UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA
Programa de Pós-graduação em Agronegócio e Desenvolvimento

FERNANDA PAES DE OLIVEIRA BORELI

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE O DESEMPENHO E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE GALINHAS POEDEIRAS

TUPÃ
2024

FERNANDA PAES DE OLIVEIRA BORELI

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO SOBRE O DESEMPENHO E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE GALINHAS POEDEIRAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronegócio e Desenvolvimento da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Tupã, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Agronegócio e Desenvolvimento
Linha de pesquisa: Competitividade de Sistemas Agroindustriais

Orientador:
Prof. Dr. Danilo Florentino Pereira
Coorientadores:
Prof. Dr. Felipe André dos Santos
Prof. Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello

TUPÃ

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação da FCE – Unesp, Câmpus Tupã:

B731e

Boreli, Fernanda Paes de Oliveira.
Efeito do estresse térmico sobre o desempenho e parâmetros fisiológicos de galinhas poedeiras/ Fernanda Paes de Oliveira Boreli. – Tupã: [s.n.], 2024.
110 f. : il.

Tese (Doutorado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Universidade Estadual Paulista UNESP – Faculdade de Ciências e Engenharia, 2024.

Orientador: Danilo Florentino Pereira
Coorientador: Felipe André dos Santos
Coorientador: Ricardo Velludo Gomes de Soutello

1. Aclimatação. 2. Ambiência. 3. Epigenética. 4. Hemograma. 5. Qualidade de ovos. I. Título. II. Autor.

Fonte: Eliana Kátia Pupim, bibliotecária CRB 8 – 6202. Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Dada a importância econômica da avicultura de postura, e tendo em vista o impacto do estresse por calor sobre a produção e bem-estar das aves, conhecer o processo adaptativo de poedeiras se torna importante para projeto de instalações e sistemas de climatização adequados para esses animais. Estudos avaliando os parâmetros sanguíneos, as alterações biológicas, o desempenho produtivo e a qualidade de ovos de galinhas poedeiras sob estresse por calor contribuem para a nossa compreensão de como esse tipo de organismo responde aos desafios, quais são os mecanismos adotados e em quanto tempo observamos uma adaptação consistente ao ambiente. Nosso estudo mostrou que a estratégia de adaptação foi diferente entre as linhagens, porém com tempos de resposta semelhantes, mostrando que esses estímulos interferem a nível biológico desencadeando alterações que moldam a capacidade do indivíduo em interagir com o meio ambiente. Esta pesquisa contribui para futuros estudos que visam esclarecer os mecanismos adaptativos das galinhas poedeiras, possibilitando diferenciar linhagens de poedeiras a partir da resposta adaptativa.

Potential impact of this research

Given the economic importance of laying poultry farming, and taking into account the impact of heat stress on the production and well-being of birds, knowing the adaptive process of laying hens becomes important for designing facilities and air conditioning systems suitable for these animals. . Studies evaluating blood parameters, biological changes, productive performance and egg quality of laying hens under heat stress contribute to our understanding of how this type of organism responds to challenges, what mechanisms are adopted and how long we observe consistent adaptation to the environment. Our study showed that the adaptation strategy was different between the lineages, but with similar response times, showing that these stimuli interfere at a biological level, triggering changes that shape the individual's ability to interact with the environment. This research contributes to future studies that aim to clarify the adaptive mechanisms of laying hens, making it possible to differentiate laying hen lineages based on the adaptive response.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Efeito do estresse térmico sobre o desempenho e parâmetros fisiológicos de galinhas poedeiras

AUTORA: FERNANDA PAES DE OLIVEIRA BORELI
ORIENTADOR: DANILO FLORENTINO PEREIRA
COORIENTADOR: RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO
COORIENTADOR: FELIPE ANDRÉ DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANILO FLORENTINO PEREIRA (Participaçao Presencial)
Departamento de Gestão, Desenvolvimento e Tecnologia / Faculdade de Ciências e Engenharia - FCE - UNESP - Tupã/SP

gov.br Documento assinado digitalmente
RODRIGO GAROFALLO GARCIA
Data: 28/05/2024 19:19:53-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. RODRIGO GAROFALLO GARCIA (Participaçao Virtual)
Programa de Pós-graduação em Agronegócio / Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD - Dourados/MS

gov.br Documento assinado digitalmente
KESIA OLIVEIRA DA SILVA MIRANDA
Data: 28/05/2024 21:50:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof.ª Dr.ª KÉSIA OLIVEIRA DA SILVA MIRANDA (Participaçao
Docente do Curso de Engenharia de Biossistemas / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz - ESALQ - USP - Piracicaba/SP

