UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

CORTICOSTERONA EM PENAS: APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA FRANGOS DE CORTE

NATHALIE VÁSQUEZ GÓMEZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia

BOTUCATU, SÃO PAULO
Abril de 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gómez, Nathalie Vásquez.
Corticosterona em penas : aplicação e validação da metodologia para frangos de corte / Nathalie Vásquez Gómez. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Ibiara Correia de Lima Almeida Paz
Capes: 50403001

1. Avicultura. 2. Frango de corte. 3. Glucocorticoides. 4. Estresse. 5. Bem-estar. 6. Animais - Proteção.

Palavras-chave: Avicultura; Bem-estar; Estresse; Glicocorticoides; Não invasivo.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia UNESP BOTUCATU Seção de Pós-Graduação fmvz ZOOTECNIA

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **NATHALIE VÁSQUEZ GÓMEZ**, RA nº: ZNP210099, RNE nº 1088345725, defendeu, no dia 24/04/2023, a dissertação intitulada **AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE E BEM-ESTAR DE FRANGOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO À BASE DE BACILOS E ÓLEOS ESSENCIAIS** , junto ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Curso de Mestrado Acadêmico, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Botucatu, 24 de abril de 2023

Claudia Cristina Moreci

Cláudia Cristina Moreci
Assistente Administrativo
Seção de Pós-Graduação / FMVZ

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

CORTICOSTERONA EM PENAS: APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA FRANGOS DE CORTE

NATHALIE VÁSQUEZ GÓMEZ

Orientadora: Profa. Assoc. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia

BOTUCATU, SÃO PAULO
Abril de 2023

BIOGRAFIA DA AUTORA

Nathalie Vásquez Gómez, nasceu no município de Pereira, no estado de Risaralda na Colômbia, em 13 de novembro do ano 1997. Filha de Luz Adriana Gómez Aguirre e Nicolas Alberto Vásquez. Ingressou na Universidade de Caldas no ano 2015, obtendo o título de Médica Veterinária Zootecnista em 2020. No ano 2020 realizou o estágio obrigatório no Brasil na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP – Botucatu/SP), no setor de avicultura. Em 2021, ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ – UNESP – Botucatu/SP), na Área de Produção Animal, com foco em Avicultura

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu amado pai Nicolas Alberto Vásquez (*in memoriam*), cujo empenho em me educar sempre veio em primeiro lugar. Aqui estão os resultados dos seus esforços para me ver crescer. Sei que desde o céu ele sempre me cuidou e não me deixou desistir.

A minha mãe Luz Adriana Gómez Aguirre por me oferecer o apoio incondicional para estar aqui e me deixar voar para cumprir um sonho. Agradeço pelos esforços e o amor tão grande que me deu forças para concluir essa pós-graduação.

A minhas irmãs Catalina e Carolina, que apesar da distância me acompanham e me dão suporte e amor todos os dias.

A minha família, especialmente aos meus avós Nelly e Guillermo (*in memoriam*) que oraram por mim todos os dias.

A Caio Ouros por ser um apoio incondicional, agradeço por todos os ensinamentos e a paciência que teve comigo.

A minhas amigas, especialmente a Valentina Mejía, Fernanda Braga, Alana Pereira, Alejandra Montenegro, Iasmin Calaça, Lais Febroni, Leticia Thalia, Camile Dutra, Luana Catelan e Taise Rodrigues que foram uma fonte inesgotável de apoio e estiveram presentes em todos os momentos difíceis.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por abençoar meu caminho, me dar saúde para conquistar meus sonhos e me dar forças para não desistir nos momentos difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/Botucatu, pela oportunidade de concretizar a obtenção do título de mestre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A empresa CHR. Hansen, em especial ao Médico Veterinário, Ms. Alberto Yocyitaca Inoue, pelo apoio para realização desta pesquisa.

A minha orientadora Profa. Ibiara Correia de Lima Almeida Paz, pela oportunidade, os aprendizados e a paciência com que me ensinou e me corrigiu. Obrigada por guiar meu caminho na pós-graduação e por contribuir no meu crescimento pessoal.

Ao meu professor Elvis Alexander Díaz Lopez por despertar em mim o interesse pela produção avícola e o bem-estar.

A todos os colegas de pós-graduação, amigos e estagiários que passaram pelo setor de avicultura, em especial, Caio, Marconi, Fernanda, Gustavo, Marcos, Ana Beatriz, Yunus, Andressa, Pedro, Clara, Ingrid, Francine, Natália, Gilson e Walter que colaboraram durante o desenvolvimento do projeto, permitindo que fosse concluído com sucesso.

A supervisão das Fazendas de Ensino, Pesquisa e Extensão (FEPE) e a Fábrica de Ração da FMVZ, pelo apoio durante toda a realização do experimento.

Aos professores do programa de pós-graduação, e todos os funcionários do departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, por toda ajuda e colaboração em todos os momentos.

Aos membros da Comissão Examinadora, por seu tempo e contribuição ao meu estudo.

“No semblante de um animal, que não fala, há um discurso
que somente um espírito sábio realmente entende.”
(Mahatma Gandhi)

CORTICOSTERONA EM PENAS: APLICAÇÃO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA FRANGOS DE CORTE

Resumo - a metodologia comumente utilizada para quantificar os níveis de corticosterona em frangos de corte utiliza o soro sanguíneo, sendo que no momento da colheita do material, devido à contenção e punção, o animal sofre estresse, e pode ocorrer alterações no resultado obtido. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de adaptar e validar uma metodologia não invasiva utilizada para aves selvagens, para estimar o estresse em frangos de corte, utilizando penas para quantificar o nível de corticosterona circulante. Para isso, sangue e penas de três regiões de frangos de corte foram colhidos e os teores de corticosterona foram obtidos. Os resultados foram positivos, com correlações significativas entre os níveis de corticosterona mensurados em sangue e penas, principalmente quando foram utilizadas as penas das asas (r= 0.909). As penas de asas são aquelas identificadas em campo mais facilmente, permitindo que o material seja colhido no piso dos aviários, sem o perigo de ocorrer confundimento com penas de outras regiões. Conclui-se que a medição de corticosterona nas penas é uma metodologia eficiente em frangos de corte, constituindo-se como uma ferramenta não invasiva para estimativa de estresse em frangos de corte.

Palavras-chave: avicultura; bem-estar; estresse; glicocorticoides; não invasivo

CORTICOSTERONE IN FEATHERS: APPLICATION AND VALIDATION OF THE METHODOLOGY FOR BROILERS

Abstract- The methodology commonly used to quantify the levels of corticosterone in broilers is through blood serum, and at the time of material collection, due to restraint and puncture, the animal suffers stress, and changes may occur in the result obtained. Thus, this study was conducted with the objective of adapting and validating a non-invasive methodology used for wild birds, to estimate stress in broilers, using feathers to quantify the level of circulating corticosterone. For this purpose, blood and feathers from three regions of broilers were collected and corticosterone levels were obtained. The results were positive, with significant correlations between corticosterone levels measured in blood and feathers, especially when wing feathers were used (r= 0.909). Wing feathers are the most easily identified in the field, allowing the material to be collected on the floor of the aviaries without the danger of being confused with feathers from other regions. We conclude that the measurement of corticosterone in feathers is an efficient methodology in broilers, constituting a non-invasive tool for estimating stress in broilers.

Keywords: glucocorticoids; non-invasive; poultry; stress; welfare

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Peso vivo médio dos 20 frangos de corte de cada grupo, selecionados para amostragem, aos 20, 34 e 40 dias de criação. 39
Tabela 2. Peso vivo médio dos 200 frangos de corte que compuseram cada grupo, avaliados aos 20, 34 e 40 dias de criação. 39
Tabela 3. Concentração de corticosterona em soro sanguíneo e penas de frangos de corte. 40
Tabela 4. Variações encontradas entre os níveis de corticosterona no sangue e nas penas. 42
Tabela 5. (r) entre os níveis de corticosterona presentes no soro de sangue e em penas de frangos de corte, em função do aditivo utilizado na dieta. 44

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ACTH ..... Hormônio adrenocorticotrófico

AGP ..... Antibiótico melhorador de desempenho

API ..... Animal Protection Index

BS..... Probiótico a base de *Bacillus spp*

CEUA..... Comissão de Ética no Uso de Animais

CORT..... Corticosterona

ELISA..... Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FAO.....Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FAWC…… Farm Animal Welfare Council

FMVZ .....Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HPA.....Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HSI.....Humane Society International

MFA.....Mercy For Animals

ODS……Objetivos de Desenvolvimentos Sustentável

OIE.....Organização Mundial para Saúde Animal

ONG..... Organizações Não Governamentais

RIA..... Radioimunoensaio

SNE .....Sistema Nervoso Entérico

SNC..... Sistema Nervoso Central

WAP..... World Animal Protection

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 12
CONSIDERAÇÕES INICIAIS 13
1.1 História do bem-estar animal 13
1.2 Implicações do bem-estar na comercialização de produtos de origem animal 17
1.3 Indicadores de bem-estar animal 18
1.4 Alterações hormonais em aves, durante o estresse 20
1.5 Medição de corticosteronas nas penas das aves 21
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO 23
3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 25
CAPÍTULO II 32
Resumo 33
Introdução 33
Material e métodos 35
Resultados e discussão 38
Proporção de corticosterona entre sangue e penas 41
Conclusão 44
Referências 45
CAPÍTULO III 49
IMPLICAÇÕES 49

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A grande expressividade da produção avícola no mundo, associada à facilidade para obtenção de informações de maneira on-line, favoreceu aos consumidores acessarem maior informação sobre os produtos consumidos, tornando-os cada vez mais exigentes em relação a qualidade da produção, incluindo o bem-estar das aves. Devido a isso, a ciência do bem-estar é cada vez mais estudada pelos pesquisadores, visando evitar o sofrimento dos animais e permitindo que tenham uma boa qualidade de vida.

Uma das metodologias mais utilizadas para medir o estresse é a mensuração de corticosterona em soro sanguíneo. A corticosterona é um indicador da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que é ativado em momentos de estresse. Porém, a manipulação do animal para a obtenção de amostras desse material causa estresse, interferindo nos resultados da avaliação, e afetando a confiabilidade dos resultados. Uma vez que para a realização dos estudos visando a redução do estresse, os pesquisadores necessitam utilizar uma metodologia que causa estresse ao animal.

Assim, buscando alternativas para mensurar o estresse em aves selvagens, pois nem sempre é possível fazer a manipulação destes animais, pesquisadores desenvolveram uma metodologia para medição de corticosterona nas penas, para evitar o estresse causado pelo manejo (BORTOLOTTI et al., 2008; BORTOLOTTI et al., 2009).

