

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

LUARA LOUZADA AGUIAR

**ZINCO ORGÂNICO E COBRE SOBRE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS E
CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS DE CODORNAS JAPONESAS**

ALEGRE-ES

2016

LUARA LOUZADA AGUIAR

**ZINCO ORGÂNICO E COBRE SOBRE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS E
CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS DE CODORNAS JAPONESAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.
Orientador: Prof. Dr.: José Augusto de Oliveira David

ALEGRE-ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Aguiar, Luara Louzada, 1990-

D249z Zinco orgânico e cobre sobre parâmetros histomorfométricos e contagem diferencial de leucócitos de codornas japonesas / Luara Louzada Aguiar. – 2016.

70 f. : il.

Orientador: José Augusto de Oliveira David.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Ave – Criação. 2. Ave – Poedeiras. 3. Histologia. 4. Saúde animal. I. David, José Augusto de Oliveira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

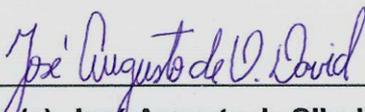
LUARA LOUZADA AGUIAR

**ZINCO ORGÂNICO E COBRE SOBRE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS
E CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS DE CODORNAS JAPONESAS**

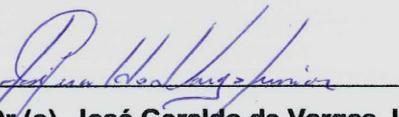
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Reprodução e Nutrição Animal.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2016.

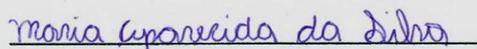
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof (o). Dr (o). José Augusto de Oliveira David
Universidade Federal de São Carlos
Orientador



Prof (o). Dr (o). José Geraldo de Vargas Júnior
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof (a). Dr (a). Maria Aparecida da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

A Deus por ter sido minha fortaleza até aqui.
A minha família, em especial, aos meus pais, que
tanto me apoiaram e dedicaram suas vidas pelo meu
sonho.
Ao William pelo companheirismo em todos os
momentos.
Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo pela minha formação acadêmica e pelo apoio por meio da acessibilidade aos laboratórios para o desenvolvimento das pesquisas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES/MEC) pelo financiamento da pesquisa por meio da concessão de bolsa de estudo durante o mestrado.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, aos funcionários pelo apoio e momento de descontração, aos docentes desse mesmo programa por proporcionarem ampliar meus conhecimentos durante esses dois anos.

Ao Professor Dr. José Geraldo de Vargas Júnior pelo apoio durante esses anos, pelas trocas de ideias e experiências e por permitir ampliar meus conhecimentos.

Ao Professor Dr. José Augusto de Oliveira David pela paciência, amizade e conselhos durante todos esses anos de trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao professor de Inglês Márcio Gomes, agradeço pela sua colaboração nos estudos para a seleção do mestrado. Obrigada!

A Nazaré Delfino Ferreira, ao Júlio Francisco Valiati Marin, a Damielle Leite Figueiredo e ao Emerson Miranda pelo apoio na coleta, nos processamentos e análise das amostras dessa pesquisa.

À técnica do Laboratório de Anatomia e Histologia Animal Viviane Tavares de Paula pelo apoio, aos colegas Diego Lacerda, Vivian Mainardi, Kristan Rodolfo Mantovaneli, Mylena Boeque Lascola, Érica Castellari Costa, Isabela Breder Vargas, Nathália Chicon Elert, Maria Nilza Martins pelos momentos de descontração e por compartilhar as experiências durante esses anos. Como foi bom passar cada momento com vocês!

Aos colegas do mestrado Moara Cuzzuol, Letícia Uzai, Vivian Mainardi, Renan Spadetto (nossos sufocos em estatística experimental sempre serão lembrados rss), Braúlio Faria, Ana Paula Guedes Oliveira, Paula Selvatici, Afonso Cassa Reis, Yara Moreira (saudades dos deliciosos bombons nas aulas), Bianca Cardozo Afonso e Bárbara de Cássia Ribeiro Vieira, obrigada por tornarem as aulas muito melhores e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas eternas Iasmini Nicoli Galter, Jaqueline Pêgo, Márcia Cristina Paulúcio, Mayla Gava e Renata Flávia Carvalho, obrigada pela atenção, pela torcida e amizade. Aos amigos e amigas de longa data por compreenderem minha ausência nesses anos.

A minha república da grande família com minha irmã Lara Louzada Aguiar e meu primo Natan de Aguiar Lopes, foi ótimo conviver com vocês durante esses dois anos.

Aos meus familiares por todo apoio e motivação.

Ao meu namorado William Macedo Dellarmelina agradeço pelo apoio no meu estudo e na minha vida. Obrigada pelo companheirismo, paciência e atenção!

Aos meus pais, Vani Aparecida Louzada Aguiar e Rogério Gomes de Aguiar, que sem eles nada disso seria possível. Obrigada por aceitarem meu sonho como plano na vida de vocês. A vocês todo o mérito!

Por fim e, sobretudo, a Deus por me possibilitar ter essa inesquecível experiência. Obrigada Senhor por, até aqui, estar comigo!

RESUMO

LOUZADA AGUIAR, LUARA. **Zinco orgânico e cobre sobre parâmetros histomorfométricos e contagem diferencial de leucócitos de codornas japonesas.** 2015. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2016.

Dentre os minerais, o zinco e o cobre compõem algumas enzimas responsáveis por processos metabólicos e de defesa do organismo. Com a finalidade de avaliar a possível influência da suplementação desses minerais em codornas japonesas foram analisados: duodeno, magno, fígado, pâncreas e contagem diferencial de leucócitos. Para isso foram usadas 480 codornas japonesas com 180 dias distribuídas inteiramente ao acaso, em fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos, com dez repetições e oito animais por unidade experimental. As mesmas foram suplementadas com rações com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) por 84 dias. Foi coletado sangue de cinco aves por tratamento para confecção de esfregaço sanguíneo e em seguida as mesmas foram eutanasiadas para coleta de duodeno, magno, fígado e pâncreas, que foram processadas histologicamente e coradas com hematoxilina e eosina, para análise histomorfométrica, e técnica de PAS para contagem de células mucosas em duodeno. Os resultados demonstraram que os animais suplementados com 50 mg de zinco apresentaram condições histomorfométricas importantes como: aumento da altura da vilosidade intestinal e aumento da altura do epitélio do magno. A concentração de 3,5 mg de cobre influenciou significativamente em maiores vilosidades intestinais. Não houve interferência significativa do cobre na altura do epitélio do magno, apesar de não significativo, ambas as concentrações de cobre combinadas com 50 mg de zinco orgânico, proporcionaram em alturas maiores do epitélio. As análises, histológica e histomorfométrica de fígado e pâncreas, respectivamente, não foram influenciadas pelos níveis de zinco orgânico e cobre, assim como na função exercida por ambos no metabolismo animal. A contagem diferencial de leucócitos não demonstrou a influência dos minerais estudados nas taxas de leucócitos, entretanto foi observado que o zinco orgânico e cobre amenizam os efeitos do estresse em animais expostos ao desconforto térmico. Portanto foi observado que o nível de 50 mg de zinco orgânico influenciou significativamente em melhores parâmetros histomorfométricos para os órgãos duodeno e

magno, para duodeno especificamente, as concentrações significativas foram 50Zn/3,5Cu, e para magno na concentração de 50Zn/5Cu. Sugere-se que o uso de ambos os minerais amenizaram o estresse térmico, assim mantendo a saúde e bem estar animal.

Palavras-chave: ave poedeira. nutrição animal. histologia. saúde animal

ABSTRACT

LOUZADA AGUIAR, LUARA. **Organic zinc and copper on histomorphometric variables and differential leukocyte count of Japanese quails**. 2015. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2016.

Among the minerals, zinc and copper make up some enzymes responsible for metabolism and the body's defense processes. In order to assess the possible influence of supplementation of these minerals in Japanese quails were analyzed: duodenum, magnum, liver, pancreas and differential leukocyte count. Were used 480 Japanese quails with 180 days distributed completely randomized in a factorial 3x2, totaling six treatments, with ten repetitions and eight animals each. Were supplemented with ration with three levels of organic zinc (35, 50 and 65 mg/kg) and two inorganic copper levels (3.5 and 5 mg/kg) for 84 days. Blood was collected from five birds per treatment for blood smears and then the same were euthanized for duodenum collection, magnum, liver and pancreas, which were histologically processed and stained with hematoxylin and eosin for histomorphometric analysis and PAS technique for mucosal cell count of the duodenum. The results showed that animals supplemented with 50 mg of zinc showed significant histomorphometric conditions such as height increase of intestinal epithelium and increase in epithelial height magnum. The concentration of 3,5 mg of copper significantly influenced in larger intestinal villi. No significant interference from the copper at the time of the magnum of the epithelium, although not significant, both concentrations of copper combined with 50 mg of organic zinc, resulted in larger heights of the epithelium. Histological and histomorphometric analysis of liver and pancreas, respectively, were not influenced by levels of organic zinc and copper, as well as the function performed by both in animal metabolism. The differential leukocyte count showed no influence of mineral studied in leukocyte count, however it was observed that the organic zinc and copper alleviate the effects of stress on animals exposed to thermal discomfort. Therefore was observed that the level of organic zinc 50 mg influenced significantly histomorphometric parameters for magnum and duodenum, for duodenum specifically, significant concentrations were 50Zn / 3,5Cu, and the concentration 50Zn/5Cu for magnum. It is suggested that the use of both minerals softened thermal stress, thereby maintaining the health and well being of animals.

Keywords: animal health; histology; laying bird

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1 - Fotomicrografia do duodeno com (A) a indicação das medidas aferidas na análise histomorfométrica e (B) célula mucosas identificadas por técnica de PAS..... 30
- Figura 1.2 - Medição da altura do epitélio do magno de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.....31
- Figura 1.3 - Gráfico com a projeção dos parâmetros mensurados nas vilosidades do duodeno de codornas japonesas suplementadas com diferentes níveis de zinco orgânico e cobre.....34
- Figura 1.4 - Dendrograma de agrupamento dos tratamentos de zinco orgânico e cobre.35

Capítulo 2

- Figura 2.1 – Fotomicrografia da marcação da área da ilhota pancreática do pâncreas de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.....47
- Figura 2.2 - Relação do grau de lipidose hepática e da relação da área total de ilhotas pancreáticas sobre a área do pâncreas de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.....50

Capítulo 3

- Figura 3.1 - Fotomicrografia de leucócitos de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre. (A) Heterófilo (seta preenchida), Linfócitos (cabeça da seta) e Monócito (seta sem preenchimento); (B) Eosinófilo; (C) Basófilo; (D) Monócito.....60

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.1 - Composição da ração de cada tratamento com os níveis de zinco orgânico e cobre para suplementação de codornas japonesas.....35
- Tabela 1.2 - Médias e desvio padrão dos parâmetros histomorfométricos das vilosidades do duodeno de codornas japonesas suplementadas com diferentes níveis de zinco orgânico e cobre.....33
- Tabela 1.3 - Resultados da análise de correlação entre os componentes principais dos parâmetros mensurados no duodeno de codornas japonesas suplementadas com diferentes concentrações de zinco orgânico e cobre.....33
- Tabela 1.4 - Média da altura do epitélio do magno em codornas suplementadas com zinco orgânico e cobre.....35

Capítulo 2

- Tabela 2.1 - Composição da ração de cada tratamento com os níveis de zinco orgânico e cobre para suplementação de codornas japonesas.....46
- Tabela 2.2 - Grau de lipidose hepática (GLP) e relação da área total de ilhotas pancreática pela área total do pâncreas (RAIP) em codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.....49

Capítulo 3

- Tabela 3.1 - Composição da ração de cada tratamento com os níveis de zinco orgânico e cobre para suplementação de codornas japonesas.....57
- Tabela 3.2 - Média da contagem diferencial de leucócitos de codornas japonesas suplementadas com diferentes níveis de zinco orgânico e cobre.....61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Minerais orgânicos	17
2.2 Zinco	18
2.3 Cobre	18
2.4 Intestino Delgado	19
2.5 Oviduto	20
2.6 Pâncreas	21
2.7 Fígado	22
2.8 Células sanguíneas	23
3. CAPÍTULO 1 - Histologia e histomorfometria de duodeno e magno de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS	32
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	40
4. CAPÍTULO 2 - Análise histológica em fígado e pâncreas e histomorfometria das ilhotas pancreáticas	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
INTRODUÇÃO	45
METODOLOGIA	46
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	53

5. CAPÍTULO 3 - Contagem diferencial de leucócitos em codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.	54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
INTRODUÇÃO.....	57
METODOLOGIA	58
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	64
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	65
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	66

1. INTRODUÇÃO

O grande avanço do setor avícola brasileiro tem impulsionado muitos estudos com o propósito de aprimorar e aumentar a eficiência produtiva das aves. Para isso, é importante considerar a nutrição animal, uma vez que ela visa fornecer quantidades adequadas de nutrientes e minerais, a fim de suplementar a deficiência dos mesmos em componentes bases das rações.

Os minerais inorgânicos são os mais utilizados, no entanto devido a dificuldades de absorção, indisponibilidade e prejuízos ao ambiente, é crescente o número de pesquisas sobre desempenho de aves com a substituição desses pelos minerais orgânicos.

Os minerais orgânicos são minerais ligados a um aminoácido ou algum carreador polissacarídico, visando aprimorar o aproveitamento dos minerais na absorção e melhorar o desempenho animal, além de diminuir o potencial de poluição ambiental devido à baixa eliminação de nutrientes por meio das excretas.

Dentre os minerais utilizados encontram-se o zinco e o cobre, os quais participam na composição de enzimas como co-fatores, que são importantes em processos metabólicos e bioquímicos no organismo.