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCIANE SILVA MARTELLO
Data: 29/05/2024 08:49:47-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. LUCIANE SILVA MARTELLO (Participaçao Virtual)
Docente do Curso de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA - USP - Pirassununga/SP

Profa. Dra. IRENILZA DE ALENCAR NÄÄS (Participaçao Virtual)
Docente do Curso de Engenharia de Produção / Universidade Paulista - UNIP - São Paulo/SP

Tupã, 27 de maio de 2024

CamScanner

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão do doutorado a Deus, que abriu as portas deste doutorado me dando a oportunidade de concluir essa titulação tão almejada, dando-me força e resiliência para prosseguir colocou pessoas especiais para me ajudar.

Dedico ao meu esposo Rafael dos Santos Boreli, pelo apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos na realização deste trabalho.

Por fim, dedico aos meus familiares pelo apoio e carinho durante toda a minha existência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de poder fazer um doutorado numa instituição renomada e que eu tanto estimo. Agradeço pela força e pela persistência, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Agradeço a Ele também por ter colocado pessoas especiais nessa minha trajetória, que me ajudaram a realizar este trabalho tão importante para a minha vida.

Agradeço ao meu esposo Rafael Boreli do Santos, pelo incentivo, apoio, compreensão, força, motivação em todo o momento, nunca permitiu que eu desistisse e não mediu esforços para me ajudar de todas as formas.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio, incentivo e força, e a pastora e psicanalista Elisangela de Araujo Silva pelos conselhos fornecidos.

Agradeço ao meu orientador Dr. Danilo Florentino Pereira pela oportunidade, orientações, conselhos e ensinamentos.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello pelo incentivo, inspiração do tema Metilação Global do DNA e apoio nas análises laboratoriais.

Agradeço a professora Drª. Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues pela orientação nas análises de Metilação Global do DNA e ao Dr. Felipe André dos Santos pela coorientação.

Agradeço a colega de profissão, companheira de doutorado e amiga Silvana Gomes Gonzalez, que me incentivou a fazer o doutorado nesta instituição e me forneceu todo apoio desde a inscrição até a finalização, além de moradia, parceria, conselhos e florais terapêuticos, ensinamentos das técnicas e realização das análises laboratoriais.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Agronegócio e Desenvolvimento pela oportunidade e aos professores das disciplinas cursadas no programa.

Agradeço ao avicultor Victor Antonio Veroneze Dourado e a Granja Dourado, que cedeu as aves, ração e outros insumos e assistência necessária durante a realização do trabalho, imprescindíveis para esse estudo, e ao avicultor Márcio Roberto Visintin e a Granja Santa Barbara, pela doação das aves e insumos para o projeto piloto.

Agradeço a Drª. Nilce Maria Soares pelos ensinamentos de manejo e procedimentos experimentais.

Agradeço aos estagiários, bolsistas de Iniciação Científica e demais colaboradores Luma Oliveira Escaliante, Ariadne Ramos Gomes, Eric Hideki, Danilo Damasceno Santana

Allegretti, José Augusto Marques, Isaac Lembi Solis. Essas pessoas são muito especiais, dedicadas e participaram de todas as etapas do trabalho com muito empenho e dedicação.

Agradeço aos alunos Mariana Fortes Garib da Silva, Ariane Luiza Estela, Vitória Takigava Silva, Isabela Sakaguchi Barbaroto, Rafaella de Mattos Martin, João Vitor Peixoto, Isabela Menon e José Guilherme Vieira Gomes, da Faculdade de Medicina Veterinária de Adamantina – Centro Universitário de Adamantina - Fai pelo auxílio na realização das atividades de coleta de sangue e processamentos das amostras.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio pesquisador que possibilitou a realização desta pesquisa (processo n° 2020/14885-8).

BORELI, Fernanda Paes de Oliveira. **Efeito do estresse térmico sobre o desempenho e parâmetros fisiológicos de galinhas poedeiras**. 2024. 110p. Tese (Doutorado em Agronegócio e Desenvolvimento) – Faculdade de Ciências e Engenharia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Tupã, 2024.