Embora haja diferenças entre as aves selvagens e as de produção, destacando-se o comportamento, ciclo de vida e alimentação, observou-se a possibilidade de adaptar a metodologia de colheita de penas para aves de produção, já que esta técnica pode evitar o estresse causado pela colheita de amostras sanguíneas. No entanto, a adequação da metodologia é necessária para validação de seu uso em aves de produção.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 História do bem-estar animal

A conscientização sobre a senciência dos animais levou os consumidores a questionarem as formas de criação, sendo que cada vez mais o bem-estar animal se torna tema importante no mercado (BEAUMONT et al., 2010). Portanto, há maior interesse a respeito do bem-estar dos animais de produção e a partir disso, pesquisadores buscam estratégias para melhorar o bem-estar nestes animais. (AUGÈRE-GRANIER, 2019).

A ciência do bem-estar animal é estudada há mais de 50 anos, sendo a cientista Ruth Harrison, uma das primeiras defensoras dos direitos dos animais, questionou a forma como estes são criados em produções intensivas. Assim, em seu livro "Animal machines" publicado em 1964, Ruth questionou até que ponto os homens teriam o direito a utilizar os animais para seu próprio prazer ou benefício (HARRISON, 1964). A partir disso, foi reconhecida a importância das experiências mentais dos animais com a finalidade de avaliar o seu bem-estar.

Em 1976, Barry O. Hughes propôs que bem-estar seria o estado de harmonia do animal com seu ambiente, apresentando completa saúde física e mental (HUGHES, 1976). Complementando, Broom (1986) propôs que o bem-estar é o estado do organismo durante as suas tentativas de se ajustar com o seu ambiente, assim, o bem-estar está diretamente relacionado com o grau de dificuldade que um animal demonstra na sua interação com o ambiente e a sua capacidade por manter o equilíbrio. Este conceito foi amplamente utilizado já que inclui as prováveis situações que o animal pode enfrentar e que colocam em risco sua qualidade de vida.

Os estudos iniciais relacionados ao bem-estar animal versavam sobre o atendimento das necessidades básicas relacionadas ao funcionamento biológico e a algumas características em seu entorno (GREEN e MELLOR, 2011), porém, após evidências científicas foi assumido que os animais poderiam sofrer quando suas necessidades comportamentais não fossem atendidas e assim, as emoções e sentimentos dos animais passaram a ser considerados (DUNCAN, 2005).

Em busca de garantir os direitos dos animais de produção, o governo da Inglaterra criou, em 1965, uma comissão para estudar o bem-estar de animais confinados, originando o *UK's Farm Animal Welfare Council* (FAWC), que formularam as cinco liberdades (VAPNEK e CHAPMAN, 2010; CORNISH et al., 2016). O objetivo da FAWC era apresentar normas e conceitos para evitar sofrimentos desnecessários aos animais de interesse zootécnico. Tais normas alcançaram reconhecimento mundial como declaração de princípios fundamentais do bem-estar animal, sendo uma das primeiras ferramentas para mensurá-lo (FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL, 2009). Assim, as cinco liberdades foram descritas:

1. Liberdade fisiológica (livre de fome e sede).

2. Liberdade ambiental (livre de desconfortos e em ambiente adequado).
3. Liberdade sanitária (livre de doenças, feridas ou dor).
4. Liberdade psicológica (livre de medo ou sofrimento)
5. Liberdade comportamental (expressão do comportamento natural, fornecendo instalações adequadas).

Posteriormente a criação da FAWC, no ano de 1994, Mellor e Reid substituíram o conceito de cinco liberdades pelo conceito "*Five Domains of Potential Welfare Compromise"* - cinco domínios, quando foram expandidos, para expressar o bem-estar em termos de compromisso, esta descrição foi atualizada no ano 2016 por Mellor (MELLOR e REID, 1994; MELLOR, 2016). Os 5 domínios são:

1. Nutrição.
2. Meio Ambiente.
3. Saúde.
4. Comportamento - focados nas experiências físicas.
5. Estado mental - focado nas experiências positivas e negativas do animal)

No ano 2009 a FAWC criou um indicador sobre a qualidade de vida do animal nomeado "*A life worth living"*. Para a FAWC o bem-estar dos animais pode ser expresso em base a qualidade de vida deles, na seguinte classificação: "Uma vida boa" para os animais que têm boa qualidade de vida, "Uma vida que vale a pena ser vivida" para animais que tem uma qualidade de vida aceitável pela sociedade e "Uma vida que não vale a pena ser vivida" onde os animais têm condições de vida inaceitáveis, com isso, a qualidade de vida dos animais é avaliada com base nas experiências que enfrentam, sendo positivas ou negativas (FAWC, 2009; MELLOR e BEAUSOLEIL, 2015; CEBALLOS e SANT'ANNA, 2018).

A Organização Mundial para Saúde Animal (OIE) também adotou medidas para melhorar o bem-estar por meio de um plano estratégico chamado "*Terrestrial Animal Health Code*" que tinha sido criado desde 1968, porém, só foram priorizados parâmetros para o bem-estar a partir de 2001 (FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL, 2009). Na versão atual (2019), o plano conta com uma seção dedicada ao bem-estar, com recomendações para diferentes tipos de produção animal, transporte e pesquisas (OIE, 2019).

No Brasil, a primeira normativa relacionada ao bem-estar foi na constituição federal em 1998, no artigo 225, que tem como objetivo proteger a fauna e flora e punir maus tratos. A constituição federal conta com uma lei de crimes ambientais (Decreto Federal N.º 9.605/1998) a qual dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e animais. Também foi criada a Instrução Normativa Nº 56, de 6 de novembro de 2008, que estabelece os procedimentos gerais de Recomendações de Boas Práticas de Bem-Estar para Animais de Produção e de Interesse Econômico (Rebem), abrangendo os sistemas de produção e transporte (MAPA, 2022).

Por meio da Portaria Nº 524/2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu a Comissão Técnica Permanente de Bem-Estar Animal (CTBEA), cujo objetivo é coordenar ações de bem-estar dos animais de produção e de interesse econômico nos diversos elos da cadeia produtiva. O conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), encarregado de fiscalizar as profissões de Médicos Veterinários e Zootecnistas, publicou a resolução N.º 1.236, de 26 de outubro de 2018, a qual define e caracteriza crueldade, abuso e maus-tratos contra animais vertebrados, dispõe sobre a conduta de médicos veterinários e zootecnistas e dá outras providências (CFMV, 2018).

A organização “World Animal Protection” (WAP) criou o “Animal Protection Index” (API), um ranking de 50 países ao redor do mundo para medir a legislação e compromissos políticos para proteger os animais de cada país, dando uma classificação de A (Melhor classificação) até G (Pior classificação). Para o ano 2020 a América Latina apresentou resultados que demonstram uma necessidade drástica de mudanças nas legislações, sendo que Argentina e Venezuela apresentaram nota E. Países como Brasil, Colômbia, Chile, Peru e Uruguai obtiveram nota D, por outro lado, o México foi quem obteve a melhor nota da América Latina (C). Estes resultados demonstram a insuficiência de normas que protejam os animais, especialmente para animais de produção. A WAP pede mudanças aos governos da américa latina, para que atuem a favor dos animais e reconheçam que merecem uma qualidade de vida boa, que inclua na maior parte do tempo experiências positivas (WORLD ANIMAL PROTECTION, 2020).

1.2 Implicações do bem-estar na comercialização de produtos de origem animal

O bem-estar de animais de produção é um ponto de preocupação não só dos consumidores, mas também de produtores, governos ao redor do mundo e empresas produtoras de alimentos (IANETTI et al., 2021). Este tema passou a ser considerado um dos critérios de sustentabilidade nos sistemas de produção (MCGLONE, 2001). Pesquisadores afirmam que sistemas produtivos que não promovem bem-estar podem se tornar insustentáveis, devido a não serem aceitos por grande parte da população, além de poder resultar em impactos graves ao ambiente (BROOM, 2010; CEBALLOS e SANT'ANNA, 2018).

Pesquisadores e produtores buscam dar subsídios para a sociedade e atender os consumidores mais exigentes e conscientes de suas práticas de consumo. Apesar de um panorama desafiador, as melhorias na produção animal têm levado a novas oportunidades, baseando-se na aplicação de práticas e princípios da ciência do bem-estar animal (CEBALLOS e SANT'ANNA, 2018).

Em vista das preocupações pelo bem-estar e a sustentabilidade das produções, diversas organizações não governamentais (ONG´s) foram criadas, por exemplo, a ONG *Humane Society International* (HSI), *Mercy For Animals* (MFA) e *Certified Humane*, as quais visam certificar que o alimento é oriundo de produtores que atendem as exigências objetivas de bem-estar animal, estando presente em países da América do Sul, Austrália, Canadá, Estados Unidos e Hong Kong. Assim, o selo *Certified Humane*® já está presente em grandes empresas como Hemmer, Burger King, McDonald's e Unilever, o que demostra que as indústrias alimentícias estão aderindo as metas de conversão de seus produtos de origem animal para produtos provenientes de fontes sustentáveis (CERTIFIED HUMANE, 2018).

Diversos países têm criado legislações para que sejam adotadas práticas mais sustentáveis nas produções, entre elas regular o uso de aditivos melhoradores de desempenho. Devido às preocupações em relação ao desenvolvimento de resistência bacteriana pelo uso inadequado de antibióticos, alguns países proibiram o seu uso na alimentação de animais de produção (WHO, 2012). Assim, o desenvolvimento de novos aditivos que ajudassem a melhorar a saúde dos frangos foi impulsionado (RAMLUCKEN et al., 2020; BILAL et al., 2021). Pesquisas são desenvolvidas avaliando diferentes aditivos entre eles os probióticos,

prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos e aditivos fitogênicos que demonstram ter a capacidade de melhorar o desempenho, a saúde intestinal e reforçar o sistema imune das aves (GADDE et al., 2017; RAMLUCKEN et al., 2020). Um dos aditivos mais estudados para substituir os antibióticos são os probióticos, que são cultivos de organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro e podem ser fornecidos em combinação com outros aditivos no alimento ou água (GRANT et al., 2018; MOHAMMADIGHEISAR et al., 2019). Investigações realizadas com *Bacillus subtilis* reportaram melhoras nos parâmetros de desempenho, imunidade e saúde intestinal de frangos de corte (BILAL et al., 2021).

Pesquisadores afirmam que os probióticos são uma alternativa eficiente para diminuir o estresse em aves de produção, devido a interação que existe entre o intestino e o cérebro, chamado de sistema nervoso entérico (SNE). Sabe-se que a microbiota intestinal influencia o sistema nervoso central (SNC) através da via neural, endócrina e imunológica, atuando nas funções cerebrais, dessa forma regula a liberação de glicocorticóides resultando em homeostase, melhorando as respostas comportamentais dos indivíduos (WANG e WANG, 2016; VOUNG et al., 2017; ALMEIDA PAZ et al., 2019; SOROKO e ZABORSKI, 2020; FROZZA et al., 2022).