Diante disso objetivou-se com este trabalho analisar a suplementação de zinco orgânico e cobre em codornas japonesas por meio da histologia e histomorfometria de intestino delgado, magno, fígado, pâncreas e contagem diferencial de leucócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Minerais orgânicos

Desde a década de 50 são realizados estudos referentes ao uso de minerais na suplementação animal devido a problemas relacionados a saúde animal que prejudicavam a produção (BERTECHINI, 2006). Em poedeiras, principalmente, a adição de minerais é importante, pois componentes básicos, como milho e soja, não suprem a quantidade necessária de minerais ao organismo das aves (VEIGA; CARDOSO, 2005).

Segundo McDowell (1992) apesar de compor apenas 5% do organismo animal, os minerais são essenciais no desempenho de diversas funções bioquímicas, na composição, crescimento e desenvolvimento do esqueleto, estão relacionados na formação da casca do ovo e composição do músculo e são essenciais para o bom funcionamento do metabolismo celular.

Por apresentar melhor biodisponibilidade se comparado ao mineral inorgânico, estudos relacionados aos minerais orgânicos têm ganhado destaque nos últimos anos (MACIEL et al., 2010).

Os minerais orgânicos são elementos minerais ligados a algum tipo de carreador, o qual pode ser um aminoácido ou polissacarídeo, que possui a capacidade de ligar o metal por ligações covalentes em grupamentos aminos ou oxigênio, dando origem a uma estrutura cíclica (LEESON; SUMMERS, 2001).

Leeson e Summers (2001) sugerem que essas estruturas orgânicas possuem a função de aumentar a absorção e a disponibilidade desse mineral no organismo, além de aumentar a sua estabilidade física, diminuindo a afinidade dos minerais em se ligar com demais componentes no processo de digestão.

A comparação da biodisponibilidade entre minerais inorgânicos e orgânicos foi demonstrada por Boruta et al. (2007), que comprovaram por meio da análise mineral das fezes de galinhas poedeiras a eliminação maior dos minerais inorgânicos estudados quando comparados aos minerais orgânicos.

2.2 Zinco

Assim como os demais minerais, o zinco apresenta grande importância no organismo. Segundo Prasad e Kucuk (2002) o zinco participa da atividade de cerca de 300 enzimas e desempenha diversas funções metabólicas. De acordo com a NRC (1994) o zinco é importante na composição de algumas metaloenzimas tais como a superóxido-dismutase, anidrase carbônica, álcool-desidrogenase, carboxipeptidase, fosfatase alcalina, DNA e RNA polimerases.

O zinco ainda apresenta função relacionada aos sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo dos ácidos nucleicos, síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos e lipídeos (McDOWELL, 1992).

Além disso, o zinco participa da proteção celular contra radicais livres como componente estrutural e catalítico de enzimas como a superóxido dismutase, presente no citoplasma de todas as células, que possui como centro ativo um íon cobre e um íon zinco (LEHNINGER; NELSON, COX 1998) e a metalotioneína, proteína rica em cistina, capaz de atacar os radicais livres (OTEIZA et al., 1996).

A deficiência de zinco em aves pode gerar problemas de crescimento e anormalidades nas pernas (MCDONALD et al., 2002), alterações na epiderme, gastrintestinais, neurais, esqueléticas, reprodutivas e imunológicas (HAMBIGDE, 2000), afeta as funções do timo, pois o zinco compõe a timosina, hormônio produzido por esse órgão (SHANKAR; PRASAD, 1998) e redução na produção de ovos em galinhas (LEESON; SUMMERS, 2001) .

2.3 Cobre

Estudos referentes à concentração de cobre na nutrição de animais tiveram início a partir de 1930, quando pesquisadores relacionaram certas doenças presentes em ovelhas e bovinos com a deficiência desse mineral no organismo (LEESON; SUMMERS, 2001).

É um elemento essencial no organismo por compor metaloenzimas que participam de processos metabólicos como a citocromo-c-oxidase, oxidase, lisiloxidase, tirosinase, uricase. Além disso, desempenha importante papel na reprodução, desenvolvimento ósseo, desenvolvimento de tecido conjuntivo,

pigmentação de pele e participa da composição da hemoglobina (UNDERWOOD, 1999; LEESON; SUMMERS, 2001).

O cobre absorvido liga-se a albumina que o transfere para o sistema porta. No fígado o cobre se liga com a glutatona e em seguida se liga a metalotionina, que então pode ser destinado à secreção biliar, à síntese de ceruloplasmina ou à estocagem. Dentre as metaloenzimas que o cobre compõe está a ceruloplasmina, uma glicoproteína que transporta e armazena átomos de cobre no sangue e é indisponível à oxidação do ferro. Esta enzima realiza o transporte do cobre do fígado para os órgãos periféricos (UNDERWOOD, 1999).

A absorção de cobre pelo intestino é baixa e alguns fatores como a necessidade do organismo por este mineral, a forma química que o elemento se encontra e a quantidade de outros minerais que podem exercer efeitos antagônicos, a regulam. O cobre pode interagir com outros minerais durante a absorção tal como o zinco. Ambos apresentam afinidade pelo mesmo transportador, portanto se houver maior nível de zinco na dieta, este pode causar deficiência de cobre no organismo pela baixa absorção. Outro exemplo de mineral que compete com o cobre é o molibdênio que em níveis elevados na dieta causa interferência na absorção intestinal de cobre (LEESON; SUMMERS, 2001).

2.4 Intestino Delgado

O intestino delgado possui função importante na digestão, absorção de nutrientes e secreção endócrina. A digestão é finalizada no intestino delgado onde os nutrientes são absorvidos principalmente através da mucosa composta por células epiteliais de revestimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A mucosa é formada por numerosas projeções denominadas de vilosidades, cuja finalidade é aumentar a superfície de absorção para nutrientes. Na base das vilosidades intestinais são observadas invaginações chamadas de criptas, que são pequenas aberturas de glândulas tubulares simples (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O epitélio da mucosa intestinal é composto por células denominadas de enterócitos ou absorptivas, e células caliciformes. Segundo Junqueira e Carneiro (2008) as células absorptivas são identificadas como células colunares altas com

núcleo oval na porção basal, as quais desenvolvem a capacidade de transportar monômeros para o interior da célula, através da membrana apical, e daí para a corrente sanguínea, através da membrana basolateral (MAIORKA et al., 2001). As células caliciformes ficam distribuídas entre as absortivas. Estas produzem glicoproteínas ácidas, as mucinas, que formam o muco intestinal, cuja função é proteger e lubrificar o intestino (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O desenvolvimento da mucosa intestinal inicia com o aumento do comprimento e da densidade dos vilos intestinais, que é estimulado por mitoses seguidas das células da cripta intestinal em direção as vilosidades, e, com isso, há o aumento no número de células e do tamanho do vilão. A partir da formação do órgão há constante renovação e proliferação celular, consequentes das divisões mitóticas das células-tronco localizadas nas criptas intestinais que se diferenciam ao deslocar pelas vilosidades (UNI; GANOT; SKYLAN, 1998; MAIORKA et al., 2001; FURLAN; MACARI; LUGUETTI, 2004).

2.5 Oviduto

Em aves os órgãos reprodutores das fêmeas são compostos por ovário e oviduto, os quais são bilateralmente simétricos e formados precocemente na vida embrionária. (SISSON; GROSSMAN, 1986; DYCE et al., 1996). Na embriogênese, em aves domésticas, forma-se dois ovários e dois ovidutos, no entanto após o nascimento o ovário e oviduto direitos regredem e os esquerdos desenvolvem-se.

No geral o oviduto se abre próximo ao ovário e termina na cloaca, sendo dividido em cinco regiões distintas por sua anatomia e funções fisiológicas específicas: infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina (RIBEIRO et al., 1995; DYCE et al., 1996; SULTANA et al., 2003). Histologicamente é constituído por uma camada mucosa revestida por epitélio simples cilíndrico ciliado e não ciliado, apoiado em uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, duas camadas musculares de músculo liso, uma circular interna e outra longitudinal externa e uma serosa formada por tecido conjuntivo frouxo e mesotélio (BACHA; BACHA, 2000).

De acordo com Macari e Gonzales (2003) o oviduto tem as funções de servir como sítio de fertilização do oócito, onde ocorre o processo da deposição da

albúmen, membranas e casca ao redor do ovo; realizar movimento do ovo, armazenar e transportar os espermatozoides.

O ovário produz o oócito, composto pela gema que é sintetizada a partir de matéria-prima sintetizada pelo fígado (MORAES et al., 2010). No infundíbulo, região em forma de funil ocorre a fecundação seguida pela secreção de material protéico depositado ao redor da gema que contribui para a resistência da membrana pré-vitelina (RICHARDSON, 1935; AITKEN; JOHNSTON, 1963).

Após ser fecundado na região do infundíbulo, no magno ocorre a deposição das proteínas que compõe o albúmen, conhecido como a clara do ovo (RUTZ, ANCIUTI, PAN, 2005). Esta região possui parede distensível e mais espessa do que a parede do infundíbulo, isto devido a presença de dobras com glândulas tubulares em seu interior (WYBURN et al., 1970). O magno é revestido por epitélio do tipo simples cilíndrico com células ciliadas e células secretoras (EVÊNCIO-NETO et al., 2001; TAKATA et al., 2000).

O istmo, região curta do oviduto apresenta faixa estreita de tecido (zona translúcida) na qual as glândulas tubulares estão ausentes e sua parede é mais fina quando comparada às demais partes do oviduto (GIESBERG, 1922).

No útero são observadas numerosas glândulas tubulares e longas microvilosidades em suas extremidades. Sua porção cranial é estreita, onde o ovo provavelmente passa rapidamente para uma porção caudal mais expandida, semelhante a uma bolsa, que mantém o ovo durante a maior parte do período de formação da casca (JOHNSTON et al., 1963).

A vagina é um estreito tubo muscular com uma mucosa branca. Na junção do útero com a vagina há um esfíncter (FUJII; TAMURA, 1963). As pregas delicadas da mucosa são longitudinais, mais delgadas e baixas comparadas às outras porções do oviduto, exceto no funil do infundíbulo (BOBR et al., 1964).

2.6 Pâncreas

O pâncreas é uma glândula composta por tecido exócrino, o qual armazena e secreta enzimas digestivas por meio de glândulas acinosas, e o tecido endócrino, composto pelas ilhotas pancreáticas, responsáveis por sintetizar hormônios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As ilhotas pancreáticas estão relacionadas com a secreção de hormônios como insulina e glucagon, fator de crescimento, angiotensinogênio e trombopoietina. A insulina e o glucagon produzidos pelas ilhotas pancreáticas regulam os níveis de glicose no sangue. Esses hormônios são produzidos por tipos celulares específicos que compõe a parte endócrina do pâncreas (GLASGOW; MULVIHILL, 2008),

Em aves podem-se observar três tipos de ilhotas pancreáticas: as alfa, as quais possuem células alfa e delta, as beta, que possuem células beta e delta, e as mistas, as quais apresentam todos os tipos celulares, alfa, beta e delta (SCHMIDT REAVILL; PHALEN, 2006).

As células alfa produzem glucagon e as células beta sintetizam insulina. Adicionalmente a estas células ocorre a presença das células PP, que produzem polipeptídeo pancreático e correspondem a cerca de 10% a 35% do volume das ilhotas e, as células delta que compõem menos de 5% do volume das ilhotas e produzem somatostatina (GLASGOW; MULVIHILL, 2008; SCHMIDT REAVILL; PHALEN, 2008).

Histologicamente as ilhotas alfas são observadas misturadas na região exócrina do pâncreas, enquanto as ilhotas beta são observadas envoltas e separadas por colágeno. A distribuição das mesmas não é uniforme, podendo diferenciar em áreas do pâncreas, e até mesmo entre espécies de aves (SCHMIDT REAVILL; PHALEN, 2006).

2.7 Fígado

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008) o fígado é o órgão que processa e armazena nutrientes absorvidos pelo trato digestivo para outros órgãos do organismo.

Em aves o fígado apresenta os lóbulos direito e esquerdo, em algumas regiões periféricas dos lóbulos, os espaços porta, encontra-se tecido conjuntivo que reveste ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos. Cada lobo é drenado por um ducto biliar, por um ramo de veia porta, um ramo da artéria hepática. A veia porta encaminha sangue proveniente do trato digestivo, pâncreas e baço. A artéria hepática contém sangue proveniente do tronco celíaco da aorta abdominal. O ducto transporta bile sintetizada pelos hepatócitos a qual desemboca

no ducto hepático. Os vasos linfáticos transportam linfa, que entra de forma eventual na circulação sanguínea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Saviani et al. (2012) ao analisar a histologia de fígado em avestruz verificaram a presença ramos da arteríola hepática, ramos da vênula porta-hepática, vasos linfáticos e ductos bilíferos, e as vênulas hepáticas terminais, vasos linfáticos e ductos bilíferos distribuídos uniformemente por todo o órgão.

Histologicamente o fígado é composto basicamente por hepatócitos, os quais apresentam forma poligonal, dispostos radialmente no lóbulo hepático e são agrupados em placas que se interconectam por meio de junção comunicante do tipo *gap*. Entre essas placas encontra-se um espaço ao qual contêm capilares denominados sinusóides, que são vasos que permitem contato e troca de nutrientes com os hepatócitos, aos quais também mantêm contato entre si (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As funções metabólicas do fígado são extensas, em que uma delas é a participação no metabolismo de carboidratos, proteínas, gorduras, hormônios, e formação da bile (GÜRTLER, 1987).

2.8 Células sanguíneas

A avaliação hematológica e de leucócitos é um instrumento importante que permite diagnosticar possíveis doenças em estado precoce e avaliar o estado de saúde de populações. Para isso utilizam muitas técnicas, dentre as quais a contagem diferencial de leucócitos que se baseia na contagem de leucócitos pelo esfregaço sanguíneo ao microscópio, os diferenciando pela morfologia celular.

No sangue há ocorrência de três tipos principais de células: os eritrócitos, trombócitos e leucócitos. Os leucócitos são classificados em glanulócitos, ou seja, apresentam grânulos específicos em seu citoplasma e apresentam núcleo de forma irregular, e em agranulócitos, que são os leucócitos que não apresentam grânulos em seu citoplasma e o núcleo apresenta forma regular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; CAPITELLI; CROSTA, 2013).

