre as outras, em função de algum erro de manejo (BARBOZA, 2019).

O estresse calórico é um fator importante a ser avaliado na produção avícola, pois influencia muito no comportamento das aves, com possível diminuição na produção de ovos. As variações de temperatura e umidade relativa prejudicam o desempenho das aves e influenciam negativamente a qualidade dos ovos. Aves em estresse térmico: consomem menos ração e acabam por não ingerir quantidades suficientes de nutrientes para formação dos ovos; reduzem o peso e espessura da casca; tendem a produzir ovos com casca mole; consomem mais água; e aumentam o ritmo cardíaco e respiratório, como forma de dissipar calor, com tendência a redução no peso corporal. A densidade incorreta também pode causar prejuízos a produção e ao bem-estar das aves, pois o comportamento é alterado, com redução no consumo de ração, redução de peso corporal e o aumento na agressividade e mortalidade das aves (RODRIGUES, 2016).

CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que o fígado das poedeiras criadas no sistema *cage free* está menos exposto ao estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, J. B. **Qualidade físico-química de ovos comerciais: avaliação e manutenção da qualidade.** 2012. Seminário apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT. **Avicultura – Produção, Classificação e identificação do ovo caipira, colonial ou capoeira.** 12 dez. 2016. Exemplar exclusivo. Impresso em: 11 jun. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. ABPA. **Protocolo de Boas Práticas de Produção de Ovos.** jun. 2008. Disponível em: <http://avisite.com.br/legislacao/anexos/protocolo_de_boas_praticas_de_producao_d_e_ovos.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. ABPA. **Pesquisa da ABPA aponta consumo de proteína animal em 98,5% dos lares.** 23 jun. 2021. Disponível em: <<https://abpa-br.org/pesquisa-da-abpa-aponta-consumo-de-proteina-animal-em-985-dos-lares>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. ABPA. **Relatório anual.** 2022. Disponível em: <<https://abpa-br.org/abpa-lanca-relatorio-anual-2022/>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

AVICULTURA INDUSTRIAL. **Tudo que você precisa saber sobre os sistemas de produção de ovos.** 26 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/tudo-que-voce-g-saber-sobre-os-%20sistemas-de-producao-de-ovos/20190326-113131-t740>> Acesso em: 18 jun. 2022.

AZEVEDO, Gessica et al. Produção de aves em sistema orgânico. **PUBVET**, v. 10, p. 271-355, 2016.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARBOZA, FC. **Avaliação do índice de mortalidade de poedeiras comerciais no sistema livre de gaiolas em uma granja do município de Jaboticabal-SP.** 2019. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia. 2019.

BAYKALIR, Yasin; SIMSEK, Ulku Gulcihan. Impact of different rearing systems and age on Bovans White layer's performance, egg quality traits and synthesis of heat shock protein 70 kDa. **Annals of Animal Science**, v. 18, n. 4, p. 1045-1060, 2018.

BRASIL. Portaria nº 52, de 15 de março de 2021. Sistemas Orgânicos de Produção e as listas de substâncias e práticas para o uso nos Sistemas Orgânicos de Produção. **Diário Oficial da União.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Distrito Federal, 23 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-52-de-15-de-marco--de-2021-310003720>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

CARVALHO, Camila Lopes. **Bem-estar animal em galinhas poedeiras**. 2019. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre. 2019.

CEDRAZ DE OLIVEIRA, Haniel et al. Influence of heat stress, sex and genetic groups on reference genes stability in muscle tissue of chicken. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176402, 2017.

DESJARDINS, P., CONKLIN, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **J. Vis.**, 45, e2565. 2010.

EMBRAPA. Circular técnica nº49: **Boas práticas de produção na Postura Comercial**. dez. 2006. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/busca-de-publicacoes/-/publicacao/443776/boas-praticas-de-producao-na-postura-comercial>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

EUROPEAN UNION. **Council Directive 99/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens** Official journal of the European Communities, 1999. Disponível em: <<http://data.europa.eu/eli/dir/1999/74/oj>> Acesso em: 18 jun. 22.

EVANS, Christopher G.; CHANG, Lyra; GESTWICKI, Jason E. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4585-4602, 2010.

FRASER, David. Understanding animal welfare. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2008.

GISELE AMARAL, DIEGO GUIMARÃES, JULIO CESAR NASCIMENTO, S. C. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES Setorial | Agroindústria**, v. 1, n. 45, p. 167-207, 2016.

GODINHO JÚNIOR, Elves Cleber et al. Demanda por ovos produzidos em sistemas livres de gaiolas: motivação, estratégias e estruturas de governança. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 2, n. 4, p. 1–17, 2022.

GU. X.H., H a o Y., Wa n g X.L. (2012). Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. **Poultry Sci.**, 91: 790–799. H a n s e n P.J. (2004). Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, 82–83: 349–360.

HE. X, Lu Z, Ma B, Zhang L, Li J, Jiang Y et al. Effects of chronic heat exposure on growth performance, intestinal epithelial histology, appetite-related hormones and genes expression in broilers. **J Sci Food Agric** 98:4471–4478. 2018.

HENRIQUES, Juliano Juliano Kelvin; RODRIGUES, Rômulo Batista; UCZAY, Mariana. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 2, p. 179-189, 2018.