1.3 Indicadores de bem-estar animal

Concomitante às variações negativas no bem-estar animal há aumento no estresse, que pode ter como consequências imunodepressão, diminuição na produtividade e mudanças no comportamento (BROOM, 2010). Com isso, é necessário buscar estratégias que aumentem a capacidade dos animais em mitigar os efeitos fisiológicos do estresse, sendo preciso avaliar indicadores multimodais, que determinem de forma confiável a severidade do estresse e as mudanças que geram no bem-estar (OTOVIC e HUTCHINSON, 2015). Os indicadores de bem-estar são variáveis consideradas para mensuração do bem-estar, e devem ser estimados por metodologias objetivas, com resultados apresentados em pontuação numérica, quando este cuidado não é considerado, os indicadores tornam-se subjetivos (KEELING, 2019). A maioria das metodologias adotadas para determinar o estado do animal, estabelece pontuação variando de muito bom até muito ruim (CEBALLOS e SANT'ANNA, 2018). O principal requisito para qualquer indicador de bem-estar é que forneça informações

significativas e que tenham “validade de construto”, ou seja, é imprescindível que tenha validade científica (WEMELSFELDER e MULLAN, 2014).

As variáveis e metodologias para estimativa de bem-estar podem ser divididas em invasivas e não invasivas. Aquelas consideradas invasivas necessitam, em sua maioria, de manipulação do animal, gerando incômodo ou dor. Nestas situações é preciso considerar as variações fisiológicas que o estresse agudo gera na hora da colheita. Neste tipo de avaliação se encontram os parâmetros hematológicos, por exemplo: hematócrito e a relação heterófilos/linfócitos (PEREA et al., 1997); parâmetros químicos do sangue como o cortisol em mamíferos ou a corticosterona sérica sendo as mais relevantes em aves; a resposta imune humoral; e biomarcadores de estresse oxidativo (PLAZAS et al., 2018). Ainda, segundo os mesmos autores, os indicadores não invasivos se caracterizam por não afetar de forma prolongada os 5 domínios propostos por Mellor (2016). Entre os principais indicadores não invasivos, estão os parâmetros fisiológicos (temperatura corporal por meio de câmara termográfica e frequência respiratória) (SHARMA et al., 2013) e parâmetros produtivos (desempenho, mortalidade, qualidade de ovo, qualidade de carcaça etc.).

As mensurações de bem-estar também contemplam observações comportamentais, avaliando as repetições de comportamentos naturais, os quais têm grande importância para a melhor compreensão do estado do animal, mudanças no comportamento são sinal de que algo não está adequado. Em estudos geralmente se observa os comportamentos naturais realizados pelo animal em questão, como: comportamento alimentar que está relacionado ao acesso ao alimento; comportamento relacionado a doenças como diminuição da atividade; comportamento relacionado ao conforto, como tempo dedicado ao descanso; e comportamento social, relacionado aos animais gregários e a estrutura social regulada por interações agonísticas ou aflitivas, baseada na hierarquia (WOLFGER et al., 2014). Nas aves, os comportamentos de brincar, explorar, banho de areia, ciscar, bicar, comportamento de higiene, vocalização e postura corporal, são realizados em condições de bem-estar (GOMES et al., 2010; KEELING, 2019; LOURENÇO DA SILVA et al., 2021).

Outro exemplo de indicadores não invasivos são os testes de medo, que ajudam a estimar a reatividade do animal ao contato humano ou a algum objeto desconhecido; assim, quanto maior a resposta em evitar o contato pior será o bem-estar do animal, enquanto o objeto estiver presente ou o evento estiver ocorrendo (BROOM e FRASER, 2010). Por

exemplo, na avicultura é utilizado o “teste de apanha” que simula a resposta do animal no momento da apanha para colocar as aves na caixa de transporte e o “teste de aproximação” que monitora a reação das aves ao contato humano (CHIOZZINI e SOSTER, 2016; ALMEIDA PAZ et al., 2019).

Também é possível medir metabólitos de glicocorticoides, utilizando amostras de saliva, urina, fezes, pelos e penas, quando esses são coletados não há necessidade de contenção do animal. Os hormônios mais utilizados para mensuração dos metabólitos são o cortisol e a corticosterona (em aves), que são liberados em momentos de estresse por meio do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), existindo um intervalo de tempo entre a circulação dos hormônios no sangue e o aparecimento dos metabólitos hormonais em secreções, pelos ou penas (ALTINO et al., 2018).

1.4 Alterações hormonais em aves, durante o estresse

Quando as aves estão sob condições estressantes há alterações na homeostase, consequentemente, desencadeamento de resposta hormonal por meio do eixo HPA. A cascata hormonal inicia na estimulação do hipotálamo, liberando a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o que estimula a glândula pituitária a aumentar a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Assim, a glândula adrenal é estimulada a liberar glicocorticóides e catecolaminas que resultam em lipólise, glicogenólise, e catabolismo de proteínas (ROMERO e BUTLER, 2007; RALPH e TILBROOK, 2016).

Os glicocorticóides atuam no metabolismo, no controle da gliconeogênese e da lipólise quando estão em níveis normais (MATTERI et al., 2000). Os glicocorticóides são sintetizados no período diurno e são regulados pelo ciclo circadiano, com interferência direta da iluminação, genética, entre outros; assim, em espécies diurnas há um pico de glicocorticóides de manhã e diminuição pela noite (TURNER et al., 2012; MORMÈDE et al., 2007). A síntese de glicocorticóides também aumenta após a alimentação, podendo aumentar a ingestão de alimentos e, em combinação com insulina, incrementam o armazenamento de gordura (RALPH e TILBROOK, 2016). Assim, mobilizam a produção e distribuição de substratos energéticos durante o estresse além de gerar alterações no organismo como, por exemplo, auxiliar na redução dos processos digestivos, na

vasoconstrição periférica, na glicogênese e na mobilização do estoque energético nos momentos de sobrevivência (PARTECKE et al., 2006; RALPH e TILBROOK, 2016).

O principal glicocorticóide em aves é a corticosterona (CORT). A concentração de CORT em soro sanguíneo fornece indício do estresse agudo da ave no momento que o sangue foi colhido (BORTOLOTTI et al., 2008; BLAS, 2015). O estresse pode ser causado por medo dos humanos (HEMSWORTH et al., 1994), pela captura, manejo e contenção no momento da amostra (ALM et al., 2014). Colher amostras de sangue após 2 minutos da contenção do animal aumenta a concentração de CORT significativamente, o que pode resultar em respostas não condizentes com a realidade (CHLOUPEK et al., 2011).

1.5 Medição de corticosteronas nas penas das aves

Devido às interferências que podem ser ocasionadas pelo estresse ao colher amostras de sangue para medir a CORT no soro sanguíneo, pesquisadores têm desenvolvido metodologias alternativas, evitando gerar estresse ou dor nas aves, por exemplo, a medição de metabólitos de glicocorticóides fecais (MOSTL et al., 2005) e medição de metabólitos de CORT nas penas (BORTOLOTTI et al., 2008). A técnica de medição de CORT nas penas foi desenvolvida por Bortolotti et al. (2008), para estimar o estresse em aves silvestres, usando como modelo a espécie *Alectoris rufa*, a partir desse momento têm sido realizadas diversas pesquisas para avaliar o estresse em aves (BORTOLOTTI et al., 2008).

Acredita-se que a CORT é depositada nas penas durante a fase de diferenciação celular, quando as penas estão em crescimento; assim, se incorporam às células que se tornam queratinizadas e pigmentadas através da difusão sanguínea até o cálamo (JENNI-EIERMANN et al., 2015; ROMERO e FAIRHURST, 2016). Consequentemente, é possível medir a CORT nas penas e relacioná-la com as experiências de estresse que o animal teve durante o período de crescimento da pena. Uma das principais vantagens de usar penas para medir a CORT é que elas fornecem uma retrospectiva, a longo prazo e íntegra da fisiologia da CORT (ROMERO e FAIRHURST, 2016).

A qualidade das penas é conhecida por refletir o estado de saúde das aves, com isso, a qualidade das penas também pode ser utilizada como indicador de bem-estar. A CORT estimula o rompimento das proteínas devido as penas serem constituídas principalmente por queratina, assim, quando há níveis altos de CORT no soro sanguíneo reflete negativamente

na estrutura e crescimento da pena (DESROCHERS et al., 2009; JENNI-EIERMANN et al., 2015).

Um fator importante para avaliar a eficácia da metodologia utilizada, é por meio da extração do hormônio presente na pena, pesquisadores têm replicado e ajustado a metodologia. Sabe-se que é possível extrair a CORT nas penas utilizando radioimunoensaio (RIA), ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ou cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (BORTOLOTTI et al., 2008; CARBAJAL et al., 2014; ROMERO e FAIRHURST, 2016; HAFFELIN et al., 2020). O estudo da CORT em penas tem gerado cada vez mais interesse nos pesquisadores; porém, a técnica é relativamente nova, sendo necessário pesquisas que a validem em diferentes espécies de aves (FISCHER et al., 2017).

Romero e Fairhurst (2016), relataram que os níveis de CORT flutuam dinamicamente, de acordo com a necessidade energética do animal e em resposta a fatores estressantes. Assim, acredita-se que a medição de CORT nas penas reflete o dinamismo da CORT durante o período de crescimento das penas, dessa forma, a CORT em penas é uma medida integrada ou total da CORT que foi depositada durante o crescimento da pena. Sabe-se que as penas maduras não recebem irrigação sanguínea, assim, quando a pena completa seu crescimento, o vaso sanguíneo do folículo passa à parte inferior da pele e isola a pena, devendo ser levado em consideração na hora de interpretar os resultados, pois as penas maduras não recebem deposição de CORT (GILL, 2007).

O período de crescimento das penas tem uma duração de dias a semanas, e varia segundo a espécie de ave, ambiente e estágio da pena. A CORT da pena fornece uma medida da fisiologia da CORT durante um período semelhante, entretanto, a ocorrência de quaisquer fatores estressantes a curto prazo (por exemplo, ataque de predador) não será refletido de forma específica, reduzindo a capacidade da técnica em detectar eventos de curta duração ou instantâneos (FAIRHURST et al., 2013). Assim, a medição da CORT nas penas torna-se relevante para estudar as respostas de variação ambiental e de fatores estressores que ocorreram em períodos prolongados, como por exemplo, clima, disponibilidade de alimentos, qualidade do ambiente, etc. (ROMERO E FAIRHURST, 2016).