Nas aves, dentre os granulócitos estão os heterófilos, eosinófilos e basófilos. Os heterófilos estão envolvidos na resposta inflamatória tendo a função correspondente aos neutrófilos em mamíferos (TELL et al., 1997). E

morfologicamente apresenta-se como célula arredondada, núcleo contendo de dois a três lobos pouco corados, com citoplasma claro com presença de grânulos fusiformes em forma de bastão ou ovais, com corpos refringentes central e eosinofílicos intensos (CAPITELLI; CROSTA, 2013).

Os eosinófilos em aves ainda não possuem sua função definida, suspeita-se que participem de processos inflamatórios em resposta a infecções parasitárias em determinadas espécies. Caracterizam-se por apresentar citoplasma mais basófilo com núcleo lobulado e basófilo e grânulos eosinofílicos corados intensamente com forma mais arredondada (CAPITELLI; CROSTA, 2013) e não apresentam o corpo refringente central como analisado nos heterófilos (CLARK; BOARDMAN; RAIDAL, 2009).

A função dos basófilos ainda é questionável, supostamente estejam relacionados na participação em inflamações agudas (MITCHELL; JOHNS, 2008). Apresentam grânulos de cor azul intensa, de tal modo que não se consegue visualizar o núcleo, que apresenta morfologia redondo ou oval e não lobado (CAPITELLI; CROSTA, 2013).

Dentre os agranulócitos encontram-se os linfócitos, de modo geral, estão envolvidos na defesa do organismo. Podem ser classificados em dois tipos principais, linfócito T ou linfócito B, de acordo com o lugar onde diferenciam e receptores que compõe a membrana (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

São compostos por células redondas, podendo apresentar margem irregular, com o núcleo grande central ou ligeiramente excêntrico, com cromatina altamente densa e condensada (MITCHELL; JOHNS, 2008). O citoplasma é basofílico e homogêneo sem vacuolização e sem área extensa em torno do núcleo (CAPITELLI; CROSTA, 2013).

Os monócitos apresentam citoplasma abundante, com presença de vacúolos e basófilo e pequenos grânulos eosinofílicos. O núcleo é redondo, oval ou lobulado, e cromatina menos condensada (MITCHELL; JOHNS, 2008).

CAPÍTULO 1

**HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA DE DUODENO E MAGNO DE
CODORNAS JAPONESAS SUPLEMENTADAS COM ZINCO ORGÂNICO E
COBRE.**

RESUMO

Este trabalho objetivou de avaliar os efeitos da suplementação de codornas japonesas com zinco orgânico e cobre, nos parâmetros histomorfométricos de duodeno e magno. Foram usadas 480 codornas japonesas com 180 dias, distribuídas ao acaso, em fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos, com dez repetições e oito animais por unidade experimental, suplementadas com rações com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) por 84 dias. Cinco aves por tratamento foram eutanasiadas, coletado duodeno e magno, que foram processados histologicamente e coradas com HE para avaliação histomorfométrica, e PAS em duodeno para contagem de células mucosas. Os dados de duodeno foi submetido a técnica de ordenação por análise de componentes principais (ACP) e análise de agrupamentos (AA), e para ambos os órgão avaliados foi utilizada a análise de distribuição dos dados e a análise de variância com Kruskal Wallis e teste *a posteriori* Dunn. Os resultados demonstraram que a concentração de 50 mg de zinco orgânico influenciou em características histológicas importantes tanto para duodeno quanto para magno. Em duodeno foi observado aumento da altura e diminuição da largura das vilosidades intestinais, aumento de células caliciformes. Em magno houve aumento da altura do epitélio do magno. A concentração de 3,5 mg de cobre influenciou em maiores vilosidades intestinais. Não houve interferência significativa do cobre na altura do epitélio do magno. Assim demonstrando que a suplementação de zinco orgânico e cobre influenciaram na altura dos parâmetros analisados, devido possivelmente a participação indireta desses mineirais em processos relacionados divisão celular e produção de proteínas.

Palavras-chave: análise morfométrica; nutrição animal; suplementação mineral

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of supplementation of Japanese quail with organic zinc and copper, the morphometric parameters of the duodenum and magnum. Were used 480 Japanese quail with 180 days, distributed at random, in a factorial 3x2, totaling six treatments, with ten repetitions and eight animals per experimental unit, supplemented diets with three levels of organic zinc (35, 50 and 65 mg / kg) and two levels of inorganic copper (3.5 and 5 mg / kg) for 84 days. Was euthanized five birds for treatment , collected duodenum and magnum, which were histologically processed and stained with hematoxylin-eosin for histomorphometric evaluation, and PAS in duodenum mucous cell count. The duodenum data was subjected to technique by principal component analysis (PCA) and cluster analysis (AA), and both the evaluated organ was used data distribution analysis and analysis of variance Kruskal Wallis and test Dunn, retrospectively . The results showed that 50 mg of organic zinc in major histological features influenced both the duodenum and to the magnum. In the duodenum it was observed increase in height and decrease the width of the intestinal villi, increased goblet cells. In magnum was increased epithelial height. The concentration of 3,5 mg of copper influenced in larger intestinal villi. No significant interference from the copper at the height of the epithelium magnum. Thus demonstrating that supplementation of organic zinc and copper influenced the height of the parameters analyzed, possibly due to indirect ownership of these minerals in processes related cell division and protein production.

Keywords: morphometric analysis; animal nutrition; mineral supplementation

1. INTRODUÇÃO

O uso da suplementação de minerais orgânicos em aves domésticas tem por finalidade otimizar o aproveitamento desses nutrientes na absorção para resposta positiva na saúde animal que reflete em maior produção e produtos de melhor qualidade.

Sabe-se que dentre os minerais, o zinco e o cobre são envolvidos indiretamente em diversos processos metabólicos importantes. Para avaliação da ação desses minerais no organismo a análise histomorfométrica é ferramenta interessante e eficaz ao fornecer informações quantitativas referentes a resposta do animal ao ser submetido a algum teste de suplementação.

Sabe-se que o duodeno é porta de entrada de nutrientes para a corrente sanguínea. Nessa porção do intestino ocorre a absorção dos minerais e água. Por meio deste órgão os minerais são fornecidos ao organismo a fim de serem utilizados nos processos metabólicos. Além de ter grande importância na absorção de nutrientes, a avaliação quantitativa e qualitativa das vilosidades intestinais é relevante, pois possibilita ter resposta confiável sobre a capacidade digestiva e absorviva, assim como possibilita a detecção de possíveis danos causados por agentes exógenos.

Em aves poedeiras, como a codorna japonesa, boa parte dos nutrientes absorvidos no duodeno são destinados à produção de componentes dos ovos, como a clara do ovo ou albúmen. O magno é uma região longa do oviduto, também conhecida como região albumífera, importante por produzir e secretar proteínas necessárias à composição do albúmen, como a albumina, mucina e minerais.

Portanto considerando a importância da avaliação de possíveis mudanças nos padrões histológicos de determinados órgãos por meio da ação dos componentes orgânicos sobre a absorção e metabolização no organismo, visou-se neste trabalho analisar histomorfometricamente o duodeno e magno de codornas japonesas com a finalidade de avaliar a suplementação de zinco orgânico e cobre.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Dados experimentais

O experimento foi desenvolvido na área experimental de Rive, Alegre-ES, no setor de Avicultura, da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram usadas 480 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), com 180 dias e com 180 g \pm 21,2.

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 3x2 com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) perfazendo seis tratamentos, dez repetições e oito animais por unidade experimental (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Composição da ração de cada tratamento com os níveis de zinco orgânico e cobre para suplementação de codornas japonesas.

Tratamento	Composição
Zn35/Cu3,5	35 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn50/Cu3,5	50 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn65/Cu3,5	65 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn35/Cu5	35 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre
Zn50/Cu5	50 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre
Zn65/Cu5	65 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre

As aves foram distribuídas por peso corporal e, após 15 dias de controle de produção de ovos, foi feita a distribuição pela produção de ovos, de forma a padronizar distribuição por peso corporal e taxa de postura.

O fornecimento de ração foi feito duas vezes por dia, sempre às 08hs:00min e às 16hs:00min durante 84 dias. Nesse período a temperatura e umidade relativa do ar foram mensuradas diariamente.

Ao fim do período experimental foram eutanasiadas cinco aves por tratamento, segundo a resolução nº 1000 de 2012, por deslocamento cervical, sob aprovação do CEUA.

2.2 Análise histomofométrica de duodeno e magno

Após a eutanásia, foram coletadas amostras da porção inicial do duodeno e da porção mediana do magno. Estas amostras foram fixadas em formol tamponado 10% e mantidas em geladeira por no mínimo 24 horas. Em seguida, as amostras de duodeno e magno foram processadas histologicamente e incluídas em blocos de parafina. Estes foram seccionados com 5 μm de espessura e colocados em lâminas para coloração.

As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina para análise morfométrica, realizada com auxílio do microscópio Leica DM750 equipado com câmera fotográfica Leica ICC50 HD acoplada ao computador. As imagens foram obtidas e medidas com auxílio do software LAS EZ 3.0 da Leica. Em duodeno foram aferidas: altura (AV) e largura das vilosidades (LV) do duodeno, profundidade das criptas (PC) e altura da musculatura (AM) (Figura 1.1). Com estes dados foi calculada a relação entre largura e altura da vilosidade (LV/AV) e a relação entre profundidade da cripta e altura da vilosidade (PC/AV).

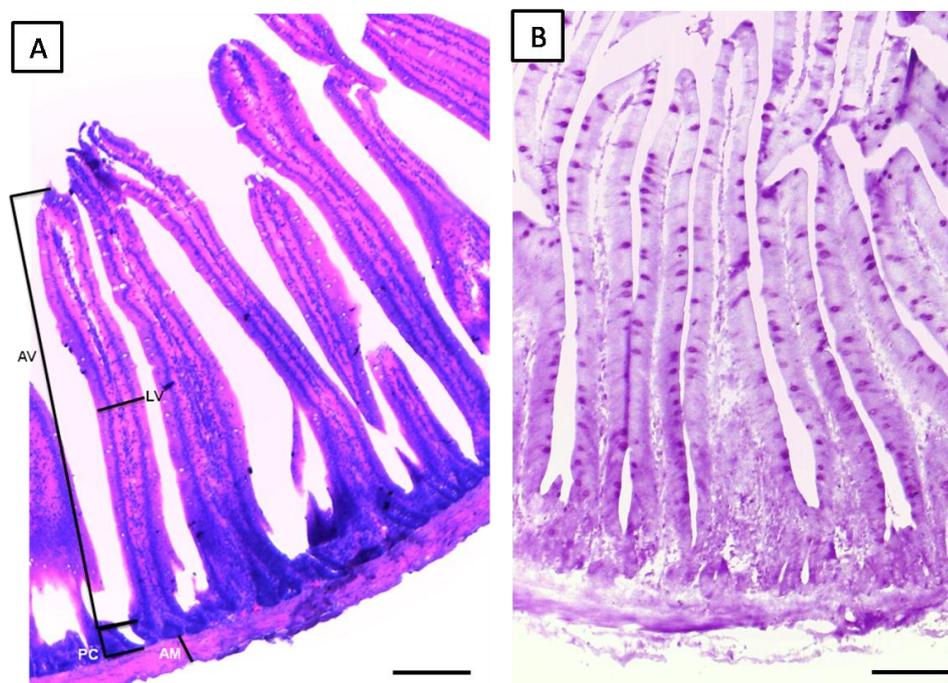


Figura 1.1 - Fotomicrografia do duodeno com (A) a indicação das medidas aferidas na análise histomorfométrica e (B) células mucosas identificadas por técnica de PAS. Alegre-ES. 2016. Barra=100 μm . AM= altura da musculatura; AV= altura da vilosidade; LV= largura da vilosidade; PC= profundidade da cripta. FONTE: arquivo pessoal.

Para quantificação das células mucosas do duodeno, as amostras foram submetidas à técnica de PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) e posterior contagem das células mucosas (CM), marcadas em rosa (Figura 1.1B), sob microscópio de luz. Para padronizar a quantificação foi realizada a contagem de células mucosas presentes em 10 μm de epitélio da vilosidade do duodeno, sendo esta extensão selecionada aleatoriamente.

A histomorfometria do magno foi analisada em 20 campos por lâmina, a fim de aferir a altura do epitélio do magno. Para manter o padrão foram coletadas medidas do epitélio do magno localizado na região lateral de cada prega, totalizando 100 campos por tratamento (Figura 1.2).

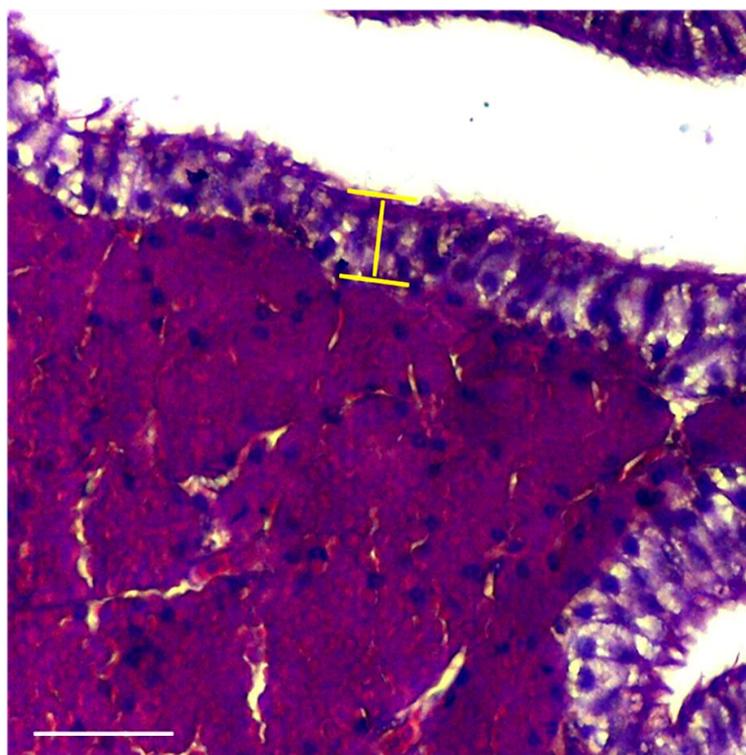


Figura 1.2 – Fotomicrografia do magno com a medição da altura do epitélio pseudoestratificado do magno indicado pela barra amarela. Alegre-ES. 2016. Barra = 50 μm . Fonte: arquivo pessoal

2.3 Análise estatística

Com a finalidade de identificar os parâmetros das vilosidades do duodeno mais significativos, foi utilizada a técnica de ordenação análise de componentes principais (ACP), por meio dos componentes principais (MINGOTI, 2007). Para

utilizar esta técnica não é requisito a pressuposição da normalidade da distribuição dos dados.