RESUMO

As aves são animais sensíveis as altas temperaturas e seu organismo rapidamente passa por mudanças para manter o equilíbrio fisiológico e se adaptarem as novas condições. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi estudar as alterações fisiológicas e biológicas de galinhas poedeiras submetidas a estresse por calor, resultantes dos mecanismos de compensação para a manutenção da homeostase, e avaliar o tempo necessário para adaptação das aves ao novo ambiente térmico. O experimento foi realizado em duas câmaras climáticas com 192 aves, 96 Dekalb White e 96 Dekalb Brown, e foi repetido duas vezes em ciclos de 28 dias. Na primeira repetição, as aves estavam com 34 semanas de idade e, na segunda, com 45 semanas de idade. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2×2, sendo dois tratamentos de temperatura (Estresse por calor e Conforto) e duas linhagens, e em parcelas subdivididas. Semanalmente, foi aferido o peso, a temperatura retal, coletado amostras de sangue para análise de hemograma completo e conteúdo de metilação global do DNA. A produção de ovos foi contabilizada diariamente e os ovos dos primeiros e últimos três dias de cada repetição tiveram sua qualidade analisada. Os resultados mostraram que a produção de ambas as linhagens teve queda acentuada durante a primeira semana de estresse térmico, recuperando a produção a partir da segunda semana, sendo que para a linhagem Dekalb White a viabilidade equiparou ao patamar de conforto, e a linhagem Brown permaneceu cerca de 10% inferior. O estresse por calor elevou a temperatura corporal, e reduziu o consumo de ração, o peso das aves e o peso do ovo em ambas as linhagens. A qualidade da casca piorou para a linhagem Dekalb White. O estresse elevou o cloro, mas não afetou os demais parâmetros sanguíneos avaliados. Aos 28 dias de experimento, a linhagem Dekalb Brown apresentou níveis maiores de leucócitos e hematócrito e menor concentração de cloro e sódio quando comparada à linhagem Dekalb White. Os níveis de leucócitos, proteína plasmática, sódio e cálcio iônico permaneceram acima dos valores de referência para as duas linhagens. Não houve diferença no conteúdo da metilação global entre os tratamentos de temperatura, mas apresentou diferença significativa entre as linhagens aos 28 dias de experimento. Conclui-se que as estratégias de adaptação foram distintas entre as linhagens, com indícios de que o processo adaptativo das poedeiras pode ocorrer na primeira semana ao estímulo por calor, e com possibilidade de manutenção da produção e da qualidade dos ovos a partir da segunda semana. Os parâmetros sanguíneos comprovaram que as poedeiras estudadas nesse trabalho foram resistentes ao desafio ambiental proposto, demonstrando capacidade fisiológica e biológica necessária para a adaptação ao estresse por calor crônico.

Palavras-chave: Aclimatação. Ambiência. Epigenética. Hemograma. Qualidade de ovos.

BORELI, Fernanda Paes de Oliveira. **Effect of heat stress on the performance and physiological parameters of laying hens**. 2024. 110p. Doctoral dissertation (Doctorate in Agribusiness and Development – Agribusiness and Development Program) School of Sciences and Engineering, São Paulo State University (UNESP), Tupã, 2024.

ABSTRACT

Birds are animals sensitive to high temperatures and their bodies quickly undergo changes to maintain physiological balance and adapt to new conditions. Thus, the objective of this research was to study the physiological and biological changes in laying hens subjected to heat stress, resulting from compensation mechanisms for maintaining homeostasis, and to evaluate the time required for the hens to adapt to the new thermal environment. The experiment was carried out in two climate chambers with 192 hens, 96 Dekalb White and 96 Dekalb Brown, and was repeated twice in cycles of 28 days. In the first repetition, the hens were 34 weeks old and, in the second, 45 weeks old. The experimental design was in randomized blocks, in a 2×2 factorial scheme, with two temperature treatments (Heat Stress and Comfort) and two strains, and in split plots. Weight and rectal temperature were measured weekly and blood samples were collected for complete blood count and DNA methylation analysis. Egg production was registered daily and eggs from the first and last three days of each repetition had their quality analyzed. The results showed that the production of both strains had a sharp drop during the first week of heat stress, with production recovering from the second week onwards, with the Dekalb White line viability being equal to the comfort level, and the Brown line remaining around 10% lower. Heat stress increased body temperature and reduced feed intake, hen weight and egg weight in both strains. Eggshell quality worsened for the Dekalb White strain. Stress increased chlorine but did not affect the other blood parameters evaluated. At 28 days of experiment, the Dekalb Brown strain showed higher levels of leukocytes and hematocrit and lower concentrations of chlorine and sodium when compared to the Dekalb White strain. Levels of leukocytes, plasma protein, sodium and ionic calcium remained above reference values for both strains. There was no difference in methylation between temperature treatments, but there was a significant difference between strains at 28 days of experiment. It is concluded that the adaptation strategies were different between the strains, with evidence that the adaptive process of layers can occur in the first week to heat stimulation, and with the possibility of maintaining production and egg quality from the second week onwards. Blood parameters proved that the layers studied in this work were resistant to the proposed environmental challenge, demonstrating the physiological and biological capacity necessary for adaptation to chronic heat stress.