Uma vantagem desta metodologia é que a colheita e o armazenamento são simples, sendo apenas necessário manter as penas limpas e secas, sem necessidade de refrigeração e podendo ser armazenadas em envelopes de papel ou plástico. Assim, evitaria o uso de

equipamentos especiais (centrífuga ou geladeira) na hora da colheita e de pessoal treinado para a colheita, facilitando o manejo e permitindo economizar tempo e dinheiro (BORTOLOTTI et al., 2008; BORTOLOTTI et al., 2009 ROMERO e FAIRHURST, 2016).

A medição de CORT nas penas é uma alternativa para evitar o estresse da colheita de sangue, entretanto, quando as penas são colhidas diretamente do animal, pode causar um impacto negativo mínimo na ave. No entanto, quando são utilizadas penas maduras, diminui a possibilidade de impactos negativos inesperados (por exemplo, hematomas devido à colheita) (ROMERO e FAIRHURST, 2016).

A escolha do tipo de pena a ser utilizado vai depender da pesquisa, entretanto, comumente são utilizadas penas primárias da asa, penas interescapulares e penas da cauda (FISCHER et al., 2020; HAFFELIN et al., 2020). A CORT pode variar de acordo com a massa da pena e sua distribuição pode ser desuniforme na pena (HARRIS et al., 2016; LATTIN et al., 2021), por isso, para que as amostras sejam consistentes para cada teste, o cálamo é removido de todas as penas, utilizando unicamente a raque e o vexilo da pena (FISCHER et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A preocupação com o bem-estar animal é constante entre consumidores, produtores e pesquisadores. Assim, as grandes empresas estão adotando diversas práticas para promoção do bem-estar em suas cadeias de produção, visando atender as exigências do mercado. Muitas destas ações baseiam-se em resultados de pesquisas obtidas em ambiente acadêmico.

Atualmente, existem diversas ferramentas para avaliar o estresse e o bem-estar dos animais de produção, no entanto, muitas dessas metodologias são invasivas, necessitando a manipulação do animal, gerando ainda mais estresse. O que, evidentemente, causa preocupação aos estudiosos, já que, com o objetivo de reduzir ou eliminar fontes de estresse, é necessário causá-lo. A metodologia comumente utilizada para avaliar o estresse em frangos de corte é a medição de corticosterona sérica, sendo necessário conter o animal para colher a amostra de sangue (ROMERO e FAIRHUST, 2016).

A alternativa vislumbrada neste estudo foi a adaptação e posterior validação de uma metodologia não invasiva para estimativa do teor de corticosterona circulante. Permitindo que, após estes procedimentos, a metodologia seja amplamente utilizada por pesquisadores

e produtores, eliminando uma fonte de estresse para a ave. A metodologia utilizada como base para o estudo foi aquela inicialmente descrita por Bortolotti et al. (2008), em que a corticosterona é estimada em penas de aves selvagens encontradas no chão.

O estudo descrito no C**apítulo II** intitulado “Corticosterona em penas: aplicação e validação da metodologia para frangos de corte” foi conduzido com o objetivo de aplicar uma metodologia utilizada para quantificar a CORT em aves selvagens e validar o uso dessa metodologia em frangos de corte. Este capítulo está formatado de acordo com as normas do periódico *PlosOne*, com exceção das tabelas, que estão inseridas no texto.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALM, M. et al. Corticosterone metabolites in laying hen droppings—Effects of fiber enrichment, genotype, and daily variations. **Poultry Science**, v. 93, n. 10, p. 2615–2621, out. 2014.

ALMEIDA PAZ, I. C. DE L. et al. Productivity and Well-Being of Broiler Chickens Supplemented With Probiotic. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, n. 4, p. 930–942, dez. 2019.

ALTINO, V. S.; NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. DA C. Monitoramento não invasivo do estresse em animais silvestres mantidos em cativeiro. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 19, n. 2, 7 jun. 2018.

AUGÈRE-GRANIER, M. L. The EU poultry meat and egg sector: Main factures, challenges and prospects. European Parliamentary Research Service, p. 1-23, 2019. doi:<10.2861/33350>.

BEAUMONT, C. et al. The European experience in poultry welfare—A decade ahead. **Poultry Science**, v. 89, n. 4, p. 825–831, abr. 2010.

BILAL, M. et al. Effects of novel probiotic strains of Bacillus pumilus and Bacillus subtilis on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, p. 100871, mar. 2021.

BLAS, J. Stress in birds. In **Sturkie's Avian Physiology**. San Diego, CA: Elsevier. p. 769-810, 2015

BORTOLOTTI, G. R. et al. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. **Functional Ecology**, v. 22, n. 3, p. 494–500, jun. 2008.

BORTOLOTTI, G. R. et al. Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 10, p. 1477–1482, 15 maio 2009.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 6, p. 524–526, 1986.

BROOM, D. M. Animal Welfare: An Aspect of Care, Sustainability, and Food Quality Required by the Public. **Journal of Veterinary Medical Education**, v. 37, n. 1, p. 83–88, mar. 2010.

BROOM, D. M.; FRASER, A. F. **Comportamento e bem-estar de animais domésticos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2010.

CARBAJAL, A. et al. Feather corticosterone evaluated by ELISA in broilers: A potential tool to evaluate broiler welfare. **Poultry Science**, v. 93, n. 11, p. 2884–2886, nov. 2014.

CEBALLOS, M. C.; SANT'ANNA, A. C. Evolução da ciência do bem-estar animal: Uma breve revisão sobre aspectos conceituais e metodológicos. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 16, p. 1, 28 ago. 2018.

CERTIFIED HUMANE. Certified Humane Brasil, 2018. **Empresas processadoras de alimentos recebem selo Certified Humane.** Disponível em:< https://certifiedhumanebrasil.org/empresas-processadoras-de-alimentos-selo-certified-humane/>. Acesso em: novembro de 2022.

CFMV. **Conselho Federal de Medicina Veterinária,** 2011. Portal da Legislação. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47542721/do1-2018-10-29-resolucao-n-1-236-de-26-de-outubro-de-2018-47542637 Acesso em: Abril 2023.

CHIOZZINI, T. F.; SOSTER, P. Efeito do estímulo multissensorial em frangos de corte sobre o teste de apanha e aproximação. In: VII Brazilian Congress of Biometeorology, Ambience, Behaviour and Animal Welfare "Environmental Responsibility and Innovation", Jaboticabal. **Anais**... Jaboticabal: 2016.

CHLOUPEK, P. et al. Changes in Selected Biochemical Indices Resulting from Various Pre-sampling Handling Techniques in Broilers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 31, dez. 2011.

CORNISH, A.; RAUBENHEIMER, D.; MCGREEVY, P. What We Know about the Public's Level of Concern for Farm Animal Welfare in Food Production in Developed Countries. **Animals**, v. 6, n. 11, p. 74, 16 nov. 2016.

DESROCHERS, D. W. et al. Exogenous and endogenous corticosterone alter feather quality. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 152, n. 1, p. 46–52, jan. 2009.

DUNCAN, I. J. H. Science-based assessment of animal welfare: Farm animals. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 24, n. 2, p. 483–492, 2005.

FAIRHURST, G. D. et al. Experimental relationships between levels of corticosterone in plasma and feathers in a free-living bird. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 21, p. 4071–4081, 1 nov. 2013.

FAWC. **Farm Animal Welfare Council, Farm Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future**. October 2009. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/publications/fawc-report-on-farm-animal-welfare-in-great-britain-past-present-and-future>. Acesso em: outubro de 2021.

FISCHER, C. P.; RAO, R.; ROMERO, L. M. Exogenous and endogenous corticosterone in feathers. **Journal of Avian Biology**, v. 48, n. 10, p. 1301–1309, out. 2017.

FROZZA, R. et al. Uso de probióticos e seus efeitos no bem-estar de aves de produção de ovos. **Pubvet**, v. 16, n. 7, p. 1–6, jul. 2022.

GADDE, U. et al. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal Health Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 26–45, jun. 2017.

GILL, F.B., 2007. **Ornithology**. W.H. Freeman e Co, New York

GOMES, R. C. C. et al. Metodologías e tecnologias para avaliar o bem-estar na avicultura. **PUBVET**, v. 4, n. 38, p. 1-20, 2010.

GRANT, A.; GAY, C. G.; LILLEHOJ, H. S. *Bacillus* spp . as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. **Avian Pathology**, v. 47, n. 4, p. 339–351, 4 jul. 2018.

GREEN, T. C.; MELLOR, D. J. Extending ideas about animal welfare assessment to include “quality of life” and related concepts. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 6, p. 263–271, 2011.

HÄFFELIN, K. E. et al. Corticosterone in feathers of laying hens: an assay validation for evidence-based assessment of animal welfare. **Poultry Science**, v. 99, n. 10, p. 4685–4694, out. 2020.

HARRIS, C. M.; MADLIGER, C. L.; LOVE, O. P. An evaluation of feather corticosterone as a biomarker of fitness and an ecologically relevant stressor during breeding in the wild. **Oecologia**, v. 183, n. 4, p. 987–996, abr. 2017.

HARRISON, R. **Animal Machines: The New Factory Farming Industry**. London: Vincent Stuart Publishers Ltd., 1964.

HEMSWORTH, P. H. et al. Behavioural responses to humans and the productivity of commercial broiler chickens. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 41, n. 1–2, p. 101–114, jul. 1994.

HUGHES, B. O. **Behaviour as an index of welfare**. In: 5th European Poultry Conference. 5-11 set 1976. Malta: World's Poultry Science Association (WPSA), p. 1005-1018, 1976

IANNETTI L, ROMAGNOLI S, COTTURONE G, PODALIRI VULPIANI M. Animal Welfare Assessment in Antibiotic-Free and Conventional Broiler Chicken. **Animals (Basel)**. 2021 Sep 27;11(10):2822.

JENNI-EIERMANN, S. et al. Corticosterone: effects on feather quality and deposition into feathers. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 237–246, fev. 2015.

KEELING, L. J. Indicators of Good Welfare. Em: **Encyclopedia of Animal Behavior**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 134–140.

LATTIN, C. R. et al. Elevated corticosterone in feathers correlates with corticosterone-induced decreased feather quality: a validation study. **J. Avian Biol.** V.42, p. 247-252 Agosto 2010

LOURENÇO DA SILVA, M. I. et al. Behaviour and animal welfare indicators of broiler chickens housed in an enriched environment. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0256963, 27 set. 2021.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Produção animal: **Boas Práticas de Produção Animal, Legislação.** Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/boas-praticas-de-producao-animal/legislacao>. Acesso em: Novembro de 2022.