Após a seleção dos parâmetros mais representativos em relação à variância total na análise de componentes principais, foi realizada análise de agrupamento, a fim de obter grupos de tratamentos mais semelhantes quanto aos parâmetros analisados. A análise de agrupamento tem como objetivo dividir os elementos da amostra, ou população, em grupos de forma que os elementos pertencentes ao mesmo grupo sejam similares entre si em relação aos parâmetros que neles foram medidos, e os elementos em grupos diferentes sejam heterogêneos em relação a estes mesmos parâmetros (MINGOTI, 2007). Foi utilizado o método de agrupamento hierárquico aglomerativo, cujo dendrograma foi obtido utilizando como medida de dissimilaridade a distância euclidiana e como método de ligação o método de Ward, que não pressupõe normalidade dos dados.

Para analisar qual dos minerais estudados influenciou nos parâmetros histológicos das vilosidades do duodeno e do epitélio do magno, foi realizada a análise de distribuição dos dados e posterior análise de variância com Kruskal Wallis e teste *a posteriori* Dunn, utilizando-se o Programa BioEstat®.

3. RESULTADOS

A estatística descritiva originou os dados de médias das variáveis mensuradas nas vilosidades do duodeno (Tabela 1.3).

Os dados de média das variáveis analisadas foram utilizados para a análise de componentes principais. Esta resultou nos autovalores, na explicação da variância dos componentes principais, e na correlação entre as componentes principais dos parâmetros analisados nas vilosidades do duodeno de codornas japonesas (Tabela 1.4).

Tabela 1.2 - Médias e desvio padrão dos parâmetros histomorfológicos das vilosidades do duodeno de codornas japonesas suplementadas com diferentes níveis de zinco orgânico e cobre.

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS		
	Cu5		
	Zn35	Zn50	Zn65
AV (m μ)	497,3 \pm 83,8b	567,2 \pm 116,6a*	540,4 \pm 127,7ab
LV (m μ)	69,5 \pm 8,6	73,7 \pm 9,2	68,3 \pm 16,3*
PC (m μ)	47,7 \pm 11,5a*	41,4 \pm 13,6b*	54,7 \pm 16,7a
AM (m μ)	49,1 \pm 14,6a*	35,9 \pm 9,7b*	54,4 \pm 23,9a*
CM	25,7 \pm 15,7ab	26,8 \pm 11,9b	21,1 \pm 14,1a*
AV/PC	11,69 \pm 3,14b	14,55 \pm 5,47,8a	10,38 \pm 3,85b
LV/AV	0,137 \pm 0,036	0,137 \pm 0,039*	0,138 \pm 0,056
	Cu3,5		
	Zn35	Zn50	Zn65
AV (m μ)	505,4 \pm 169,9b	635,4 \pm 149,6a	547,1 \pm 133,4b
LV (m μ)	73,5 \pm 12,7ab	68,0 \pm 12,3b*	74,3 \pm 13,7a
PC (m μ)	65,6 \pm 26,1	56,1 \pm 13,7	53,3 \pm 16,6
AM(m μ)	61,6 \pm 14,0a	52,5 \pm 13,7b	67,0 \pm 23,8a
CM	23,5 \pm 10,8	29,4 \pm 16,3	27,3 \pm 12,4
AV/PC	9,18 \pm 3,25b*	11,94 \pm 4,04a*	11,22 \pm 4,03ab
LV/AV	0,153 \pm 0,055b	0,114 \pm 0,039a	0,140 \pm 0,042b

Letras diferentes na mesma linha representam tratamentos significativamente diferentes ($p < 0,05$), quando comparada a mesma variável em concentrações de ZINCO diferentes.

*tratamento significativamente menor ($p < 0,05$), quando comparada a mesma variável em concentrações de COBRE diferentes.

Tabela 1.3 - Resultados da análise de correlação entre os componentes principais dos parâmetros mensurados no duodeno de codornas japonesas suplementadas com diferentes concentrações de zinco orgânico e cobre.

Componentes	CP 1	CP 2
Autovalor	3,523	1,852
Var. ¹ (%)	50,335	26,456
Var. acum. ² %	50,335	76,791
Variáveis		
Altura da vilosidade	0,725	-0,547
Largura da vilosidade	-0,257	0,615
Profundidade da cripta	-0,722	-0,599
Altura do músculo	-0,709	-0,473
Células mucosas	0,698	-0,201
AV/PC	0,888	0,449
LV/AV	-0,796	0,592

¹ Variância explicada; ² Variância acumulada; CP1 componente 1; CP2 componente 2; AV/PC= razão altura da vilosidade/profundidade da cripta; LV/PC= razão largura da vilosidade/altura da vilosidade

Segundo Regazzi (2000) citado por Varella (2008), as variáveis mais representativas em análise de componentes principais apresentam variância acumulada maior que 70%. Assim, no presente estudo, foram necessários apenas 2 componentes principais para explicar a representatividade das variáveis (Tabela 1.4).

Zwick e Velicer (1982) estabeleceram que os parâmetros mais representativos são aqueles com correlação acima de 0,7 ou abaixo de -0,7. Portanto, o componente 1 foi fortemente correlacionado com a maioria das variáveis (Tabela 1.4).

A ACP demonstrou a correlação entre as variáveis, e os tratamentos com as variáveis (Figura 1.3). Observa-se que houve correlação positiva entre as variáveis AV e CM, e correlação negativa entre LV/AV e LV; e entre AM e PC. Os tratamentos Zn50/Cu5 e Zn50/Cu3,5 apresentaram maior correlação com as variáveis analisadas, sendo o tratamento Zn50/Cu5 positivamente correlacionado com o parâmetro AV/PC e inversamente correlacionado com os parâmetros AM e PC. O tratamento Zn50/Cu3,5 apresentou correlação positiva com AV e CM e correlação negativa com LV/AV e LV.

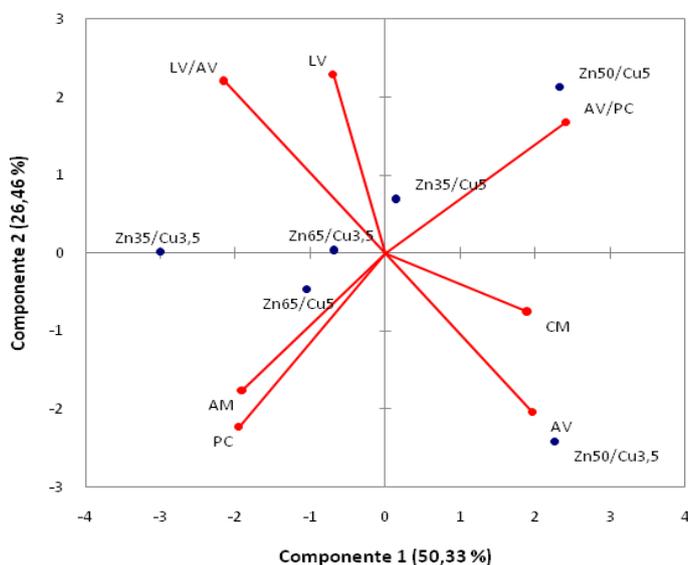


Figura 1.3 - Gráfico com a projeção dos parâmetros mensurados nas vilosidades do duodeno de codornas japonesas.

A análise para verificar quais destes tratamentos são mais similares baseados na variação dos parâmetros observados, aplicou-se a análise de agrupamento que gerou o dendograma pelo método de ligação de Ward (Figura 1.4).

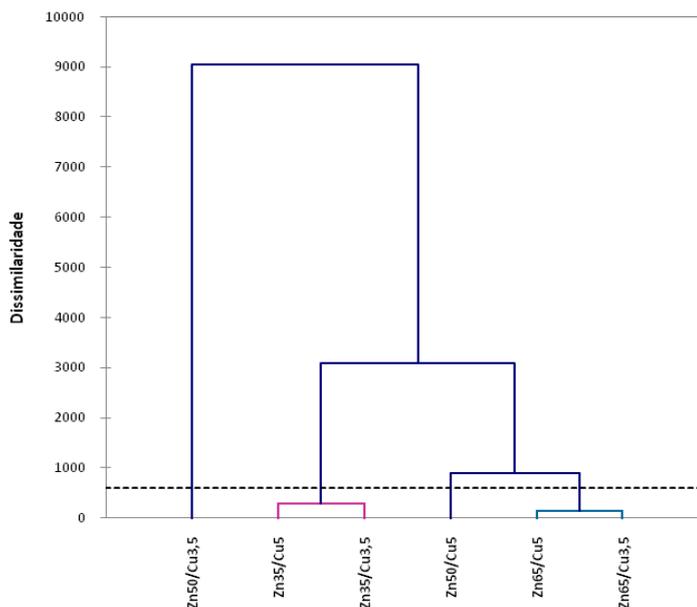


Figura 1.4 - Dendrograma de agrupamento dos tratamentos de zinco orgânico e cobre.

A análise demonstrou que o Zn50/Cu3,5 é o tratamento com menor dissimilaridade em relação aos demais. Observa-se que o tratamento Zn50/Cu3,5 foi o mais isolado ao comparar a dissimilaridade deste com os demais tratamentos.

O epitélio do magno analisado demonstrou revestimento pseudoestratificado colunar com células ciliadas alternando-se com células secretoras não ciliadas. Observa-se que o zinco orgânico influenciou uma maior média de altura do epitélio do magno ao ser analisado dentro das mesmas concentrações de cobre (Figura 1.5).

Tabela 1.4 - Média da altura do epitélio do magno em codornas suplementadas com zinco orgânico e cobre.

Tratamento	Altura do epitélio do Magno (m μ)
Zn35/Cu3,5	8,94 \pm 1,26 ^b
Zn50/Cu3,5	9,35 \pm 0,75 ^a
Zn65/Cu3,5	8,69 \pm 1,19 ^{bA}
Zn35/Cu5	8,86 \pm 1,38 ^d
Zn50/Cu5	9,66 \pm 1,42 ^c
Zn65/Cu5	7,83 \pm 1,57 ^{eB}

Letra minúscula diferentes = média da altura do epitélio significativamente diferente quando comparado ao mesmo nível de cobre.

Letra maiúscula diferente = média da altura do epitélio significativamente diferente quando comparado ao mesmo nível de zinco orgânico.

Especificamente a concentração de 50 mg de zinco orgânico apresentou maior média, seja comparado entre os tratamentos no nível de 3,5 de cobre, com média de $9,35 \pm 0,75$, seja comparado entre os tratamentos no nível de 5 mg de cobre, com média de $9,66 \pm 1,42$. Com exceção entre os tratamentos Zn65/Zn3,5 e Zn65/Cu5, não foi observada a influência do cobre na altura do epitélio do magno.

4. DISCUSSÃO

As vilosidades intestinais das codornas avaliadas demonstraram projeções alongadas da mucosa em direção ao lúmen do intestino delgado. Observou-se a presença de criptas entre os vilos, as quais são pequenas aberturas de glândulas tubulares, onde também são encontradas células-tronco, células caliciformes e absortivas. Estas duas últimas fazem parte da composição dos vilos, sendo que as células caliciformes, em menor quantidade, produzem glicoproteínas ácidas do tipo mucina, que protegem e lubrificam o revestimento intestinal, enquanto as células absortivas, são colunares altas com núcleo basal, as quais são importantes no processo de absorção de moléculas produzidas durante a digestão, assim como na produção de enzimas que auxiliam nesse processo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Foi observada a presença de duas camadas de músculo liso, que se diferem pela orientação das fibras, a mais interna é composta por fibras circulares e a externa por fibras longitudinais. Envolvendo toda estrutura intestinal foi observada a camada serosa, a qual é uma camada delgada composta por tecido conjuntivo e revestida por mesotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As variáveis positivamente correlacionadas (AV, CM e AV/PC) demonstram que o comportamento de variação é diretamente proporcional, ou seja, com o aumento da altura da vilosidade também aumentou o número de células mucosas e a relação AV/PC.

Essas características são essenciais na absorção de nutrientes. De acordo com Boleli et al. (2002), as vilosidades possibilitam um aumento da superfície interna do órgão, proporcionando maior área de digestão e favorecendo a absorção. Macari (1999) afirma que a capacidade de absorção é diretamente proporcional ao tamanho da vilosidade intestinal.

No presente trabalho foi observado aumento proporcional da altura da vilosidade e do número de células mucosas, as quais são secretoras de glicoproteínas, e apresentam o papel de proteger a mucosa intestinal da ação de enzimas digestivas, além de atuar como barreira de proteção à ação de patógenos (BOLELI; MAIORKA; MACARI, 2002). Portanto, ao proporcionar aumento no número de células mucosas possibilita um aumento na defesa da mucosa intestinal e conseqüentemente melhor absorção.

As variáveis correlacionadas negativamente (LV, LV/AV, PC, AM) apresentaram um comportamento de variação diretamente proporcional entre si e inversamente proporcional às variáveis correlacionadas positivamente. Uma largura da vilosidade mais estreita possibilita que a vilosidade alcance alturas maiores, como demonstrado na relação LV/AV (Tabela 1.3). Segundo Kisielinski et al. (2002) quanto menor for a relação entre largura e altura da vilosidade intestinal maior é a área de absorção de nutrientes.