Keywords: Acclimatization. Ambience. Epigenetics. Blood count. Egg quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Aves da linhagem Dekalb White (a) e Dekalb Brown (b) alojadas na granja. 18
Figura 1.2. Parâmetros ambientais das condições pré-experimentais das aves ainda na granja, desde o nascimento das aves até a coleta de sangue na granja.....18
Figura 1.3. Aves nas gaiolas no interior da câmara climática e comedouro tipo calha (a) e (b). 19
Figura 1.4. Cronograma das atividades de pesagem, temperatura retal e coleta de sangue. ...22
Figura 1.5. Aferição do peso (a) e da temperatura interna das aves (b). 22
Figura 1.6. Coleta de sangue da veia ulnar debaixo da asa (a) e venopunção femoral na face posterior da tíbia (b). 23
Figura 1.7. Verificação da glicose através do kit accu-chek guide (a), tubos de 0,5 mL com EDTA. 24
Figura 1.8. Leitura manual do hematócrito. 24
Figura 1.9. Confecção dos capilares (a), capilares dentro da centrífuga (b), Centrífuga Fanem de Microhematócritos Mod.100® (b) e (c). 24
Figura 1.10. Câmara de Neubauer preparada, contador celular (a), microscópio de luz e tubos de ensaio com amostras diluídas (seta preta) (b), hemácias no microscópio aumento 40× (c).....25
Figura 1.11. Amostras de sangue com diluente para determinação da hemoglobina (a) e máquina BioPlus® (b).....26
Figura 1.12. Eletrodo seletivo (IonPro®) para avaliação do pH e dos eletrólitos do soro.....26
Figura 1.13. Adição de 10 µL de proteinase K em tubos de eppendorf com 10 µL de sangue (a), agitação da amostra em vórtex (b), amostras incubadas na estufa (c). 27
Figura 1.14. Centrifugação das amostras (a), fluxo da amostra para descarte (seta preta) no tubo de coleta e coluna de purificação de DNA pré-inserida (seta vermelha) (b).....28
Figura 1.15. Pipetagem do tampão de lavagem (a), microcentrífuga NT 805 Nova Técnica® (b), tubo de coleta e coluna de purificação de DNA pré-inserida com descarte do fluxo (seta preta) (b).....28
Figura 1.16. Adição de 50 µL do anticorpo Anti-5MedCyd (a), Lavagem da placa com solução de lavagem (b) e adição do anticorpo secundário diluído (b). 30
Figura 1.17. Leitura da placa, PowerWav XS Microplate Reader (Biotek®) (a e b).....31
Figura 1.18. Armazenamento dos ovos em bandejas plásticas. 31