MATTERI, R. L.; CARROLL, J. A.; DYER, C.J. Neuroendocrine responses to stress. – In: Moberg, G. and Mench, J., 1st edn. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.** CABI Publishing, p. 44–76. 2000

MCGLONE, J. J. Farm animal welfare in the context of other society issues: toward sustainable systems. **Livestock Production Science**, v. 72, n. 1–2, p. 75–81, nov. 2001.

MELLOR, D. J. Updating animal welfare thinking: Moving beyond the "five freedoms" towards "A lifeworth living". **Animals**, v. 6, n. 21, p. 1–20, 2016.

MELLOR, D.; BEAUSOLEIL, N. Extending the “Five Domains” model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states. **Animal Welfare**, v. 24, n. 3, p. 241–253, 1 ago. 2015.

MELLOR, D. J.; REID, C. S. W. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. In: BAKER, R.; JENKIN, G.; MELLOR, D. J. (Ed.). **Improving the well-being of animals in the research environment**. Glen Osmond: Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching, 1994. p. 3–18.

MOHAMMADIGHEISAR, M. et al. Growth performance and gastrointestinal responses in heavy Tom turkeys fed antibiotic free corn−soybean meal diets supplemented with multiple doses of a single strain Bacillus subtilis probiotic (DSM29784). **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p. 5541–5550, nov. 2019.

MORMÈDE, P. et al. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 3, p. 317–339, out. 2007.

MÖSTL, E.; RETTENBACHER, S.; PALME, R. Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds’ Droppings: An Analytical Approach. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1046, n. 1, p. 17–34, jun. 2005.

OIE. World Organisation for Animal Health: Protecting animals, preserving our future. Terrestrial Animal Health Code (Volume I: General Previsions). 28ed, 518p., 2019.

OTOVIC, P; HUTCHINSON, E. Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare. **ALTEX**, p. 41–50, 2015.

PARTECKE J, SCHWABL I, GWINNER E. Stress and the city: urbanization and its effects on the stress physiology in European blackbirds. **Ecology.** 2006.

PEREA, A. T.; ISAIAS, G. T.; MALDONADO, F. G. Técnicas de medición de estrés en aves. **Veterinaria México**, v. 28, n.4, p. 345-351, 1997.

PLAZAS, R. A. S. et al. Requerimientos para la medición de indicadores de estrés invasivos y no invasivos en producción animal. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 29, n. 1, p. 15–30, 14 mar. 2018.

RALPH, C. R.; TILBROOK, A. J. INVITED REVIEW: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 2, p. 457–470, 1 fev. 2016.

RAMLUCKEN, U. et al. Advantages of Bacillus-based probiotics in poultry production. **Livestock Science**, v. 241, p. 104215, nov. 2020.

ROMERO, L. M., & BUTLER, L. K. Endocrinology of stress. **International Journal of Comparative Psychology,** v. 20 (2-3), p. 89–95, 2007.

ROMERO, L. M.; FAIRHURST, G. D. Measuring corticosterone in feathers: Strengths, limitations, and suggestions for the future. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 202, p. 112–122, dez. 2016.

SHARMA, S. et al. Effect of melatonin administration on thyroid hormones, cortisol and expression profile of heat shock proteins in goats (Capra hircus) exposed to heat stress. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1–3, p. 216–223, maio 2013.

SOROKO, M.; ZABORSKI, D. Investigation of the effects of probiotic, Bacillus subtilis on stress reactions in laying hens using infrared thermography. **PLOS ONE**, v. 15, n. 6, p. e0234117, 11 jun. 2020.

TURNER A.I.; KEATING. C.L.; TILBROOK A.J. A. Sex Differences and the Role of Sex Steroids in Sympatho-Adrenal Medullary System and Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis Responses to Stress. Em: M. KAHN, S. (Ed.). **Sex Steroids**. [s.l.] InTech, 2012.

VAPNEK, J. C.; CHAPMAN, M. **Legislative and Regulatory Options for Animal Welfare**. Roma: FAO, 2010. p. 34

WANG, W. C. et al. Supplementation of Bacillus subtilis-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens1. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 5, p. 1654–1666, 4 maio 2018.

WAP. World Animal Protection, 2020. **Latinoamérica tiene una legislación débil en protección animal.** Disponível em:< https://www.worldanimalprotection.cr/noticias/latinoamerica-tiene-una-legislacion-debil-en-proteccion-animal-afirma-world-animal>. Acesso em: novembro de 2022

WAP. World Animal Protection, 2021. **Bem-estar animal pode contribuir para 9 dos 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável.** Disponível em: <https://www.worldanimalprotection.org.br/noticia/bem-estar-animal-pode-contribuir-para-9-dos-17-objetivos-do-desenvolvimento-sustentavel>. Acesso em: novembro de 2022

WEMELSFELDER, F.; MULLAN, S. Applying ethological and health indicators to practical animal welfare assessment: -EN- Applying ethological and health indicators to

practical animal welfare assessment -FR- L’utilisation d’indicateurs éthologiques et sanitaires pour l’évaluation concrète du bien-être animal -ES- Aplicación de indicadores etológicos y sanitarios a la evaluación práctica del bienestar animal. **Revue Scientifique et Technique de l’OIE**, v. 33, n. 1, p. 111–120, 1 abr. 2014.

WOLFGER, B. et al. Feeding behavior as an early predictor of bovine respiratory disease in North American feedlot systems. **Journal of Animal Science**, p. jas.2014-8030, 20 nov. 2014.

WHO – World Health Organization. **The evolving threat of antimicrobial resistance**. 2012.

CAPÍTULO II

“Corticosterona em penas: aplicação e validação da metodologia para frangos de corte”

“Corticosterona em penas: aplicação e validação da metodologia para frangos de corte”

Resumo

A metodologia comumente utilizada para quantificar os níveis de corticosterona em frangos de corte utiliza o soro sanguíneo, sendo que no momento da colheita do material, devido à contenção e punção, o animal sofre estresse, o que pode comprometer a qualidade do resultado obtido. Assim, o objetivo desse estudo foi aplicar uma metodologia utilizada para quantificar a corticosterona em aves selvagens e validar o uso dessa metodologia em frangos de corte. Para isso, utilizou-se 400 pintos de um dia, machos, da linhagem Ross AP95. Buscando promover diferenças acentuadas na produção e liberação de corticosterona, formou-se dois grupos de aves, compostos por quatro boxes com 50 aves cada, totalizando 400 frangos. Um dos grupos recebeu ração contendo antibiótico melhorador de desempenho e outro com frangos recebendo ração contendo probiótico comercial (Gallipro Fit®). No dia 20 de criação foram identificadas 5 aves em cada repetição, selecionadas entre 7% de variação do peso médio do grupo, sendo identificadas para garantia de coletas posteriores (34 e 40 dias) sempre nas mesmas aves. Houve diferenças entre os grupos para as concentrações de corticosterona nas penas a partir do dia 20 (p= 0,001), quando as penas da asa apresentaram na média geral maior concentração de corticosterona (22 ɲg/mL). Aos 34 e 40 dias as concentrações de corticosterona foram maiores nas penas das asas. A correlação de corticosterona no soro sanguíneo e nas penas foi positiva para todas as idades (r= 0,709). As penas das asas apresentaram correlações significativas no dia 20 (r = 0,852), 34 (r= 0,902) e 40 (r = 0,924). As penas do dorso tiveram correlações significativas menores (r= 0,525). As penas da cauda também tiveram correlações significativas (r = 0,694), sendo que no dia 40 apresentaram o maior valor (r = 0,752). Conclui-se que a medição de corticosterona nas penas é uma metodologia eficiente em frangos de corte, constituindo-se como uma ferramenta não invasiva para estimar os níveis de estresse em frangos de corte.

Introdução

O entendimento da senciência dos animais levou ao questionamento de como avaliar objetivamente o estresse para não afetar negativamente o bem-estar dos animais, usando para

tal, metodologias que minimizem o sofrimento. Nesse sentido, a pesquisa sobre o tema tornou-se imprescindível a fim de desenvolver metodologias de avaliação ainda menos invasivas e mais objetivas que aliem eficiência, confiabilidade dos resultados com minimização das angústias durante os procedimentos [1].

Existem metodologias para estimativa de estresse em animais, algumas ditas subjetivas, como o *Gait score*, teste de aproximação, teste de apanha, imobilidade tônica, entre outras [2,3] e metodologias objetivas, que normalmente são invasivas, como teores de serotonina, corticosterona, avaliações de qualidade óssea, entre outras [4,5], tais metodologias geralmente envolvem manipulação e contenção do animal, o que pode gerar desconforto e dor. Tal condição contrapõe-se ao objetivo das avaliações, tornando a coleta de dados uma ação crítica e necessária, porém danosa.

Na tentativa de evitar o estresse causado na hora da manipulação, alguns pesquisadores desenvolveram metodologias não invasivas para estimar o estresse e bem-estar animal [6,7]. Uma metodologia comumente utilizada é a mensuração de indicadores etológicos que permitem a avaliação de repetições de comportamentos naturais, atribuindo-lhes escores conforme o grau de alteração destes. Estas metodologias permitem que os pesquisadores e produtores consigam estabelecer a situação de bem-estar dos animais, além de avaliar a importância do manejo, ambiente, equipamentos, ingredientes e suplementos, entre outros, no grau de estresse dos animais [3,8].

É sabido que as metodologias para aferição do bem-estar em animais selvagens devem priorizar a não interferência humana na rotina destes; nesse sentido, pesquisadores desenvolveram metodologias para estimar a condição de estresse de aves selvagens avaliando níveis de metabólitos de corticosterona (CORT) em fezes, penas e ovos, pois essas moléculas, servem como indicadores biológicos de estresse [9,10]. A CORT é liberada em momentos de estresse por meio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), existindo um intervalo de tempo entre a circulação no sangue e o aparecimento da CORT em secreções ou penas [11].

Pesquisas desenvolvidas em aves selvagens demonstram que os níveis de CORT aumentados no soro sanguíneo refletem níveis maiores de CORT nas penas, todavia esta teoria, ainda não está validada para aves de produção [12-14].

Isto posto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de aplicar uma metodologia utilizada para quantificar a CORT em aves selvagens e validar o uso dessa metodologia em frangos de corte.

Material e métodos

O estudo foi conduzido nas instalações da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, localizada na latitude 22° 49' 07" S e longitude 48° 24' 40" W. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ (CEUA – 0170/2021).

Aves, instalações e manejo

Para a condução do estudo, foram adquiridos de um incubatório comercial 400 pintos de um dia, machos da linhagem Ross AP95.