A variável PC determina, segundo Pluske et al. (1997), a função proliferativa da vilosidade intestinal para garantir uma taxa de renovação epitelial adequada. Para Furlan et al. (2004) uma cripta mais profunda é indicativo de uma alta proliferação celular, que visa renovar a perda da altura da vilosidade por conta de possíveis injúrias. No presente estudo, a profundidade da cripta foi inversamente proporcional à AV e AV/PC, mostrando que quanto menor a profundidade de cripta, maior a altura da vilosidade e da relação entre estes parâmetros. Isso demonstra que as vilosidades estudadas não necessitavam de renovação celular aumentada, ou seja, não estavam sob efeito de maiores injúrias.

Observa-se que as variáveis PC e AM se correlacionaram fortemente. A camada muscular do duodeno, composta por músculo liso, tem importância na movimentação rítmica do mesmo, o qual é importante no processo de digestão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A cripta se apoia sobre a musculatura intestinal, sugerindo que esta deve ter uma espessura proporcional a cripta para dar a sustentação e movimento necessário para o processo de digestão, o que explica a correlação existente entre elas.

O magno das codornas japonesas apresentou epitélio de revestimento pseudo-estratificado ciliado, com a alternância de células secretoras e células ciliadas, assim como observado por Moraes et al. (2007). Este é composto por uma camada de células com núcleos em alturas diferentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO,

2008).

A presença de um epitélio pseudo-estratificado indica que o magno tem a função de proteção, secreção, por meio das células secretoras existentes, e transporte, por conta da presença de cílios, os quais são importantes na realização de movimento para permitir a passagem do ovo em formação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A maior altura do epitélio do magno conferida pelos tratamentos de 50 mg de zinco orgânico são importantes para um órgão ao realizar movimentos peristálticos, uma vez que fornece maior resistência e proteção as glândulas tubulares do magno (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Além disso, um epitélio mais alto, aumenta a capacidade de produção de secreção, que irá melhorar a lubrificação, ao qual auxiliará o ovo em formação, e na composição do mesmo, ao adicionar mucina, especificamente a ovomucina, uma glicoproteína ácida, produzida pelas células caliciformes do magno, a qual é responsável pela viscosidade do albúmen (GARCÍA, 2010).

A concentração de 50 mg de zinco orgânico favoreceu no desenvolvimento de características histomorfométricas que proporcionam maior absorção, no caso de duodeno, assim como secreção e proteção. A recomendação de zinco inorgânico para suplementação de aves pela Nutrient Requirements of Poultry (1994) é de 50 mg, o que está em conformidade com os resultados demonstrados para zinco orgânico nas análises histomorfométricas do duodeno de codornas realizadas neste estudo.

Para cobre, ambas as concentrações apresentaram influência sobre os parâmetros analisados em cada órgão. Em duodeno foi observado que a concentração 3,5 mg influenciou em uma menor largura da vilosidade e uma menor relação AV/PC, aos quais são importantes indicativos para maior absorção. Em contrapartida o recomendado por Nutrient Requirements of Poultry (1994) é 5mg de cobre para codornas.

Sabe-se que o zinco e o cobre são minerais essenciais para o organismo e tem ampla participação nos processos metabólicos. Dentre eles está a participação na composição de enzimas essenciais nos processos de transcrição e tradução. Logo provavelmente o zinco e cobre influenciaram indiretamente no aumento de síntese celular, proporcionando o aumento de células produtoras de muco, assim como no aumento de enterócitos que refletiu em vilosidades maiores, e no aumento

da altura do epitélio do magno, que por sua vez aumentou a produção de proteínas importantes como a mucina para composição da clara do ovo.

5. CONCLUSÃO

Por meio das análises histomorfométricas pode-se concluir que os níveis de 50 mg de zinco orgânico proporcionaram melhores condições histomorfométricas tanto para duodeno, principalmente quando combinado com a concentração 3,5 mg de cobre, quanto para magno, que influenciou em maior altura do epitélio pseudo-estratificado.

6. REFERÊNCIAS

- AMMERMAN, C.B.; HENRY, P.R.; MILES, R.D. Supplemental organically bound mineral compounds in livestock nutrition. In: GAMSWORTHY, P. C.; WISEMAN, J. (Eds.) **Recent advances in animal nutrition**. Nottingham: University Press; p.67-91, 1998.
- BAKER, D.H.; AMMERMAN, C. B.; LEWIS, A.J. Zinc bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. P.; LEWIS, A. J. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, and vitamins**. 1995, p.367-398.
- BAKER, D.H.; AMMERMAN, C.B.; LEWIS, A.J. Copper bioavailability In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. P.; LEWIS, A. J. **Bioavailability of nutrients for animals: amino acids, minerals, and vitamins**. 1995, p.127-156.
- BOLELI, I.C.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Estrutura Funcional do Trato Digestório. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Editora FUNEP: Jaboticabal, São Paulo. p.75-92. 2002.
- CAO, J.; HENRY, P.R.; GUO, R.; . HOLWERDA, R.A.; TOTH, J.P.; LITTELL, R.C.; MILES, R.D.; AMMERMAN, C.B. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2039–2054, 2000.
- CLYDESDALE, F.M. Mineral interactions in foods. In: BODWELL, C.E.; ERDMAN, J. W.Jr. **Nutrients Interactions**. New York: Marcel Dekker, p.257-268, 1998.
- GARCÍA, J. La Calidad del huevo. IN: LLOBET, J.A.; COS, J.I.; LAJUSTICIA, A.C.; CALVET, S., CAMBRA-LÓPEZ, M.; ESTELLÉS, F., **Producción del Huevos**. Barcelona, Espanha: Real Escuela de Avicultura, 2ª ed., p.381-403, 2010.
- GOMIDE-JUNIOR, M.L; STERZO, E.V.; MACARI, M.; BOLELI, I.C. Use of scanning electron microscopy for the evaluation of intestinal epithelium integrity. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p.1500-1505, 2004.
- GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. **Princípios de estatística em ecologia**. Artmed, 2011. 532p.
- LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Commercial poultry nutrition**. Ontario: University Books, 2005. 398p.
- MAIORKA, A.; MACARI, M. Absorção de minerais. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. Jaboticabal: UNESP; FUNEP, p.167-173, 2002.
- MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 295p.

NRC, National Research Council. **Nutrients Requeriments of Poultry**. 9. ed. National Academic Press, Washington D.C.: 1994. 155p.

PIMENTEL, J.L.; COOK, M.E.; GREGER, J.L. Research note: Bioavailability of zinc-methionine for chicks. **Poultry Science**, v.70, n.7, p.1637-1639, 1991.

OWENS, B.; MCCANN, M. E. E.; PRESTON, C. The effect of substitution of inorganic zinc with proteinated or chelated zinc on broiler chick performance. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 4, p. 789-794, 2009.

REGAZZI, A. J. **Análise multivariada, notas de aula INF 766**, Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 2000.

ROSA, G.A.; SORBELLO, L.A.; DITTRICH, R.L.; MORAES, M.T.T.; OLIVEIRA, E.G. Perfil hematológico de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) sob estresse térmico. **Ciência Rural**, v.41, n.9, p.1605-1610, 2011.

SOARES, L.A.S.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Ed. da Universidade UFPEL, 2005. 138p.

VARELLA, C.A.A. Análise de componentes principais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/varella/Downloads/multivariada%20aplicada%20as%20ciencias%20agrarias/Aulas/analise%20de%20componentes%20principais.pdf>.
Acessado em: 12 de Outubro 2015.

ZWICK, W.R.; VELICER, W.F. Factors influencing four rules for determining the number of components to retain. **Multivariate behavioral research**, v.17, n.2, p.253-269, 1982.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE HISTOLÓGICA EM FÍGADO E HISTOMORFOMETRIA DO PÂNCREAS DE CODORNAS JAPONESAS SUPLEMENTADAS COM ZINCO ORGÂNICO E COBRE

RESUMO

Por meio da histologia de fígado e histomorfometria de pâncreas e ilhotas pancreáticas, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação em codornas japonesas com zinco orgânico e cobre. Foram usadas 480 codornas japonesas com 180 dias distribuídas inteiramente ao acaso, em fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos, com dez repetições e oito animais por unidade experimental. As codornas foram suplementadas com rações com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) por 84 dias. Ao final, foram eutanasiadas cinco aves por tratamento para coleta de fígado e pâncreas, que foram processadas histologicamente e coradas com HE para análise morfológica com software ImageJ. Os dados foram submetidos a análise de variância com Kruskal Wallis e teste *a posteriori* Dunn, e posterior análise de correlação de Spearman. Não houve diferença significativa quanto a influência do zinco orgânico e cobre na lipidose hepática, assim como a relação da área total de ilhotas pancreáticas pela área total do pâncreas. Não houve correlação significativa entre os dados dos órgãos analisados. No entanto foi analisado um comportamento inverso entre eles, em que o tratamento com maior área de ilhotas pancreáticas, apresentaram menor grau de lipidose hepática. Portanto os níveis de zinco orgânico e cobre não influenciaram na histologia de fígado e histomorfometria de pâncreas.

Palavras-chave: histologia; hormônio pancreático; lipídeo hepático

ABSTRACT

Through histology of liver and histomorphometry of the pancreas and pancreatic islets, aimed evaluate the effects of supplementation in Japanese quail with organic zinc and copper. They were used 480 Japanese quails with 180 days distributed completely randomized in factorial 3x2, totaling six treatments, with ten repetitions and eight animals each. The quails were supplemented with diets with three levels of organic zinc (35, 50 and 65 mg / kg) and two inorganic copper levels (3.5 and 5 mg / kg) for 84 days. At the end, five birds for treatment was eutanasiada to collect liver and pancreas which were histologically processed and stained with hematoxylin-eosin for morphometric analysis with ImageJ software. Data were subjected to analysis of variance with Kruskal Wallis test and Dunn post, and after Spearman correlation analysis. There was no significant difference in the influence of organic zinc and copper in the degree of analyzed lipids, as well as the ratio of total area of islet by the total area of the pancreas. There was no significant correlation between the data of the organs analyzed. However an inverse behavior was analyzed between them, wherein the treatment with the largest area of pancreatic islets showed a lesser degree of liver lipidosis. Therefore the organic zinc and copper levels do not affect the histology of liver and pancreas histomorphometry.

Keywords: histology; liver lipid; pancreatic hormone

1. INTRODUÇÃO

A suplementação de microminerais na dieta de poedeiras é essencial para fornecer nutrientes necessários para os processos metabólicos do organismo animal.

Dentre os minerais mais importantes encontra-se o zinco, seguido do cobre. Estes são essenciais na composição de metalo-enzimas que participam de processos metabólicos importantes do organismo. Segundo Underwood (1999) o cobre só é superado pelo zinco em número de enzimas que ativa.

Ambos minerais apresentam importância em processos que ocorrem no fígado e pâncreas. O cobre sofre dois processos no fígado, pode se ligar a glutathione e em seguida na metalotionina que pode ser destinado a secreção biliar, síntese de ceruloplasmina, que é uma proteína transportadora, ou é estocado. Por meio de estudos *in vitro* foi observado que o zinco influencia na solubilidade de insulina, assim como na ligação com seus receptores.

O fígado é essencial por ser responsável pela captação, metabolização, excreção de agentes endógenos e exógenos. O pâncreas produz hormônios e outros componentes essenciais nos processos de digestão e metabolização no fígado. A análise histológica e histomorfométrica de ambos os órgãos é importante para inferir se há interferência estrutural ou injúria em resposta a um componente da dieta ou monitoramento a um tipo tratamento.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a histologia de fígado e histomorfometria do pâncreas e das ilhotas pancreáticas de codornas japonesas suplementadas com níveis de zinco orgânico e cobre a fim de observar se houve a interferência desses minerais na estrutura tecidual e por meio dessas análises inferir sobre a possível interferência desses minerais na dinâmica metabólica do organismo das poedeiras.

2. METODOLOGIA

2.1 Dados experimentais

O experimento foi desenvolvido na área experimental de Rive, Alegre-ES, no setor de Avicultura, da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram usadas 480 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), com 180 dias e com 180 g \pm 21,2.

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 3x2 com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) perfazendo seis tratamentos, dez repetições e oito animais por unidade experimental (Tabela 1.1).

Tabela 2.1 - Composição da ração de cada tratamento com os níveis de zinco orgânico e cobre para suplementação de codornas japonesas.

Tratamento	Composição
Zn35/Cu3,5	35 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn50/Cu3,5	50 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn65/Cu3,5	65 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn35/Cu5	35 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre
Zn50/Cu5	50 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre
Zn65/Cu5	65 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre

As aves foram distribuídas por peso corporal e, após 15 dias de controle de produção de ovos, foi feita a distribuição pela produção de ovos, de forma a padronizar distribuição por peso corporal e taxa de postura.

O fornecimento de ração foi feito duas vezes por dia, sempre às 08hs:00min e às 16hs:00min durante 84 dias. Nesse período a temperatura e umidade relativa do ar foram mensuradas diariamente.

Ao fim do período experimental foram eutanasiadas cinco aves por tratamento, segundo a resolução nº 1000 de 2012, por deslocamento cervical, sob aprovação do CEUA.

2.2 Coleta e preparação histológica

Após a eutanásia das aves foi realizada a coleta das amostras de fígado e pâncreas, que foram fixadas em formol tamponado 10% e mantidas em geladeira por no mínimo 24 horas. Em seguida, as amostras foram processadas histologicamente e incluídas em blocos de parafina. Estes foram seccionados com 5 μm de espessura e colocados em lâminas para coloração. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para análise morfométrica. Esta foi realizada com auxílio do microscópio Leica DM750 equipado com câmera fotográfica Leica ICC50 HD acoplada ao computador. As imagens foram obtidas e medidas com auxílio do software LAS EZ 3.0 da Leica.

2.3 Análise histomorfométrica do pâncreas

Para análise de pâncreas foram identificadas e fotografadas todas as ilhotas pancreáticas presentes no corte histológico de pâncreas. O software ImageJ, foi utilizado para aferir a área total de ilhotas (ATI) presente em cada indivíduo (Figura 2.1).