Figura 1.19. Recipiente com solução salina utilizados para registro da gravidade específica dos ovos (a), equipamento DET-6000® utilizado para a análise da qualidade dos ovos, e aferição da altura do albúmen, unidade Haugh (b), e paquímetro para medição da espessura da casca dos ovos (c). 32
Figura 2.1. Relação do estresse térmico com alterações fisiológicas e bioquímicas em frangos. HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: Adaptado de Nawaz et al. (2021). 36
Figura 2.2. Regulação gênica - transcrição do DNA em RNA mensageiro (RNAm) (a), supressão da expressão gênica (b), metilação do DNA, adição do grupo metil pela enzima DNMT (DNA metiltransferase) à citosina na sequência do DNA. Fonte: Adaptado de Gudsnuk & Champagne (2011, p.705)..... 44
Figura 3.1. Gráfico de ganho de peso semanal das linhagens Dekalb White e Dekalb Brown submetidas aos tratamentos de conforto e estresse por calor. 73
Figura 3.2. Gráfico da ração não consumida diária para os tratamentos de conforto e estresse por calor, para a primeira repetição (esquerda) e segunda repetição (direita). 74
Figura 3.3. Gráficos de variação da temperatura retal das aves Dekalb White e Dekalb Brown submetidas aos tratamentos de conforto e estresse por calor. 75
Figura 3.4. Gráfico de viabilidade média entre as duas fases experimentais e gaiolas de cada tratamento de temperatura para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown. Do dia 1 ao 7 – período de adaptação (pré-experimento), seguidos dos dias experimentais..... 76
Figura 4.1. Fluxograma da análise de metilação global do DNA. 91
Figura 4.2. Gráficos de intervalo de confiança para as variáveis A) hemácias, B) hemoglobina, C) hematócritos, D) leucócitos, E) proteínas totais e F) glicose, para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown. 93
Figura 4.3. Diferenças médias observadas para os parâmetros do hemograma, entre D28 e D1, para cada linhagem e tratamento experimental. 95
Figura 4.4. Gráficos de variação semanal dos parâmetros A) potássio, B) sódio, C) cloro total, D) cálcio iônico e E) pH, para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown. 96
Figura 4.5. Diferença percentual de metilação global do sangue observada entre os dias de coleta D28 e D1 para os fatores experimentais combinados de temperatura e linhagem. 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Distribuição aleatória dos tratamentos e das subparcelas nas câmaras climáticas. 20

Tabela 1.2. Composição da dieta em quilos e percentual nutricional da ração utilizada para as aves durante o experimento. 21

Tabela 2.1. Contagem de eritrócitos obtidos em diferentes situações de estresse em poedeiras e frango de corte. 42

Tabela 3.1. Teste de comparação de médias do peso (kg) das galinhas para cada dia de pesagem, tratamento de temperatura e linhagem. 73

Tabela 3.2. Teste de comparação de médias da temperatura retal (ºC) das galinhas para cada dia de medição, tratamento de temperatura e linhagem. 75

Tabela 3.3. Resultado do teste *t* pareado da viabilidade de produção (%) para cada linhagem e condição de temperatura, considerando as duas fases experimentais. 77

Tabela 3.4. Resultado do teste χ^2 entre os tratamentos de temperatura para o número de observações de ovos trincados durante os 28 dias de experimento, considerando seis gaiolas para cada linhagem e as duas fases experimentais. 77

Tabela 3.5. Resultado do teste t-Student entre os tratamentos de temperatura conforto e estresse para as variáveis de qualidade dos ovos. 78

Tabela 4.1. Valores e funções de parâmetros hematológicos e bioquímicos de galinhas descritos na literatura 90

Tabela 4.2. Resultado da ANOVA para as variáveis do hemograma entre os níveis de cada fator experimental para os dados observados em D28. 94

Tabela 4.3. Resultado da ANOVA e teste de comparação dos eletrólitos do sangue entre os níveis de cada fator experimental para os dados observados em D28. 97

Tabela 4.4. Resultado da ANOVA para a metilação global do sangue entre os níveis de cada fator experimental para os dados observados em D0, D1 e D28. 98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
UH	Unidade Haugh
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
NaCl	Cloreto de sódio
Tris – HCl	Tris-hidrocloreto
RNAse	Ribonuclease
PBS	Tampão salina fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
-CH3	Grupo metil
DNMT	DNA metiltransferase
Ca_2^+	Íons de cálcio
Na^+	Sódio
K^+	Potássio
HCO_3^-	Bicarbonato
$CaCO_3$	Carbonato de cálcio
H^+	Íon hidrogênio
CO_2	Dióxido de carbono
H_2CO_3	Ácido carbônico
PCO_2	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue
ANOVA	Análise de variância
UR	Umidade relativa
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
O_2	Gás oxigênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução **15**