As aves foram alojadas em um aviário experimental de pressão positiva, utilizando 8 boxes com área total de 4.5m² (3,0m de comprimento x 1,5m de largura). A densidade de criação foi ajustada em 11,11 aves por m² [15]. O arraçoamento foi realizado utilizando-se de comedouros tubulares com capacidade de 20kg, a oferta de água fez-se por bebedouros pendulares semiautomáticos.

As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja, seguindo as recomendações de Rostagno et al. [16], para desempenho médio-superior, as quais foram divididas em três fases distintas de criação, a saber: Inicial (1-21 dias), crescimento (22-35 dias) e final (36-42 dias). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

Delineamento experimental

A fim de quantificar os níveis de CORT em frangos com altos e baixos níveis de estresse, foram utilizados dois grupos, sendo um deles alimentado com rações contendo antibiótico melhorador de desempenho e outro grupo que recebeu rações contendo probiótico comercial melhorador de desempenho (Gallipro Fit®). Esta medida foi adotada segundo os relatos técnico-científicos [3,17], incluindo estudos conduzidos pela nossa equipe (GPAvícola da UNESP – FMVZ), nos quais, os probióticos proporcionam menor produção de CORT e elevada produção de serotonina (média de 450 ɲg/mL e 145ɲg/mL, respectivamente) em relação aos antibióticos, deixando os frangos mais calmos. Portanto, os

grupos foram utilizados para validação da metodologia proposta por Bortolotti et al. [12], para garantir que é possível detectar a CORT em aves que tenham baixos e altos níveis deste metabólito.

Sendo assim, neste trabalho as dietas utilizadas e os grupos formados não se caracterizaram como tratamento, mas sim como variáveis estudadas. Cada grupo foi composto por quatro boxes com 50 aves por boxe, totalizando 200 frangos por grupo. Para controle de coleta de material biológico ao 20º, 34º e 40º dia de criação, os grupos foram denominados: **AGP** – Animais alimentados com aditivo melhorador de desempenho a base de antibióticos e **BSP** – Animais alimentados com aditivo melhorador de desempenho a base de probióticos *Bacillus spp.*

Para a confecção das dietas do tratamento AGP utilizou-se avilamicina, seguindo a dosagem recomendada para cada fase de criação e, para o outro tratamento BSP, foi usado um probiótico comercial (Gallipro Fit®), composto por *Bacillus subtilis* (DSM32325), *Bacillus subtilis* (DSM 32324) e *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 25840), também administrado conforme a dosagem recomendada pelo fabricante, sem adição de antibióticos.

Coletas de amostras experimentais

Aos 20 dias de vida, 5 aves de cada parcela experimental (totalizando 20 aves por grupo), foram escolhidas dentro da média de peso de cada grupo, com variação máxima de 7% do peso. Essa medida foi utilizada a fim de evitar interferências do aditivo melhorador de desempenho na homogeneidade do peso. As aves selecionadas foram identificadas individualmente no dorso, com marcadores de diferentes cores. Esse procedimento teve a finalidade de assegurar uma acurada coleta de material biológico, garantindo assim, que as mesmas aves previamente selecionadas fossem avaliadas durante todo o estudo, até o 40º dia. Outra medida adotada para evitar variações nos níveis de CORT, principalmente no sangue, foi a realização das colheitas seguindo a mesma ordem de boxe e de aves dentro das repetições. As colheitas de material deram-se ao 20º, 34º e 40º dia de criação.

Os materiais biológicos colhidos para determinação da CORT e validação da metodologia em frangos de corte foram: sangue, penas da asa, penas do dorso e penas da cauda.

Peso vivo das aves

Após a retirada do material biológico ao 20º, 34º e 40º dia de criação, as 20 aves previamente identificadas em cada grupo de estudo foram pesadas individualmente em balança com 1,0 g de precisão.

O peso das 200 aves que constituíam cada grupo também foi determinado nos dias 20, 34 e 40 de criação, para comparar o desempenho entre os grupos.

Determinação da concentração de corticosterona em sangue

As coletas de sangue foram realizadas nas aves identificadas, em alíquotas de 5mL sempre no período da manhã. O sangue foi centrifugado e o soro separado, então envasado, identificado e armazenado em temperatura de -20°C até o proceder da análise por kit comercial de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), conforme a metodologia descrita por Harris et al. [18]. A fim de minimizar a possível influência do manejo de contenção de frangos nos níveis de CORT no soro sanguíneo, optou-se que fosse esse o primeiro material biológico obtido em cada coleta para evitar alterações nos níveis de corticosterona sanguíneo.

Determinação da concentração de corticosterona em penas

A obtenção das amostras de penas foi realizada imediatamente após a obtenção do sangue, procedendo de maneira padronizada nos três dias de colheita, ou seja, após a retirada de sangue, coletou-se sempre na mesma ordem de aves e local, penas da asa, dorso e cauda. Para tal foram retiradas duas penas secundárias da asa esquerda, duas penas do dorso e duas penas da cauda de cada animal previamente selecionado, sendo-as removidas desde o cálamo. As penas amostrais foram armazenadas em congelador, em envelopes identificados, até o início da análise [19].

Para a extração de CORT das penas utilizou-se da técnica modificada de metanol, descrita por Bortolotti et al. [12] removendo-se o cálamo e utilizando o raque e o vexilo das penas. Posteriormente, as penas foram trituradas em micro-moínho e homogeneizadas, para obtenção de amostras de 10mg, as quais foram fragmentadas em 5 réplicas de cada amostra. A obtenção da CORT foi possível após a diluição das amostras em metanol de alta pureza, esta solução foi colocada em banho ultrassônico por 30 minutos, seguindo para incubação por 12 horas em banho-maria a 50 °C, numa plataforma de vórtice. Após este período o

sobrenadante procedeu-se à separação da solução de metanol por filtração sob pressão. O metanol foi evaporado em banho maria a 40 °C. Finalmente, as amostras foram avaliadas com auxílio de kit comercial de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) [20].

Análise dos dados experimentais

Os dados foram avaliados utilizando o programa estatístico SAS 9.2 (2004). As variáveis utilizadas para estimar os níveis de corticosterona foram material biológico (penas e sangue) e grupo de aves (AGP e BSP). Os dados avaliados atenderam as pressuposições do modelo estatístico (normalidade e homogeneidade), portanto foram submetidos à ANOVA. O peso das aves foi comparado pelo teste T e os dados de concentração de CORT foram comparados pelo teste de Tukey ($p<0,05$). O teste de Pearson foi usado para determinar os coeficientes de correlação entre as concentrações de CORT utilizando as duas metodologias de coleta.

Foi obtida a média estratificada de todas as amostras (exceto o peso das aves), sem distinção de grupo, a fim de verificar se a metodologia seria eficiente para mensurar o teor de CORT em diferentes concentrações (baixa, média e alta).

Resultados e discussão

Peso das aves selecionadas para o estudo

O peso das aves utilizadas para a coleta de material biológico não apresentou diferenças significativas, independentemente do AMD utilizado (Tabela 1). O que nos permite inferir que a seleção das aves aos 20 dias de criação foi eficiente para eliminar possíveis efeitos da dieta no peso destes frangos. No entanto, a partir de 34 dias de criação, o peso médio dos grupos, considerando as 400 aves criadas, foi maior para aquelas que receberam probiótico como AMD ($p<0.05$) (Tabela 2). Devido ao interesse por alternativas ao uso de antibióticos que sejam viáveis economicamente, o uso dos probióticos na alimentação de frangos de corte é cada vez mais estudado, sendo reportado como um aditivo promissor que melhora o desempenho, a saúde e o bem-estar das aves. Os probióticos a base de *Bacillus* são reconhecidos por sua exclusão competitiva com bactérias patogênicas, o que permite uma melhor aderência no trato gastrointestinal, resultando em melhoras na digestão e absorção de nutrientes e, consequentemente, em melhoras no desempenho do animal [21].

No presente estudo o peso do grupo de frangos que receberam probiótico Gallipro Fit®, foi maior (3209 g) em comparação às aves que receberam antibiótico melhorador de desempenho (3102 g). Todavia, Keergin et al. [34] também encontraram melhorias no desempenho e qualidade intestinal de frangos de corte suplementados com probiótico *Bacillus subtilis*, que foram atribuídas a mudanças benéficas no equilíbrio intestinal.

Tabela 1. Peso vivo médio dos 20 frangos de corte de cada grupo, selecionados para amostragem, aos 20, 34 e 40 dias de criação.

Idade (dias)	Peso vivo (g)		CV	DP	p-valor
	AGP	BSP			
20	917	967	11,42	107,58	0,1138
34	2162	2250	12,54	276,63	0,8672
40	3154	3223	12,85	409,72	0,4934

AGP = antibiótico melhorador do desempenho. BSP = *Bacillus subtilis.* CV (%) = coeficiente de variação, DP= desvio padrão

Tabela 2. Peso vivo médio dos 200 frangos de corte que compuseram cada grupo, avaliados aos 20, 34 e 40 dias de criação.

Idade (dias)	Peso vivo (g)		CV	DP	p-valor
	AGP	BSP			
20	965	977	4,25	41,27	0,324
34	2123	2206	4,71	101,98	0,023
40	3102	3209	5,54	174,81	0,001

AGP = antibiótico melhorador de desempenho. BSP = *Bacillus subtilis.* CV (%) = coeficiente de variação, DP = desvio padrão.

Investigações realizadas utilizando *Bacillus subtilis* em dietas de aves mostraram melhoras nos parâmetros de desempenho, imunidade e saúde intestinal em frangos de corte [22]. Mohammadigheisar et al. [23], reportaram que o uso de *Bacillus subtilis* melhorou a conversão alimentar, além de aumentar a altura das vilosidades do intestino e a proporção vilo:cripta, o que, além dos benefícios anteriores, resultou num aumento da área de superfície de absorção intestinal e, consequentemente, forneceu uma melhor condição otimizando o aproveitamento de nutrientes.

Concentrações de corticosterona em diferentes penas

Houve diferenças ($p<0.05$) nas concentrações de CORT a partir da primeira coleta (20 dias de criação), quando as penas da asa apresentaram maior concentração de CORT (22 ŋg/mL) em comparação às penas do dorso e da cauda (12 ŋg/mL), tal comportamento foi

encontrado nos dois grupos de frangos utilizados. Entretanto, a partir do dia 34, foram encontradas diferenças ($p<0.05$) nas concentrações de CORT para todos os tipos de penas utilizados no estudo. A última coleta (dia 40 de criação) apresentou as maiores concentrações de CORT, quando as penas das asas tiveram a maior concentração (38 ɲg/mL) e as penas do dorso e da cauda não diferiram nas concentrações (21 ɲg/mL e 22 ɲg/mL respectivamente) (Tabela 3). Sabe-se que a metodologia para quantificação da CORT por meio das penas é associada aos níveis de CORT circulantes no soro sanguíneo, os quais, são depositados nas penas após picos de CORT sanguíneo, picos estes que são ocasionados pelo aumento do estresse nas aves [14].