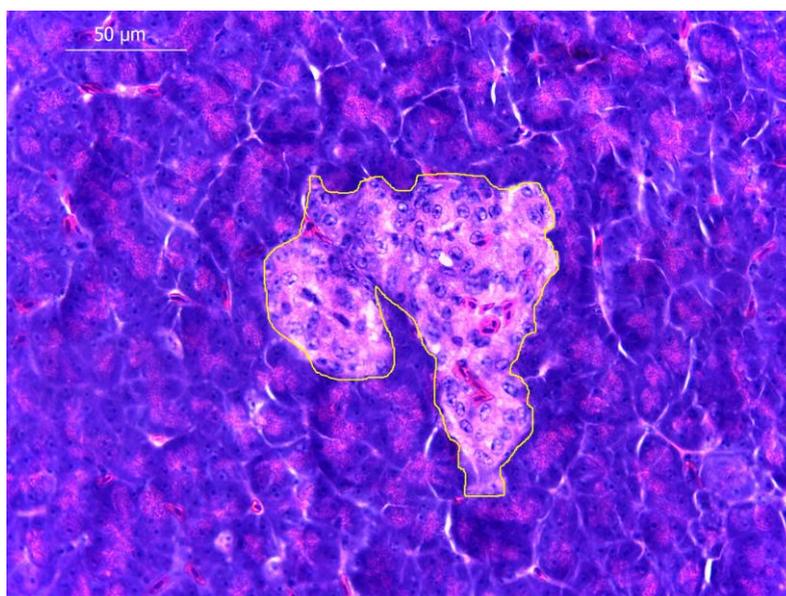


Figura 2.1 – Fotomicrografia da marcação da área da ilhota pancreática do pâncreas de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre. Alegre-ES. Fonte: arquivo pessoal

Em seguida foi medida a área total do pâncreas (ATP) de cada indivíduo a fim de calcular a relação da área de ilhota na área total do pâncreas (RAIP):

$$RAIP = ATI * 1000 / ATP$$

Após ter obtida a RAIP (‰) de cada indivíduo por tratamento, foi calculada a média da porcentagem da RAIP de cada tratamento.

2.4 Análise histológica de fígado

Em fígado foi fotografado 20 campos por indivíduo, sendo 4 campos na vertical e 5 campos na horizontal, todos no aumento 400x. Para estimar a lipidose hepática foi considerada a seguinte classificação para cada um dos 20 campos analisados: (0) campo inalterado, ou seja, ausência de gotículas de lipídeos; (1) campo pouco alterado, quando foi observada a presença de pequenas gotículas de lipídeos; (2) alteração moderada, quando foi analisada a presença de gotículas de lipídeo em tamanho médio; e (3) para gotículas grandes de lipídeo. Em seguida foi feita a média do grau de lipidose hepática para cada indivíduo (GLP_i), onde foi feita a soma da classificação de todos os campos analisados (C_n), dividido pelo total de campos (n), como representado pela fórmula:

$$GLP_i = C_1 + C_2 + \dots + C_n / n$$

Em seguida foi calculada o grau de lipidose hepática total para cada tratamento (GLP_{total}), ao qual foi a média da média do grau de lipidose hepática dos indivíduos (GLP_{in}), de cada tratamento:

$$GLP_{total} = GLP_{i1} + GLP_{i2} + \dots + GLP_{in}$$

2.5 Análise estatística

As médias foram submetidas a análise de distribuição dos dados e posterior análise de variância com Kruskal Wallis e teste *a posteriori* Dunn, a fim de comparar os tratamentos entre si e determinar se houve influência do zinco orgânico ou cobre nos resultados.

Em seguida os dados de RAIP e de grau de lipidose hepática foram submetidos a uma análise de correlação de Spearman. Todas as análises foram realizadas com o software BioEstat®.

3. RESULTADOS

Em fígado foi observada a presença de hepatócitos com núcleos centrais e os capilares sinusóides conforme Junqueira e Carneiro (2008), com presença de gotículas de lipídeo em todos os indivíduos analisados, as quais variaram de tamanho de acordo com o indivíduo e tratamento, diferindo assim no grau da lipidose hepática.

Não houve diferença significativa entre tratamentos quanto ao grau de lipidose hepática (GLP). E não houve diferença significativa quanto a influência do zinco orgânico e cobre no grau de lipidose hepática analisados (Tabela 2.3).

Tabela 2.2 - Grau de lipidose hepática (GLP) e relação da área total de ilhotas pancreáticas pela área total do pâncreas (RAIP) em codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.

	Tratamentos					
	3.5Cu			5Cu		
	35Zn	50Zn	65Zn	35Zn	50Zn	65Zn
RAIP	0,0014	0,0031	0,0026	0,003	0,0034	0,0041
GLP	2,47	2,04	2,07	2,15	1,88	1,74

Em pâncreas, a porção endócrina foi identificada pela presença de agrupamentos de células epiteliais que compõe as ilhotas pancreáticas, segundo Junqueira e Carneiro (2008).

Não foi observada diferença significativa entre tratamentos, assim como a influência de zinco orgânico e cobre, quanto a relação da área total de ilhotas de pancreáticas pela área total do pâncreas (RAIP) (Tabela 2.3).

Não houve correlação entre os dados de lipidose hepática com a relação da área total de ilhotas pancreáticas sobre a área total do pâncreas. No entanto foi observada um comportamento inverso entre essas duas variáveis (Figura 2.2).

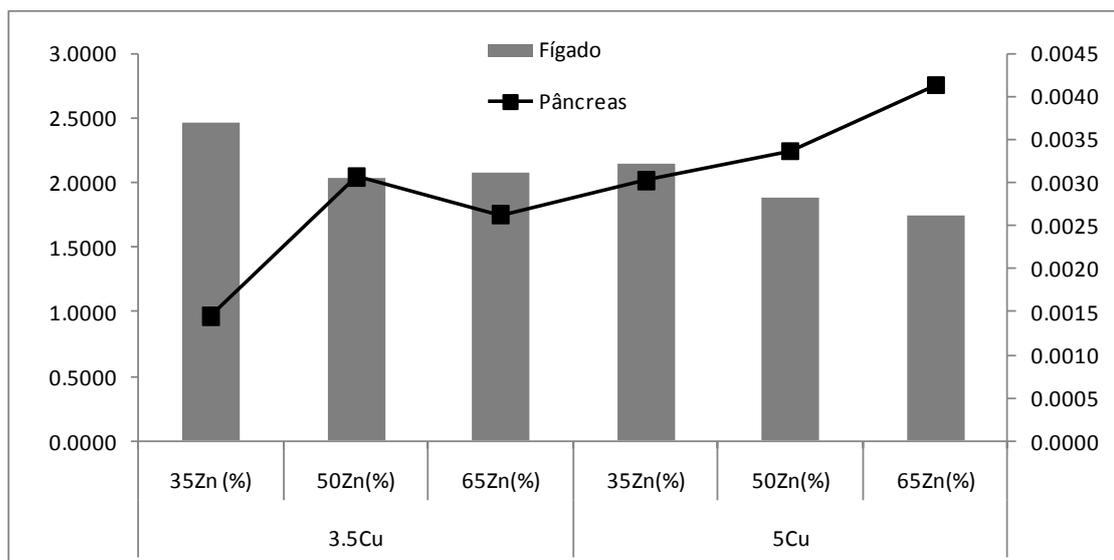


Figura 2.2 - Relação do grau de lipidose hepática e da relação da área total de ilhotas pancreáticas sobre a área do pâncreas de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre.

4. DISCUSSÃO

O acúmulo de gordura no fígado pode ter sido resultante do excesso ou deficiência de proteínas presentes na ração (BRUMANO, 2008) ou por conta da concentração de zinco, que é responsável pelo estímulo da lipogênese (MARREIRO et al., 2004).

O zinco e o cobre agem no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos de maneira indireta por constituírem enzimas que participam do processo (LEESON; SUMMERS, 2001). Além disso, estudos *in vitro* indicam que o zinco pode se ligar a insulina, aumentando a solubilidade deste hormônio nas células beta do pâncreas, assim como aumentar a capacidade de ligação da insulina ao receptor (MARREIRO et al., 2004). No entanto, a nível histomorfométrico, os resultados demonstraram que as concentrações de zinco orgânico e cobre não influenciaram na área total de ilhotas pancreáticas, assim como no grau da lipidose hepática.

Ao analisar conjuntamente com os dados da área total de ilhotas pancreáticas com os graus de lipidose hepática, apesar de não significativo, foi observado um comportamento inverso entre eles, em que no geral, à medida que aumentou a área

total de ilhotas pancreáticas, diminuiu o grau de lipídeos, sendo tal diferença demonstrada de forma nítida e linear nos tratamentos com concentração de 5 mg de cobre.

Pâncreas e fígado são órgãos que funcionam em conjunto na regulação de nutriente e metabolização dos mesmos no organismo. Enquanto o fígado metaboliza, distribui e estoca, os hormônios do pâncreas agem no fígado a fim de direcionar esses produtos finais da digestão (HAZELWOOD, 1999)

As ilhotas pancreáticas são importantes na produção de insulina e glucagon, aos quais são responsáveis pela regulação de glicose, lipídeo e proteínas no organismo animal, principalmente em aves. Assim como em mamíferos, em aves o metabolismo de carboidratos e lipídeos é feito por meio desses dois hormônios, no entanto, especificamente em aves poedeiras, há diferença por conta da influência do glucagon nesse metabolismo (LUMEIJ, 1997).

Já foi observado que a liberação e produção de glucagon pelas ilhotas pancreáticas em aves granívoras são mais elevadas, pois há maior quantidade de células alfa no pâncreas e uma menor proporção insulina:glucagon em relação aos mamíferos (LUMEIJ, 1997). O glucagon inibe o processo de lipogênese, e estimula a lipólise no tecido adiposo (MORITA et al., 1987; MCMURTRY et al., 1996), assim como no fígado (HAZELWOOD, 1999), aumentando a concentração de ácidos graxos no plasma sanguíneo, e no fornecimento de glicose para o processo de transporte.

Logo, baseado nos dados observados, é possível sugerir que houve uma predominância de células alfa, principalmente nos tratamentos de 5 mg de cobre, que ocasionou em maior produção e secreção de glucagon, que por sua vez, inibiu a lipogênese hepática e estimulou a lipólise, diminuindo a concentração de lipídeos no fígado.

Tal interação metabólica em poedeiras é importante para manutenção elevada da concentração de glicose no sangue, a fim de manter a síntese e transporte de lipídeos no organismo, por conta da formação do ovo (SIMON, 1989; COGBURGN, 1991). Sabe-se que a gema do ovo é composta por água, lipídios, proteínas e micro componentes, como vitaminas e minerais. A maioria dos lipídios está sob a forma de lipoproteínas, as quais são produzidas juntamente com as proteínas no fígado (SOUZA-SOARES; SIEWERDT, 2005).

1. CONCLUSÃO

Os níveis de zinco orgânico e cobre não influenciaram na histologia do fígado e histomorfometria do pâncreas das codornas japonesas, assim como na função exercida por ambos no metabolismo. Demonstrando que os níveis de suplementação testados não foram prejudiciais a esses órgãos analisados.

2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BRUMANO, G. Fatores que influenciam as exigências de metionina+cistina para aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, nº 6, p.749-761. 2008.

COGBURN, L.A. Endocrine manipulation of body composition in broiler chicken. **Critical Reviewa Poultry Biology**, v.3, p.283–305, 1991.

HAZELWOOD, R.L. **Pancreas**. In: WHITTOW,G.C. *Sturkies Avian Physiology*. . 5ª ed. Elsevier, 1999, p.685.

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

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. Ontario: University Books, 2001. 591p.

LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In:KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5ª ed. San Diego, Academic Press, 1997. 932p.

MARREIRO et al. Participação do Zinco na Resistência à Insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 48, nº 2, 2004.

MCMURTRY, J. P., W. TSARK, L. COGBURN, R. ROSEBROUGH; D. BROCHT. 1996. Metabolic responses of turkey hen (*Meleagris gal-lopavo*) to an intravenous injection of chicken or porcine glucagon. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 114C, No. 2 p.159–163.

MORITA, M., SASAKI, Y.; SHOJI, Y.; HIRATSUKA, H.; OHTOMO, Y.; TSUDA, T. Effects of intravenous administration on insulin, glucagon and adrenaline of plasma concentration of insulin, glucagon, free fatty acids and glucose in cocks. **Japanese journal of zootechnical science**, v.58, p.628–631, 1987.

SIMON, J. Chicken as a useful species for the comprehension of insulin action. **Critical Reviewa Poultry Biology**. v.2, p.121–148, 1989.

SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Ed. da Universidade UFPEL, 2005. 138 p.

UNDERWOOD, E. J. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed. Wallingford: CABI, 614p. 1999.

CAPÍTULO 3

ZINCO ORGÂNICO E COBRE SOBRE LEUCOGRAMA DE CODORNAS JAPONESAS SUBMETIDAS A ESTRESSE TÉRMICO

RESUMO

O zinco e o cobre são microminerais importantes como substratos em processos do sistema imune, assim como na atividade de células envolvidas nesse processo. Este trabalho objetivou, por meio da contagem diferencial de leucócitos, avaliar a suplementação de zinco orgânico e cobre em codornas japonesas submetidas a estresse térmico. Para isso foram usadas 480 codornas japonesas com 180 dias distribuídas inteiramente ao acaso, em fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos, com dez repetições e oito animais por unidade experimental. As codornas foram suplementadas com rações com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) por 84 dias. Ao final foi coletado sangue de cinco aves por tratamento, totalizando 30 aves, para confecção de duas lâminas por indivíduo coradas com corante tipo Panótico e submetidas a contagem de 100 leucócitos por lâmina em microscopia de luz. Durante a contagem diferencial foi observado quadro de heterofilia, linfopenia e eosinopenia, assim como elevada relação heterófilo:linfócito demonstrando estresse nos indivíduos, provavelmente causada pela alta temperatura durante o período experimental. No entanto foi observado que o zinco orgânico e cobre amenizaram os efeitos do estresse. Portanto o zinco orgânico e cobre apesar de não terem demonstrado interferência significativa nas porcentagens de leucócitos entre os tratamentos, estes foram importantes de modo a amenizar os efeitos de estresse térmico em que foram submetidas às aves durante o período experimental.