HUMAN SOCIETY INTERNATIONAL. HSI. **Adotando uma Política de Produção Livre de Gaiolas para Produtos de Origem Animal no Brasil: Um relatório da HSI.** 16 abril. 2013. Disponível em: <https://www.hsi.org/wp-content/uploads/assets/pdfs/adotando_uma_politica_de.pdf>. Acesso em: 18 jun. 22.

KARTHIK, L. et al. Protease inhibitors from marine actinobacteria as a potential source for antimalarial compound. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90972, 2014.

KOLMOGOROV, A. Sulla de terminazione empirica di una leggedi distribuzione. **Giornaledel l'istituto italiano degliattuari**. n.4, p.83-91, 1933.

LEVENE, H. Robust Tests for the equality of variance. In: Olkin, I(Ed.) Contributions to Probability and Statistics, Palo Alto, California: **Stanford University Press**, p.278–292. 1960.

KUMAR, Y. Ravi et al. Fatty Liver Haemorrhagic Syndrome (FLHS) in Broilers. **Journal of Animal Research**, v. 9, n. 6, p. 879-882, 2019.

OLIVEIRA, Daniele L. de et al. Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 1186-1191, 2014.

RIBEIRO, J. C. das D. Drumond, M.M., Mancha-Agresti, P. et al. Diets Supplemented with Probiotics Improve the Performance of Broilers Exposed to Heat Stress from 15 Days of Age. **Probiotics & Antimicro. Prot.** 2022.

RIMOLDI, Simona et al. Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions. **Meta gene**, v. 6, p. 17-25, 2015.

RODRIGUES, J. S. **Bem estar nos sistemas de produção de aves poedeiras.** 2016. Universidade Federal de Goiás. Regional Jataí, Curso de Zootecnia. Jataí. 2016.

ROMANO, G. G.; **Ambiência, bem-estar e microbiota intestinal de aves poedeiras no sistema free-range livre de antibióticos.** 2012. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SACCOMANI, A. P. DE O. **Qualidade físico-química de ovos de poedeiras criadas em sistema convencional, cage-free e free-range.** 2015. Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável. Programa de Pós-graduação do Instituto de Zootecnia. Nova Odessa. 2015.

SAMPAIO, IBM. **Estatística aplicada à experimentação animal.** 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa Veterinária e Zootecnia, 264p. 2010.

SAMPAIO, I. B. M. **Testes não paramétricos.** Estatística aplicada à experimentação animal, 1998.

SANTOS, RR, Awati A, Roubos-van den Hil PJ, van Kempen TATG, Tersteeg-Zijderveld MHG, Koolmees PA et al. Effects of a feed additive blend on broilers challenged with heat stress. **Avian Pathol** 48:582–601. 2019.

SÃO PAULO (Estado). Projeto de Lei nº 714, de 2012: Dispõe sobre proibição da criação de animais em sistemas de confinamento no Estado. **Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo**.

SHINI, A.; SHINI, S.; BRYDEN, W. L. Fatty liver haemorrhagic syndrome occurrence in laying hens: impact of production system. **Avian pathology**, v. 48, n. 1, p. 25-34, 2019.

SIMSEK U.G., Baykalir Y., Erisir M., Benzef F. Effects of conventional and organic rearing systems and hen age on oxidative stress parameters of blood and ovarian tissues in laying hens. **Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.**, 65: 85–91. 2018.

SMIRNOV, N. Table for Estimating the Goodness of Fit of Empirical Distributions. **The Annals of Mathematical Statistics**, v.19, n. 2, p.279–281, 1948.

SOUSA, GP et al. Comparison of National and International Standards of Good Egg Production Practices. **Revista Brasileira de Avicultura**, v. 18, n.4, p. 581-588, 2016.

THIMOTHEO, M. **Duração da qualidade de ovos estocados de poedeiras criadas no sistema “ cage - free ”**. 2016. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal. 2016.

TROTT, K. A. et al. Fatty liver hemorrhagic syndrome in the backyard chicken: a retrospective histopathologic case series. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 4, p. 787-795, 2014.

VARASTEH. S, Braber S, Akbari P, Garssen J, Fink-Gremmels J. Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galacto-oligosaccharides. **PLoS ONE** 10: e0138975. 2015.

WORLD ANIMAL PROTECTION. WAP. **Consumo às cegas**. 2016. Disponível em: <https://www.worldanimalprotection.org.br/sites/default/files/media/br_files/consumo_as_cegas_latam.pdf>. Acesso em: 18 jun. 22.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Pesquisas comparativas entre os sistemas de criação convencional e alternativos, com ênfase no bem-estar;
- Outros métodos de avaliação da produtividade relacionado ao bem-estar, como a dosagem de albumina no fígado e/ou ovo;

- Efeito dos sistemas de criação sobre o estresse oxidativo e bem-estar animal, bem como sobre a predisposição a infecção microbiana;
- Utilização da expressão gênica como ferramenta para avaliação de estresse;
- Avaliação do estresse oxidativo, por meio de outros genes de referência, como a catalase.
- Efeitos do estresse sobre o metabolismo hepático das aves;

7. APÊNDICES

8. ANEXOS