Tabela 3. Concentração de corticosterona em soro sanguíneo e penas de frangos de corte.

Idade	Material biológico	Concentração de Corticosterona			CV (%)	p-valor
		Média	AGP	BSP		
20 dias	Soro sangue (ɲg/mL)	54^{b}	62^{a}	46^{c}	6,12	0,007
	Pena asa (ɲg/mL)	22^{b}	25^{a}	19^{b}	5,21	0,001
	Pena dorso (ɲg/mL)	12	14	10	5,4	0,421
	Pena cauda (ɲg/mL)	12	14	11	5,23	0,758
34 dias	Soro sangue (µg/Ml)	61^{b}	75^{a}	49^{b}	4,95	0,001
	Pena asa (ɲg/mL)	19^{c}	34^{a}	25^{b}	7,25	0,001
	Pena dorso (ɲg/mL)	14^{a}	13^{a}	11^{b}	5,36	0,002
	Pena cauda (ɲg/mL)	16b	18^{a}	15^{b}	4,99	0,053
40 dias	Soro sangue (ɲg/mL)	67^{b}	92^{a}	46^{c}	5,21	0,001
	Pena asa (ɲg/mL)	38^{b}	45^{a}	32^{b}	6,89	0,001
	Pena dorso (ɲg/mL)	21^{ab}	24^{a}	18^{b}	6,27	0,033
	Pena cauda (ɲg/mL)	22^{ab}	25^{a}	19^{b}	4,85	0,054
Media Geral	Soro sangue (ɲg/mL)	61^{ab}	77^{a}	47^{b}	5,30	0,001
	Pena asa (ɲg/mL)	26^{b}	35^{a}	25^{b}	6,22	0,001
	Pena dorso (ɲg/mL)	15^{a}	17^{a}	12^{b}	6,20	0,003
	Pena cauda (ɲg/mL)	15^{b}	19^{a}	15^{b}	5,98	0,002

AGP = antibiótico melhorador de desempenho. BSP = *Bacillus subtilis.* CV (%) = coeficiente de variação. Médias seguidas por letras diferentes, na linha entre os grupos, apresentaram diferenças entre si pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Acredita-se que a maior concentração de CORT nas penas das asas seja resultado do melhoramento genético empregado nas linhagens comerciais de frangos de corte, em que o empenamento rápido foi uma das características melhoradas. Os pintos de um dia, em sua maioria, nascem com penas de asas mais desenvolvidas que aves silvestres ou sem seleção, por isso, é possível atribuir as altas concentrações de CORT em penas das asas como

consequência do rápido empenamento nessa região em linhagens de frangos de corte. [24, 25]. Um estudo realizado com galinhas poedeiras mostrou que as penas da asa tiveram a maior concentração de corticosterona em relação a penas de outras regiões do corpo, corroborando os resultados do presente estudo [26].

Pesquisadores relataram que, principalmente as penas das asas e cauda, são usadas para voar e crescem de forma cíclica. Por isso, é esperado que as penas das asas e da cauda tenham a mesma taxa de crescimento, com a mesma exposição da CORT sanguínea e, consequentemente, as mesmas concentrações de CORT [12,27]. Porém, em frangos de corte as linhagens atuais sofreram intensa seleção genética, resultando em empenamento rápido, principalmente de asas [28]. Entretanto, neste estudo houve diferenças nas concentrações de CORT em penas da asa e cauda, quando as penas da asa apresentaram maiores concentrações com média geral de 26 ng/mg, por outro lado, as penas da cauda apresentaram concentrações menores de CORT (15 ng/mL) (Tabela 3).

Por outro lado, as penas que não são utilizadas para voo, ou seja, penas de cobertura e proteção, estão disponíveis em maiores quantidades e seu crescimento é interdependente da região do corpo em que estão localizadas, consequentemente, a distribuição da CORT pode diferir daquelas encontradas nas penas usadas para voar, ou seja, penas das asas e da cauda [26]. No entanto, as avaliações realizadas neste estudo apontam concentrações médias iguais para dorso e cauda.

Proporção de corticosterona entre sangue e penas

Buscando traçar um referencial entre a concentração de CORT em sangue e em penas, para que a metodologia seja utilizada em campo, sem que a interpretação seja equivocada, realizou-se a estimativa da porcentagem de CORT nas penas em relação ao sangue (medida de referência utilizada em avaliações), conforme a Tabela 4. Assim, considerou-se a concentração de CORT encontrada no soro sanguíneo como 100%.

A concentração de CORT em penas das asas foi aquela que apresentou maior proporção em relação ao sangue, com média de 48,6%, no período total de criação. Porcentagens semelhantes foram encontradas para penas de dorso e cauda, com valor aproximado de 24,6% no período total de criação. Como em situação comercial, quando as penas serão coletadas no piso do aviário, nem sempre é possível ter ciência da idade da ave quando aquela pena caiu, consideramos as médias gerais como referência para indicação de

uso da metodologia. Assim, a concentração de CORT adotada para pena das asas foi de 48,62% e para dorso e cauda, 24,59% daquela provavelmente encontrada em sangue.

Tabela 4. Variações encontradas entre os níveis de corticosterona no sangue e nas penas.

Idade	Material biológico	Variação (%) na Concentração de Corticosterona		
		Media dos grupos	AGP	BSP
20 dias	Soro de sangue	100	100	100
	Pena da asa	40,7	40,32	41,3
	Pena do dorso	22,2	22,6	21,7
	Pena da cauda	22,2	22,6	23,9
34 dias	Soro de sangue	100	100	100
	Pena da asa	47,2	45,3	51,0
	Pena do dorso	22,9	17,3	22,4
	Pena da cauda	26,2	24,0	30,6
40 dias	Soro de sangue	100	100	100
	Pena da asa	56,7	48,9	69,6
	Pena do dorso	31,3	26,1	39,1
	Pena da cauda	32,8	27,2	41,3
Período Total	Soro de sangue	100	100	100
	Pena da asa	48,6	45,4	53,2
	Pena do dorso	24,6	22,1	25,5
	Pena da cauda	24,6	24,7	31,9

Percebeu-se que a concentração de CORT foi afetada pelo tipo de aditivo melhorador de desempenho utilizado, resultados similares foram encontrados por Soroko et al. quando as galinhas suplementadas com probiótico *Bacillus* tiveram menores níveis de estresse [17]. No presente estudo, os frangos que receberam a suplementação com probiótico apresentaram menores concentrações de CORT sanguíneo, pelo que nos permitimos inferir que eram aves mais calmas e menos reativas. Assim, a quantificação da CORT nas penas foi possível inclusive quando as aves tinham menores concentrações de CORT no soro sanguíneo. É importante ressaltar que os níveis de CORT nas penas, representam a somatória da liberação de CORT pelo animal e que o estresse causado pelo manejo das aves para coleta de amostras foi igual para todas as aves estudadas. Por isso, as diferenças nas concentrações de CORT

no sangue e nas penas são devidas a maior resiliência das aves que receberam a suplementação probiótica.

A medição de CORT em penas apresenta numerosos benefícios, um dos principais é ser uma metodologia não invasiva sem a necessidade de contato direto com as aves [12,29,30], e sem o risco de ser diretamente influenciado pelo estresse agudo do manejo de coleta, como no caso do sangue. Alguns estudos demonstraram que a metodologia de extração de CORT das penas utilizada em aves selvagens, mostra-se eficiente para detectar a CORT [20,31]. E, a partir dos resultados obtidos neste estudo, a metodologia foi eficiente para determinar concentrações de CORT em frangos de corte.

Relação entre a corticosterona presente no soro sanguíneo e nas penas

Os resultados obtidos para correlação entre CORT no soro sanguíneo e nas penas foram positivas para todas as idades (Tabela 5). Corroborando os resultados obtidos nas demais avaliações, a correlação entre CORT no sangue e nas penas das asas foi positiva muito forte para o período total, sendo a maior correlação (r= 0,909) em relação às penas de dorso e cauda. Já para o dia 20 a correlação foi positiva forte (r= 0,852) e nos dias 34 e 40 a correlação foi positiva muito forte (r= 0,902 e r= 0,924 respectivamente). As penas do dorso apresentaram as menores correlações durante o presente estudo, sendo uma correlação positiva moderada e tiveram o menor valor (r= 0,525) durante o período total, as penas da cauda também tiveram uma correlação positiva moderada no período total (r= 0,694).

Pesquisas anteriores demostraram a correlação entre a CORT presente no soro sanguíneo e nas penas, todavia, os autores mencionaram a importância de levar em consideração na interpretação dos resultados que a CORT presente no soro sanguíneo representa o aumento de CORT de minutos a horas, enquanto a CORT presente nas penas representa os níveis acumulados de CORT em dias ou semanas [29,32]. Em seus estudos Lind et al. encontraram correlações de CORT baixas nas penas da cauda e no soro sanguíneo em aves da espécie *Carduelis chloris* [30]. Todavia, Haffelin et al. [26], apontaram diferenças para penas da cauda quando comparadas com penas de outras regiões em galinhas da linhagem *Lohmann Brown*, sendo que os maiores e menores níveis de CORT foram encontrados nas penas da cauda, corroborando a grande variação de respostas das penas da cauda que foram encontradas no presente estudo.

Pesquisadores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho, utilizando aves da espécie *Alectoris rufa*, que foram sometidas a manejos estressantes e a época de reprodução, assim, as correlações de CORT em penas e sangue foram boas, especialmente em períodos em que as aves estavam mais estressadas, como por exemplo, em período de postura [12,33].

Tabela 5. (r) entre os níveis de corticosterona presentes no soro de sangue e em penas de frangos de corte, em função do aditivo utilizado na dieta.

	Idade	Média			AGP			BSP		
		Asa	Dorso	Cauda	Asa	Dorso	Cauda	Asa	Dorso	Cauda
Soro de sangue*	20	0,852	0,512	0,693	0,838	0,700	0,759	0,909	0,772	0,839
	34	0,902	0,517	0,710	0,844	0,702	0,783	0,923	0,788	0,860
	40	0,924	0,626	0,752	0,863	0,704	0,837	0,941	0,793	0,890
	Período Total	0,909	0,525	0,694	0,859	0,699	0,791	0,955	0,791	0,861

AGP = Antibiótico melhorador de desempenho. BSP = *Bacillus subtilis.*

*Todas as correlações foram significativas. Correlação de Pearson ($p<0,05$).