1.1 Enunciado do Problema 15
1.2 Hipóteses 16
1.3 Objetivos 17
1.4 Resumo do experimento e análises realizadas 17
1.4.1 Descrição das atividades pré-experimento 17
1.4.2 Delineamento experimental 19
1.4.3 Arraçoamento 20
1.4.4 Análises de sangue, peso corporal e temperatura interna 21
1.4.5 Coleta das amostras de sangue e das variáveis analisadas no sangue 23
1.4.6 Determinação de metilação genômica 27
1.4.7 Avaliação da qualidade dos ovos 31
1.5 Organização da tese 32
1.6 Referências 33

CAPÍTULO 2 Revisão de literatura **35**

2.1 Introdução 35
2.2 Respostas fisiológicas e comportamentais das aves sob estresse térmico 35
2.3 Respostas fisiológicas ligadas aos parâmetros sanguíneos 38
2.3.1 Parâmetros sanguíneos avícola 38
2.3.2 Respostas sanguíneas das aves sob estresse térmico 41
2.4 Respostas biológicas ligadas a metilação do DNA 43
2.4.1 Epigenética e metilação do DNA 43
2.4.2 O estudo da Epignética e da metilação do DNA em aves 45
2.5 Efeito do estresse térmico sobre a qualidade do ovo 47
2.5.1 Principais características do oviduto das aves 47
2.5.2 Principais características da qualidade interna e externa do ovo 48
2.5.3 Efeito do estresse térmico na qualidade interna e externa do ovo 50
2.6 Referências 54

CAPÍTULO 3 Compreendendo a resiliência da produção de ovos em galinhas poedeiras estressadas pelo calor: uma investigação comparativa de duas linhagens **68**

RESUMO 68

3.1 Introdução 68
3.2 Metodologia 70
3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos 70
3.2.2 Registro da produção e qualidade do ovo 71
3.2.3 Peso das aves, temperatura interna e consumo de ração 71
3.2.4 Análise dos dados 72
3.3 Resultados 72
3.3.1 Peso e temperatura retal 72
3.3.2 Análise de viabilidade de produção dos ovos 76
3.3.3 Análise de qualidade dos ovos 77
3.4 Discussão 78
3.5 Conclusão 80
3.6 Referências 80

CAPÍTULO 4 Efeitos do estresse por calor na metilação global do DNA e nos parâmetros sanguíneos de duas linhagens de galinhas poedeiras **85**

RESUMO 85
4.1 Introdução 86
4.2 Metodologia 87
4.2.1 Delineamento experimental e tratamentos 87
4.2.2 Coleta das amostras de sangue e variáveis analisadas 88
4.2.3 Isolamento, extração e análise de metilação global de DNA 90
4.2.4 Análise estatística 91
4.3 Resultados 91
4.3.1 Análise do hemograma 92
4.3.2 Análise de eletrólitos e pH 95
4.3.3 Análise da metilação global do sangue 97
4.4 Discussão 99
4.5 Conclusão 101
4.6 Referências 102

CAPÍTULO 5 Considerações finais **107**

5.1 Referências 109

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Enunciado do Problema

O Brasil é o quinto maior produtor de ovos do mundo, atingindo 52,447 bilhões de unidades de ovos em 2023, crescimento de mais de 316% desde 1997. O aumento produtivo condiz com a demanda, considerando o consumo de 242 unidades de ovos *per capita* por ano no país. O Estado de São Paulo compreendeu o maior valor em alojamento de pintainhas em 2023, com 29%, indicando seu destaque na produção de ovos do país. Do total produzido no Brasil, apenas 1% é exportado, quantia que atende 86 países, demonstrando sua importância mundial (ABPA, 2024).

A cadeia produtiva avícola é consolidada no mercado, estando em constante avanço. Contudo, enfrenta desafios relativos às mudanças climáticas, como o aumento da frequência e intensidade de eventos extremos que afetam os sistemas de produção animal. Segundo previsões do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas, estima-se que haja aumento da temperatura média na região intertropical brasileira, afetando sistemas de produção de diversas espécies de animais (Paital et al., 2016; Lamarca et al., 2018). O estresse térmico, causado por ondas de calor, é a principal preocupação da avicultura tropical e subtropical.

As aves são muito sensíveis a alterações na rotina, destacando-se a elevada temperatura, pois dispõem de menos recursos para combater os efeitos do estresse térmico quando comparadas com outros animais (Nawaz et al., 2021). As galinhas apresentam temperatura corporal interna de aproximadamente, 41 °C e ausência de glândulas sudoríparas, quando comparadas com outros animais homeotermos, dependendo de diferentes mecanismos fisiológicos para manter a homeostase. A eficiência da resposta do organismo frente a altas temperaturas dependerá da intensidade e da duração da exposição (Koutsos & Klasing, 2014; Abo Ghanima et al., 2020; Aduasiamah et al., 2021).