Palavras-chave: contagem diferencial de leucócitos; microminerais; saúde animal.

ABSTRACT

The zinc and copper are trace elements important as substrates in processes of the immune system, as well as the activity of cells involved in this process. This study aimed, through the differential leukocyte count, evaluate the supplementation of organic zinc and copper in Japanese quails subjected to thermal stress. For that they were used 480 Japanese quails with 180 days distributed completely randomized in a factorial 3x2, totaling six treatments, with ten repetitions and eight animals each. The quails were supplemented diets with three levels of organic zinc (35, 50 and 65 mg / kg) and two inorganic copper levels (3.5 and 5 mg / kg) for 84 days. At the end of blood was collected from five birds per treatment, totaling 30 birds, for making two blades per individual stained with dye type Panotic and subjected to counting 100 leukocytes per slide under light microscopy. During differential count was observed heterophilia above, lymphopenia and eosinopenia, as well as high heterophil: lymphocyte showing stress in individuals, probably caused by the high temperature during the experimental period. However, it was observed that the organic zinc and copper softened the effects of stress. So the organic zinc and copper although they have not shown significant interference with leukocyte percentages between treatments, these were important in order to mitigate the effects of thermal stress in which they were submitted to the birds during the experimental period.

Keywords: animal health; leukogram; trace minerals

1. INTRODUÇÃO

Uma das formas de avaliação do sistema de defesa do organismo é a contagem diferencial de leucócitos, o qual pode responder de acordo com a nutrição de microminerais, além de responder por meio da morfologia das células sanguíneas a possível presença ou não de efeitos patológicos (TADJALLI; EEMANPARVAR, 2003), ou de estresse (DAVIS et al., 2008).

O estresse, causado por temperatura e umidade relativa do ar, interferem na taxa de leucócitos de codornas japonesas (ROSA et al., 2011), pelo fato das mesmas responderem com alterações fisiológicas como o aumento na liberação de corticosterona (NORDI et al., 2007).

Por meio da nutrição é possível realizar a modulação do sistema imune, assim como as células que estão associadas no processo de defesa do organismo. Lanagá et al. (2005) a suplementação de minerais a fim de diminuir os efeitos do estresse em aves, por conta da elevada demanda desses nos processos metabólicos, como em células envolvidas no processo de defesa do organismo.

Dentre os minerais encontra-se o zinco e o cobre, aos quais desempenham importante função no organismo, principalmente em processo de divisão celular, além de desempenhar papel fundamental no desenvolvimento, manutenção, função normal do sistema imunológico, assim como as células associadas a ele, como os heterófilos, macrófagos, basófilos e linfócitos T (DARDENNE; BACH, 1993, BAINES; SHENKIN, 2002).

Sabendo disso este trabalho objetivou, por meio da contagem diferencial de leucócitos, avaliar a suplementação de zinco orgânico e cobre em codornas japonesas em fase de postura em condições de estresse térmico.

2. METODOLOGIA

2.1 Dados experimentais

O experimento foi desenvolvido na área experimental de Rive, Alegre-ES, no setor de Avicultura, da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram usadas 480 codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*), com 180 dias e com 180 g \pm 21,2.

As aves foram distribuídas em delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 3x2 com três níveis de zinco orgânico (35, 50 e 65 mg/kg) e dois níveis de cobre inorgânico (3,5 e 5 mg/kg) perfazendo seis tratamentos, dez repetições e oito animais por unidade experimental (Tabela 1.1).

Tabela 3.1 - Composição da ração de cada tratamento com os níveis de zinco orgânico e cobre para suplementação de codornas japonesas.

Tratamento	Composição
Zn35/Cu3,5	35 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn50/Cu3,5	50 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn65/Cu3,5	65 mg/kg de zinco orgânico e 3,5 mg/kg de cobre
Zn35/Cu5	35 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre
Zn50/Cu5	50 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre
Zn65/Cu5	65 mg/kg de zinco orgânico e 5,0 mg/kg de cobre

As aves foram distribuídas por peso corporal e, após 15 dias de controle de produção de ovos, foi feita a distribuição pela produção de ovos, de forma a padronizar distribuição por peso corporal e taxa de postura.

O fornecimento de ração foi feito duas vezes por dia, sempre às 08hs:00min e às 16hs:00min durante 84 dias. Nesse período a temperatura e umidade relativa do ar foram mensuradas diariamente.

Ao fim do período experimental foram eutanasiadas cinco aves por tratamento, segundo a resolução nº 1000 de 2012, por deslocamento cervical, sob aprovação do CEUA.

2.2 Coleta

Ao final do período experimental, com auxílio de uma seringa heparinizada, um volume de aproximadamente 1mL de sangue foi coletado na veia jugular, segundo a orientação da resolução nº 1000 de 2012. A coleta foi realizada em uma ave de cada uma das cinco primeiras unidades experimentais totalizando 30 aves, totalizando 5 aves por tratamento.

2.3 Contagem diferencial de leucócitos

Para contagem diferencial de leucócitos foi confeccionado duas lâminas de esfregaço sanguíneo por indivíduo. Estas foram coradas com corante tipo Panótico e posteriormente submetidas à contagem de 100 leucócitos por lâmina em microscopia de luz no aumento 1000x com uso de óleo de imersão.

Os leucócitos foram separados e caracterizados em granulares (heterófilo, eosinófilo e basófilo) e não granulares (linfócitos e monócitos) e, com os valores de heterófilo e linfócitos, foi calculada a relação heterófilo:linfócito para avaliação de estresse (RIZZO et al. 2008).

Foi feita a análise de distribuição dos dados e posterior análise de variância com Kruskal Wallis e teste *a posteriori* Dunn, utilizando-se o programa BioEstat®.

3. RESULTADOS

Durante a contagem diferencial foi observada a presença de heterófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos (Figura 3.1).

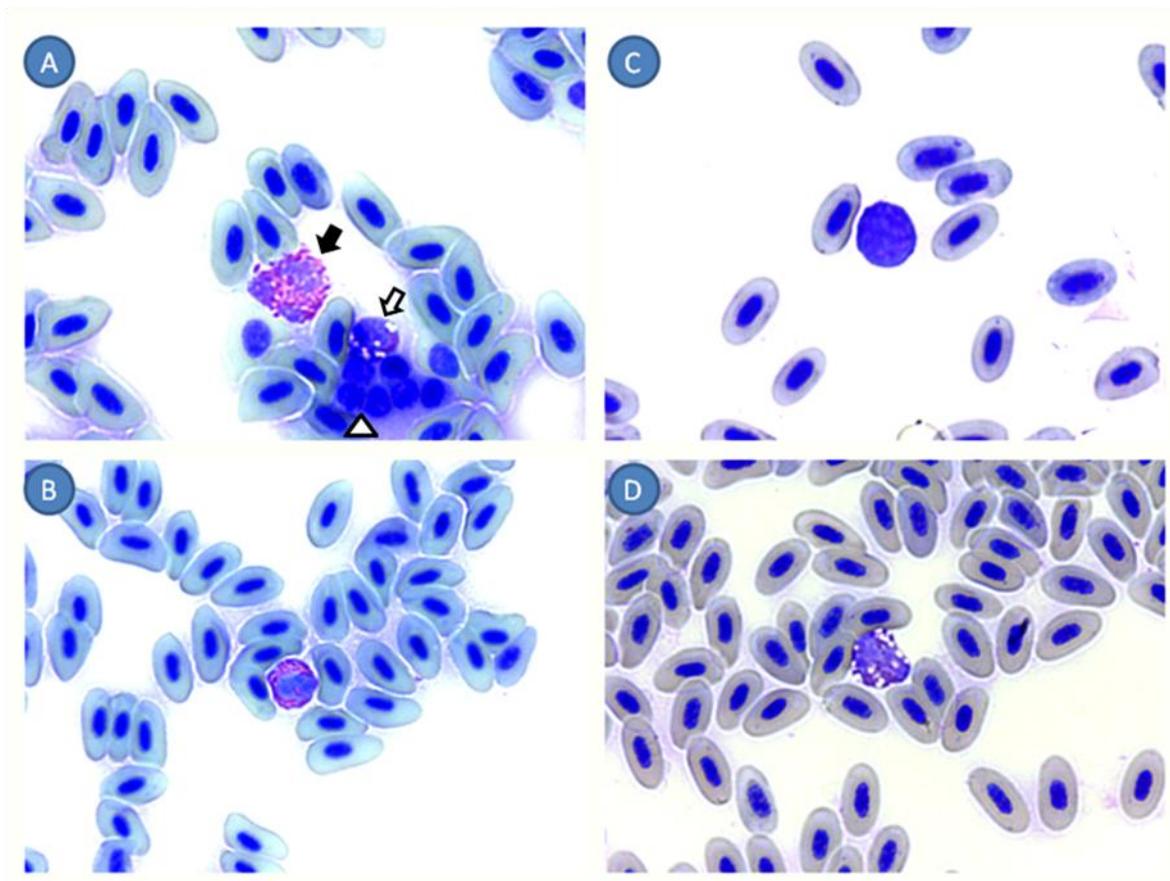


Figura 3.1 – Fotomicrografia de leucócitos de codornas japonesas suplementadas com zinco orgânico e cobre. (A) Heterófilo (seta preenchida), Linfócitos (cabeça da seta) e Monócito (seta sem preenchimento); (B) Eosinófilo; (C) Basófilo; (D) Monócito. Alegre-ES, 2016. Fonte: arquivo pessoal.

Os leucócitos analisados encontraram-se com morfologia normal. Os heterófilos apresentaram morfologia arredondada com núcleo segmentado com dois ou três lobos, com grânulos citoplasmáticos fusiformes acidófilos. Os eosinófilos foram observados com um núcleo lobado e basofílico, com citoplasma mais basófilo se comparado ao heterófilos, com grânulos mais corados e arredondados. Os basófilos foram observados pela alta quantidade de grânulos basofílicos no citoplasma, por conta disso apresentavam coloração azul intensa, enquanto que os monócitos foram identificados como mononucleado irregular, com cromatina menos condensada, com citoplasma abundante, basófilo e vacuolizado. Os linfócitos foram observados com um núcleo grande e arredondado, deixando apenas uma pequena borda do citoplasma aparente, com a cromatina altamente densa.

Os valores referentes à contagem diferencial de leucócitos das codornas (Tabela 3.3) demonstraram os valores médios de heterófilos, com variação de 41,4% a 47%, assim como os de linfócitos com variação entre 47% a 53,2%, sem diferença

significativa entre tratamentos. Da mesma forma não foi observada diferença significativa nas porcentagens de eosinófilo (variação de 1,6% a 3,6%), de monócito (de 1,2% a 2,6%) e de basófilo (de 0,8% a 1,8%) e relação H:L (0,8 a 1,1) entre tratamentos.

Houve influência significativa ($p < 0,05$) do cobre inorgânico somente na porcentagem de monócitos entre os tratamentos Zn65/Cu3,5 e Zn65/Cu5, sendo os maiores valores observados na menor concentração de cobre.

Tabela 3.2 - Média da contagem diferencial de leucócitos de codornas japonesas suplementadas com diferentes níveis de zinco orgânico e cobre.

Tratamentos	Variáveis					
	H (%)	L (%)	E (%)	M (%)	B (%)	H:L
Zn35/Cu3,5	44,0 ± 4,7	51,2 ± 5,1	1,6 ± 1,6	1,8 ± 0,8	1,4 ± 0,8	0,8 ± 0,1
Zn50/Cu3,5	44,2 ± 14,5	49,4 ± 14,2	2,6 ± 2,3	1,8 ± 1,0	2,0 ± 1,0	1,0 ± 0,5
Zn65/Cu3,5	41,8 ± 5,9	50,2 ± 6,2	3,6 ± 1,6	2,6 ± 0,8 ^b	1,8 ± 1,4	0,8 ± 0,2
Zn35/Cu5	41,4 ± 8,0	53,2 ± 8,8	2,6 ± 1,5	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,5	0,8 ± 0,2
Zn50/Cu5	46,4 ± 2,4	47,0 ± 14,7	3,2 ± 2,4	1,8 ± 0,8	1,6 ± 1,1	1,1 ± 0,6
Zn65/Cu5	47,0 ± 6,0	48,2 ± 8,4	2,8 ± 1,9	1,2 ± 0,8 ^a	0,8 ± 1,3	1,0 ± 0,3

Letras diferentes representam tratamentos significativamente diferentes ($p < 0,05$), em concentrações diferentes de cobre. H = Heterófilos, L = Linfócitos, E = Eosinófilos, M = Monócitos, B = Basófilos, H:L = razão entre heterófilos:linfócitos.

4 DISCUSSÃO

As células sanguíneas das codornas avaliadas demonstraram formas normais e dentro dos padrões analisados para as demais aves. Os leucócitos analisados e identificados estavam de acordo com o estabelecido por Tadjalli e Eemanparvar (2003).

No presente trabalho a temperatura média foi de $35,57 \pm 5,6^\circ\text{C}$. Rosa et al. (2011) observaram alterações nos padrões de leucócitos de codornas submetidas a ciclos de variação de 4°C durante os ciclos de temperatura ($21,5^\circ$ a $25,5^\circ$), logo a temperatura durante o período experimental foi acima da estudada por Rosa et al. indicando que as codornas japonesas foram submetidas a um estresse térmico durante o período experimental, ao qual justifica-se pela análise da contagem de leucócitos.