A partir destes achados, sugere-se que sejam utilizadas preferencialmente as penas das asas, por apresentarem concentração de CORT maior, com melhores correlações com a CORT sanguínea e, devido a que no campo estas penas são mais facilmente identificadas. Assim, as penas poderiam ser coletadas diretamente do piso do aviário, sem ter a necessidade de manipular o animal. Além disso, é imperioso esclarecer que os níveis de CORT em penas são menores que aqueles encontrados no soro sanguíneo, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados obtidos para evitar imprecisões. Também recomendamos que sejam realizadas outras pesquisas avaliando a CORT em penas coletadas diretamente do piso do aviário.

Conclusão

Os resultados obtidos para teores de corticosterona em penas de frangos de corte e sua correlação com os teores deste indicador em sangue nos permitem concluir que a metodologia via avaliação de corticosterona em penas é eficiente para estimar o estresse em frangos de corte, principalmente quando utilizadas penas da asa.

Referências

1. Bestmann M, Koene P, Wagenaar J-P. Influence of farm factors on the occurrence of feather pecking in organic reared hens and their predictability for feather pecking in the laying period. Applied Animal Behaviour Science. 2009;121: 120–125. Doi:10.1016/j.applanim.2009.09.007
2. Alves M, Almeida Paz I, Nääs I, Garcia R, Caldara F, Baldo G, et al. Equilibrium Condition during Locomotion and Gait in Broiler Chickens. Rev Bras Cienc Avic. setembro de 2016;18(3):419–26.
3. Almeida Paz IC de L, de Lima Almeida IC, de La ® LT, Milbradt EL, Borges MR, Chaves GHC, et al. Productivity and Well-Being of Broiler Chickens Supplemented With Probiotic. Journal of Applied Poultry Research. 2019;28: 930–942. Doi:10.3382/japr/pfz054
4. Cattet M, Macbeth BJ, Janz DM, Zedrosser A, Swenson JE, Dumond M, et al. Quantifying long-term stress in brown bears with the hair cortisol concentration: a biomarker that may be confounded by rapid changes in response to capture and handling. Conservation Physiology. 16 de julho de 2014;2(1):cou026–cou026.
5. Iyasere OS, Beard AP, Guy JH, Bateson M. Elevated levels of the stress hormone, corticosterone, cause 'pessimistic' judgment bias in broiler chickens. Sci Rep. 31 de julho de 2017;7(1):6860.
6. Gomes RCC, Damasceno FA, Souza FF, Schiassi L, Café MB. [Methodologies and technologies to evaluate welfare in poultry] PubVet, 2010. 143; 4(38): 1-20. Portuguese.
7. Keeling LJ. Indicators of Good Welfare. Encyclopedia of Animal Behavior. Elsevier; 2019. Pp. 134–140. Doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.90715-5
8. Lourenço da Silva MI, Almeida Paz IC de L, Chaves GHC, Almeida IC de L, Ouros CC dos, Souza SRL, et al. Behaviour and animal welfare indicators of broiler chickens housed in an enriched environment. Yildirim A, organizador. PLoS ONE. 27 de setembro de 2021;16(9):e0256963.
9. Costa NSD, Marin RH, Busso JM, Hansen C, Navarro JL, Martella MB. Influence of the rearing system on yolk corticosterone concentration in captive Greater Rheas

(*Rhea americana*): Yolk Corticosterone in Greater Rheas. Zoo Biology. 2016;35: 246–250. Doi:10.1002/zoo.21276

10. Plazas RAS, Plazas Hernández FA, Trujillo Piso DY, Pérez Rubio M del R, Peñuela Sierra LM, DiGiacinto A. Requerimientos para la medición de indicadores de estrés invasivos y no invasivos en producción animal. Rev 46 investing vet Perú. 2018;29: 15–30. doi:10.15381/rivep.v29i1.14195
11. Altino VS, Nogueira-Filho SLG, Nogueira SS da C. Monitoramento não invasivo do estresse em animais silvestres mantidos em cativeiro. Revista Brasileira de Zoociências [Internet]. 7 de junho de 2018 [citado 12 de dezembro de 2022];19(2). Disponível em: https://periodicos.ufjf.br/index.php/zoociencias/article/view/24760
12. Bortolotti GR, Marchant TA, Blas J, German T. Corticosterone in feathers is a long-term, integrated measure of avian stress physiology. Functional Ecology. 2008;22: 494–500. Doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01387.x
13. Rotman YA, Buchanan KL, Klaassen M, Buttemer WA. An experimental examination of interindividual variation in feather corticosterone content in the house sparrow, Passer domesticus in southeast Australia. General and Comparative Endocrinology. 2017;244: 93–100. doi:10.1016/j.ygcen.2015.12.010
14. Jenni-Eiermann S, Helfenstein F, Vallat A, Glauser G, Jenni L. Corticosterone: effects on feather quality and deposition into feathers. Fisher D, editor. Methods Ecol Evol. 2015;6: 237–246. doi:10.1111/2041-210X.12314
15. Aviagen. Management Handbook for Broilers. 2018. Avaliable from: http://www.aviagen.com
16. Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, et al. Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos. 4th ed. Rostagno HS, editor. Viçosa: Departamento de Zootecnia, UFV; 2017.
17. Soroko M, Zaborski D. Investigation of the effects of probiotic, Bacillus subtilis on stress reactions in laying hens using infrared thermography. Kogut MH, organizador. PLOS ONE. 11 de junho de 2020;15(6):e0234117.
18. Harris CM, Madliger CL, Love OP. An evaluation of feather corticosterone as a biomarker of fitness and an ecologically relevant stressor during breeding in the wild. Oecologia. 2017;183: 987–996. Doi:10.1007/s00442-017-3836-1

19. Berk SA, McGettrick JR, Hansen WK, Breuner CW. Methodological considerations for measuring glucocorticoid metabolites in feathers. Conserv Physiol. 2016;4: cow020. Doi:10.1093/conphys/cow020
20. Häffelin KE, Lindenwald R, Kaufmann F, Döhring S, Spindler B, Preisinger R, et al. Corticosterone in feathers of laying hens: an assay validation for evidence-based assessment of animal welfare. Poultry Science. 2020;99: 4685–4694. doi: 10.1016/j.psj.2020.06.065
21. Ramlucken U, Ramchuran SO, Moonsamy G, Jansen van Rensburg C, Thantsha MS, Lalloo R. Production and stability of a multi-strain Bacillus based probiotic product for commercial use in poultry. Biotechnology Reports. 2021;29: e00575. doi:10.1016/j.btre.2020.e00575
22. Bilal M, Si W, Barbe F, Chevaux E, Sienkiewicz O, Zhao X. Effects of novel probiotic strains of Bacillus pumilus and Bacillus subtilis on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. Poultry Science. 2021;100: 100871. Doi:10.1016/j.psj.2020.11.048
23. Mohammadigheisar M, Shirley RB, Barton J, Welsher A, Thiery P, Kiarie E. Growth performance and gastrointestinal responses in heavy Tom turkeys fed antibiotic free corn−soybean meal diets supplemented with multiple doses of a single strain Bacillus subtilis probiotic (DSM29784). Poultry Science. 2019;98: 5541–5550. doi:10.3382/ps/pez305
24. Khosravinia H, Manafi M. Broiler chicks with slow-feathering (K) or rapid-feathering (k+) genes: Effects of environmental stressors on physiological adaptive indicators up to 56 h posthatch. Poultry Science. 2016;95: 1719–1725. doi:10.3382/ps/pew107
25. Noubandiguim M, Erensoy K, Sarica M. Feather growth, bodyweight and body temperature in broiler lines with different feathering rates. SA J An Sci. 2021;51. doi:10.4314/sajas.v51i1.10
26. Häffelin KE, Kaufmann F, Lindenwald R, Döhring S, Spindler B, Preisinger R, et al. Corticosterone in feathers: Inter- and intraindividual variation in pullets and the importance of the feather type. Veterinary and Animal Science. 2021;11: 100155. doi:10.1016/j.vas.2020.100155

27. Strong RJ, Pereira MG, Shore RF, Henrys PA, Pottinger TG. Feather corticosterone content in predatory birds in relation to body condition and hepatic metal concentration. General and Comparative Endocrinology. 2015;214: 47–55. doi:10.1016/j.ygcen.2015.03.002
28. Macari M, Mendes AA. Manejo de Matrizes de Corte. 2005
29. Romero LM, Fairhurst GD. Measuring corticosterone in feathers: Strengths, limitations, and suggestions for the future. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2016;202: 112–122. doi:10.1016/j.cbpa.2016.05.002
30. Lind M-A, Hõrak P, Sepp T, Meitern R. Corticosterone levels correlate in wild-grown and lab-grown feathers in greenfinches (Carduelis chloris) and predict behaviour and survival in captivity. Hormones and Behavior. 2020;118: 104642. doi:10.1016/j.yhbeh.2019.104642
31. Carbajal A, Tallo-Parra O, Sabes-Alsina M, Mular I, Lopez-Bejar M. Feather corticosterone evaluated by ELISA in broilers: A potential tool to evaluate broiler welfare. Poultry Science. 2014;93: 2884–2886. doi:10.3382/ps.2014-04092
32. Lattin CR, Reed M, DesRochers DW, Romero LM. Eçevated corticosterone in feathers correlates with corticosterone-induced decrease feather quality: a validation study. J Avian Biol. 2010 Nov 42: 247-252. doi: 10.1111/j.1600-048X.2010.05310.x
33. Leishman EM, van Staaveren N, Mohr J, Wood BJ, Freeman NE, Newman AEM, et al. The Effect of Egg Laying on Feather and Plasma Corticosterone Concentrations in Turkey (Meleagris gallopavo) Hens. Animals. 2021;11: 1892. doi:10.3390/ani11071892
34. Keerqin C, Rhayat L, Zhang ZH, Gharib-Naseri K, Kheravii SK, Devillard E, Crowley TM, Wu SB. Probiotic Bacillus subtilis 29,784 improved weight gain and enhanced gut health status of broilers under necrotic enteritis condition. Poult Sci. 2021 Apr;100(4):100981. doi: 10.1016/j.psj.2021.01.004.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

A metodologia para medir a corticosterona (CORT) em penas demostrou ser efetiva e pode ser utilizada para estimar o estresse em frangos de corte, principalmente quando utilizadas as penas das asas. Somado a isso, a metodologia visa facilitar o trabalho dos pesquisadores, já que as penas da asa são facilmente identificadas no lote, permitindo a coleta de penas no piso do aviário causando menor estresse e sofrimento aos mesmos.

A partir deste estudo, pesquisas futuras podem ser realizadas para adaptar e validar a metodologia em outras espécies de aves comerciais, assim será possível medir o bem-estar na indústria avícola de uma forma menos cruenta. Estudos futuros podem ser realizados visando avaliar outros metabolitos em penas, como por exemplo a serotonina, evitando interferências do manejo no resultado.