Durante o estresse, a prioridade é a manutenção do funcionamento do organismo. Por isso, as respostas do corpo envolvem mecanismos compensatórios de sobrevivência, incluindo alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais do animal (Afsal et al., 2018; Nawaz et al., 2021). Nesse processo, há impacto econômico no sistema, pois afeta negativamente o desempenho, a reprodução, o bem-estar e o comportamento

das aves, levando a problemas que incluem a redução do consumo de ração, da eclodibilidade, da produção e da qualidade dos ovos (Saeed et al., 2019; Yousaf et al., 2019). Quando os mecanismos de termorregulação não são suficientes para reduzir a temperatura corporal e retornar à homeostase, o animal entra na fase de exaustão, podendo vir a óbito (Boff & Oliveira, 2021). Além disso, a alta densidade de alojamento pode agravar as perdas causadas pelo estresse térmico (Son et al., 2022).

Tendo em vista o impacto do estresse térmico na produção de poedeiras, são necessários mais estudos sobre as alterações fisiológicas e biológicas resultantes. A avaliação do desempenho e da qualidade dos ovos é uma forma direta de observar o efeito do estresse. No entanto, análises do tecido sanguíneo podem ser realizadas para identificar respostas fisiológicas por meio de seus componentes, avaliados pelo hemograma e níveis de glicose, interligando a resposta imune ao estímulo estressor (Mehaisen et al., 2019; Sobotik et al., 2020).

O sangue também pode elucidar alterações biológicas, como as mudanças que ocorrem na expressão gênica sem alterar diretamente a sequência do código genético, conhecido como mecanismo epigenético (Hong et al., 2018). A metilação do DNA é uma das alterações epigenéticas que está relacionada às condições vividas pelo animal, podendo ser utilizada para caracterizar animais sob estresse térmico. Visto a grande variedade de tolerância ao calor entre os indivíduos, supõe-se que haja predisposição genética (Bush et al., 2017), também podendo ser condicionada por mecanismos epigenéticos e transmitida aos descendentes (Jablonka & Raz, 2009).

Dessa forma, o estudo do conteúdo de metilação genômica permitirá a associação das alterações fisiológicas e imunológicas de galinhas poedeiras das linhagens Dekalb White e Dekalb Brown em condições termoneutras e de estresse por calor, assim como a determinação do tempo de adaptação para retorno da produção, identificando características específicas de cada linhagem estudada para cada temperatura.

1.2 Hipóteses

A hipótese desta pesquisa é que pode haver correlação entre o conteúdo de DNA metilado e a resposta adaptativa das poedeiras e que as linhagens estudadas possuem tempos e modo de ação diferentes para recuperação frente ao estresse por calor. Também é esperado que poedeiras submetidas ao calor extremo apresentem elevada temperatura retal, redução do consumo de ração e queda na produção e qualidade de ovos, além de índices hematológicos e conteúdo de metilação global do DNA sanguíneo alterados.

1.3 Objetivos

O objetivo desta pesquisa foi estudar as alterações, fisiológicas e biológicas de galinhas poedeiras submetidas a estresse por calor, resultantes dos mecanismos de compensação para a manutenção da homeostase, e avaliar o tempo necessário para adaptação das aves ao novo ambiente térmico. Foram objetivos específicos desse trabalho:

a) Relacionar os parâmetros sanguíneos de duas linhagens de poedeiras comerciais submetidas a estresse por calor com o conteúdo da metilação global do DNA dessas aves.
b) Avaliar a variação do peso corporal, da temperatura retal, do consumo de ração, da produção e da qualidade de ovos de poedeiras de duas diferentes linhagens sob estresse por calor crônico.

1.4 Resumo do experimento e análises realizadas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, sob o protocolo nº 02/2022 da Faculdade de Ciências e Engenharia, Câmpus de Tupã, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP/FCE.