Para Ritchie et al. (1994) os valores referenciais estabelecidos para heterófilo em aves é de 20,8% a 52%. Especificamente para codornas japonesas em fase de postura Nirmalan e Robinson (1971) observaram uma taxa de 21,8%. Dittrich et al. (2000) avaliaram a taxa de heterófilo em *Coturnix coturnix* e encontraram uma porcentagem de 27,2%. Baseado nesses dados estabelecidos observa-se que a porcentagem de heterófilos demonstrados encontra-se acima do analisado para codornas (de 41,4 a 47%), ao qual indica o quadro de heterofilia.

Os valores estabelecidos para linfócitos, segundo Ritchie et al. (1994), são de 40% a 73,6%. Para Nirmalan e Robinson (1971) a porcentagem foi de 71,6% e para Dittrich et al. (2000) foi de 74, 37%. Comparado aos resultados analisados, que foram 47% a 53,2%, demonstra que as codornas apresentaram taxas inferiores de linfócitos, caracterizando a linfopenia.

Os resultados demonstraram uma diminuição da porcentagem de eosinófilos (1,6% a 3,6%) das codornas suplementadas com zinco orgânico e cobre comparado com Nirmalan e Robinson (1971), que observaram 4,3% de eosinófilos em codornas em postura, constando o quadro de eosinopenia. Tal comportamento também foi observado por Laganá et al. (2005) ao submeter codornas em estresse térmico.

Apesar da influência significativa do cobre sobre as porcentagens de monócitos entre os tratamentos 65Zn/3,5Cu e 65Zn/5Cu, as mesmas encontraram-se dentro da normalidade, que segundo Latimer e Bienzle (2000), corresponde de 1% a 3% dos leucócitos circulantes em aves.

Estes resultado estão de acordo com Rosa et al. (2011) que observaram quadro de heterofilia e linfopenia em codornas japonesas expostas a desconforto térmico. Em algumas aves os heterófilos são envolvidos em resposta inflamatória aguda (MITCHELL, JOHNS, 2008), assim como em infecções e estresse. Segundo Davis et al. (2008) a contagem de eosinófilos é outro indicador importante na avaliação de estresse.

O indicativo de estresse pode ser confirmado pela relação heterófilo:linfócito, que segundo Davis et al. (2008), é uma resposta mais sensível se comparada ao nível de glicocorticóides plasmáticos. O parâmetro normal apresenta valores entre 0,52 a 0,70 (RITCHIE et al.,1994). Os resultados demonstraram variação de 0,81 a 1,15, portanto, valores acima do estabelecido para todos os tratamentos (Tabela 1).

O aumento de heterófilos e a redução de linfócitos e eosinófilos podem ser causados pela ação dos glicocorticóides devido ao estresse (DAVIS et al., 2008;

JAIN, 1986). A secreção de glicocorticóides desencadeiam reações que diminuem a proliferação de linfócitos, assim como a comunicação entre eles e inibe a migração de granulócitos (ZUARDI, 2014).

Foi observado que a relação heterófilo:linfócito neste estudo obteve valores menores mesmo com elevada temperatura e com alta variação se comparado aos resultados obtidos por Rosa et al. (2001). O zinco é co-fator da fosfatase alcalina, metaloenzima que participa das funções dos heterófilos, processo de fagocitose dos macrófagos, assim como interferir na atividade das células T, no processo de lise celular por meio das células natural killer, desenvolvimento de linfócitos T-citotóxicos e proliferação de linfócitos T (SALGUEIRO et al., 2000). O cobre interfere no número de linfócitos circulantes e no processo de fagocitose dos macrófagos (BAINES; SHENKIN, 2002).

Logo ambos minerais ampararam as células envolvidas no processo de defesa de forma a amenizar os efeitos causados pelo estresse, especificamente pelos glicocorticóides, devido ao desconforto térmico em que foram submetidas às codornas japonesas durante o período experimental.

Tal suposição pode ser confirmada por Laganá et al. (2005) que avaliaram o estresse térmico (25°C a 32°C) em frangos suplementados com zinco, selênio orgânico e vitamina E, e demonstraram que a suplementação, principalmente a que utilizou somente os minerais, ocasionou o aumento de linfócitos que por sua vez, diminuiu a relação heterófilo:linfócito. Koh et al. (1996) demonstraram que pintos em fase aguda de estresse requeriam maior concentração de cobre no plasma sanguíneo se comparado aos saudáveis.

5 CONCLUSÃO

Portanto o zinco orgânico e cobre apesar de não terem demonstrado interferência significativa nas porcentagens de leucócitos entre os tratamentos, estes foram importantes de modo a amenizar os efeitos de estresse térmico em que foram submetidas as aves durante o período experimental.

6. REFERÊNCIAS

- BAINES, M., SHENKIN, A.. Lack of effectiveness of short-term intravenous micronutrient nutrition in restoring plasma antioxidant status after surgery. **Clinical Nutrition**, v.21, n.2, p.145–150, 2002.
- DARDENNE M., BACH J.M., Rationale for the mechanism of zinc interaction in the immune system. In: CUNNINGHAM-RUNDLES, S. **Nutrient modulation of the immune response**. New York: Marcel Dekker; p.501-509, 1993.
- DAVIS, 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.
- KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, p.1119-1125, 1998.
- KOH, T.S., PENG, U.R.K., K.C., KLASING. Dietary Copper Level Affects Copper Metabolism During Lipopolysaccharide-Induced Immunological Stress in Chicks. **Poultry Science**, v.75, p.867-872, 1996.
- LAGANÁ, C. et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de frangos de corte em estresse por calor. **Boletim de Indústria animal**, v.62, n. 2, p.157-165, 2005.
- LATIMER, K.S., BIENZLE, D. Determination and Interpretation of the avian leukogram. In: FELDMAN, B.F. et al. **SCHALM'S veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.417-432.
- MITCHELL, E.B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.11, p. 501-522, 2008.
- NIRMALAN, G.P.; ROBINSON, G.A. Haematology of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **British Poultry Science**, v.12, n.4, p.475-481, 1971.
- RIBEIRO, A.M.L., KINDLEIN, G. Nutrição e função imune em aves. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE AVICULTURA DE CORTE DA REGIÃO DE DESCALVADO, IV., 2000, **Anais...**Descalvado, SP. Descalvado. p.12-22.
- RITCHIE, B.W. et al. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth, Florida: Wingers, 1994. p.1407.
- ROSA, G.A. et al. Perfil hematológico de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) sob estresse térmico. **Ciência Rural**, v.41, n.9, p.1605-1610, 2011.
- SALGUEIRO, M.J. et al. Zinc Status and Immune System Relationship A Review. **Biological Trace Element Research**, v.76, n.3, p.193-205, 2000.

SCHMIDT, M. et al. Níveis nutricionais de cobre para frangos de corte machos e fêmeas na fase inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.1599-1605, 2005.

TADJALLI, M.; NAZIFI, S.; EEMANPARVAR, A. Normal cellular morphology of the blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Comparative Clinical Pathology**, v.12, n.2, p.102-105, 2003.

VRUWINK, K.G., et al. **The effect of experimental zinc deficiency on development of the immune system**. Marcel Dekker, New York, 1993.

WEINBERG, E.D. Roles of iron in host-parasite interactions. **Journal of Infectious Diseases**, v.124, n.4, p.401-410, 1971.

ZUARDI, A. W. **Fisiologia do estresse e sua influência na saúde**. Disponível em: <rnpp.fmrp.usp.br/~psicmed/doc/Fisiologia%20do%20estresse.pdf>. Acesso em: 5 de março de 2016, v. 23, 2014.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Dentre os níveis de zinco orgânico e cobre analisados, observou-se que a concentração de 50 mg de zinco orgânico foi o indicado tanto para altura da vilosidade intestinal quanto para a altura do magno. A concentração de 3,5 mg de cobre influenciou significativamente em melhores parâmetros para intestino.

As concentrações analisadas não interferiram na histologia do fígado e na histomorfometria do pâncreas, assim como na função exercida por ambos os órgãos no metabolismo animal.

Entretanto foi observado e sugerido que o uso de zinco orgânico e cobre amenizam o estresse causado pelo desconforto térmico em que os animais foram submetidos durante o período experimental.

Portanto o uso de ambos os minerais na suplementação animal além de não interferir negativamente na integridade histológica dos órgãos analisados, favoreceram na melhora dos parâmetros histomorfométricos dos órgãos duodeno e magno, aos quais são envolvidos e importantes no desempenho e produção animal, assim como ao amenizar os efeitos do quadro de estresse térmico em codornas japonesas.

7. 6. REFERÊNCIAS

AITKEN, R.N.C.; JOHNSTON, H.S. Observations on the fine structure of the infundibulum of the avian oviduct. **Journal of Anatomy**, v.97, p.87-99, 1963.

BACHA, W.J.; BACHA, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 318p.

BERTECHINI A. G. **Nutrição de monogástricos**. 1. ed. Lavras - MG: Ed. ufla, v.1, , 2006. 302p.

BOBR, L.W. et al. Distribution of spermatozoa in the oviduct and fertility in domestic birds.1. Residence sites of spermatozoa in fowl oviducts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.8, p.39-47, 1964.

BORUTA, A. et al. Trace organic minerals as a replacement of inorganic source for layers: effect on productivity and mineral excretion. In: **Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition**, p.491-494, 2007.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 16, p.71-120, 2013.

CLARK, P.; BOARDMAN, W.; RAIDAL, S. **Atlas of clinical avian hematology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2009. 184p.

DYCE, K.M. et al. Anatomia das aves. In: DYCE, K.M. et al. **Tratado de anatomia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1996. p.631-650

DECUYPERE, E., MALHEIROS, R.D., MORAES, V.M.B., et al., **Fisiologia do Embrião**. In: MACARI, M., GONZALES, E. Manejo da Incubação. 2.ed. Editora Facta. Jaboticabal-SP, p.65-94. 2003.

EVÊNCIO NETO, J. et al. Morfologia do oviduto (fímbrias, infundíbulo, magno) de galinha doméstica (*Gallus gallus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, p.1-131, 2001.

FUJII, S.; TAMURA, T. Location of sperms in the oviduct of the domestic fowl with special reference to storage of sperms in the vaginal gland. **Journal of the Faculty of Fisheries and Animal**, v.5, p.145-163, 1963.

FURLAN, L. R.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, **Anais...** Balneário Camboriú. p.6-28. 2004.

GIERSBERG, H. Untersuchungen über physiologie und histologie des eileiters der reptilien und vogel: nebst einem beitrage zur fasergenese. **Zoology Wiss Zoology**, v.120, p.1-97, 1922.

GLASGOW, R.E.; MULVIHILL S.J. Surgery. Basic science and clinical evidence. **Springer**, p. 875-909, 2008.

GÜRTLER, H. **Fisiologia veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 612p.

HAMBIGDE, M. Human zinc deficiency. **Journal of Nutrition**, v.130, p.1344-1349, 2000.

JOHNSTON, H.S. et al. The fine structure of the uterus of the domestic fowl. **Journal of Anatomy**, v.97. p.333-344, 1963.

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

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica-texto e atlas**. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013.

LEESON, S.; SUMMERS, J.D. **Nutrition of the chicken**. Ontario: University Books, 2001. 591p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier; 1998. 725p.

MACIEL, M.P.; SARAIVA, E.P.; AGUIAR, E.F. et al. Effect of using organic microminerals on performance and external quality of eggs of commercial laying hens at the end of laying. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.344-348, 2010.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S.M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.1, p.75-82, 2001.

McDONALD, P.; EDWARDS R. A.; GREENHALGH, J. F. D. et al. **Animal nutrition**. 6 ed. Pearson:Edinburgh, 2002. 693p.

MCDOWELL L.R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. 524p.

MITCHELL, E. B.; JOHNS, J. Avian hematology and related disorders. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v.11, p.501-522, 2008.

MORAES, C., BARALDI-ARTONI, S.M., PACHECO, M.R., NISHIZAWA, M., NAKAGHI, L.S.O. Morfologia e histologia do oviduto de marrecas Ana boschas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.293-301, 2010.

NRC, National Research Council. **Nutrients Requirements of Poultry**. 9. ed. National Academic Press, Washington D.C. 1994. 155p.

OTEIZA, P.L.; OLIN, K.L.; FRAGA, C.G.; KEEN, C.L. Oxidant defense systems in testes from Zn deficient rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 213, p. 85–91, 1996.

PRASAD, A.S.; KUCUK, O. Zinc in cancer prevention. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 21, p. 291-295, 2002.

RIBEIRO, M.G. et al Estudo histológico do oviduto de *Numida meleagris* (Linné, 1758), com referência especial ao útero. **Bios**, v.2, n.3, p.43-48, 1995.

RICHARDSON, K.C. The secretory phenomena in the oviduct of the fowl, including the process of shell formation examined by microincineration technique. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences**, v.225, p.149-195, 1935.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; PAN, E. A. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. In MACARI, M.; MENDES, A. A. **Manejo de matrizes de corte**. 1. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p 75-122. 2005.

SAVIANI, G. et al. Histologia do fígado de avestruz (*Struthio camelus*, Linnaeus 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.49, n.2, p. 122-129, 201.,

SCHMIDT, R. E.; REAVILL, D. R.; PHALEN, D. N. **Pathology of pet and aviary birds**. John Wiley & Sons, 2006.

SHANKAR, A. H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.68, p.447-463, 1998.

SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2000p.

SULTANA, F. et al. The peri-albumen layer: a novel structure in the envelopes of avian egg. **Journal Anatomy**, v.203, n.1, p.115-122, 2003.

TAKATA, F.N. et al. Aspectos morfológicos do oviduto de galinha doméstica (*Gallus gallus*) após período de muda forçada. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, p.1-147, 2000.

TELL, L.A.; KABBUR, M.B.; SMITH, W.L.; DAHL, K.H.; CULLOR, J.S.A. Technique for isolating heterophils from blood of orange-winged amazon parrots (*Amazona amazonica amazonica*). **Comparative Haematology International**, v.7, p.47-3, 1997.

UNDERWOOD, E. J. **The mineral nutrition of livestock**. 3 ed. Wallingford: CABI, 1999. 614p.

UNI, Z.; GANOT, S.; SKLAN, D. Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. **Poultry Science**, 1998, v.77, n.1, p.75-82.