1.4.1 Descrição das atividades pré-experimento

O estudo foi desenvolvido em duas câmaras climáticas instaladas no Laboratório de Zootecnia de Precisão nas dependências da Faculdade de Ciências e Engenharia - Câmpus de Tupã. Foram utilizadas 192 aves das linhagens Dekalb White (n=96) e Dekalb Brown (n=96), com idade inicial de 33 semanas de idade. As aves foram obtidas do mesmo lote e selecionadas aleatoriamente na granja (Figura 1.1). Neste momento, representando o dia zero (D0), todas aves foram identificadas com anilhas nas patas, pesadas e coletadas amostras de sangue. Sabe-se que existe o efeito prévio de exposição ao calor desses animais na granja e, para monitorar esses efeitos durante as repetições do experimento, essa coleta foi realizada a fim de definir o estado das aves no início do experimento.

(a) (b)

Figura 1.1. Aves da linhagem Dekalb White (a) e Dekalb Brown (b) alojadas na granja.

A Figura 1.2 mostra as temperaturas e umidades relativas médias da região em que se localiza a granja, desde o primeiro dia de alojamento. Os galpões em que as aves foram alojadas eram abertos e, portanto, expostos as condições climáticas do local. Verifica-se que as aves foram submetidas a temperaturas elevadas desde os primeiros dias de alojamento.

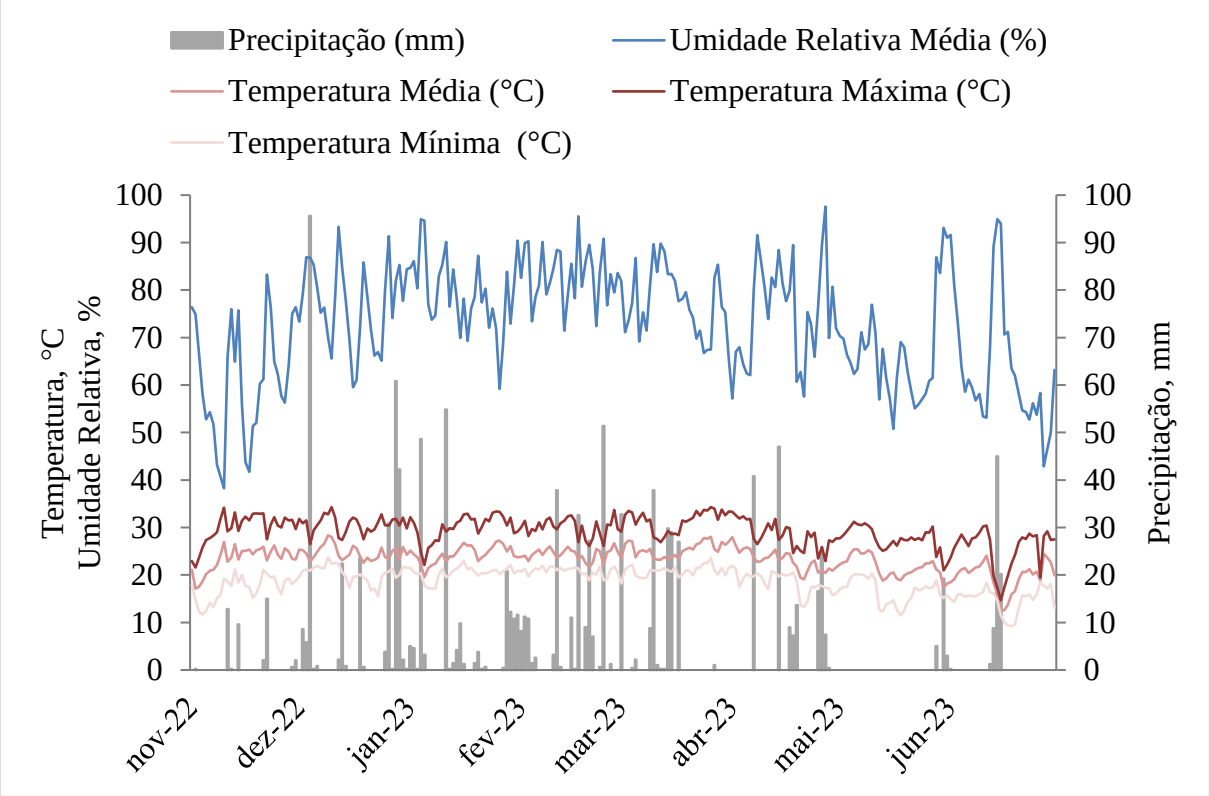


Figura 1.2. Variáveis ambientais da região em que se localiza a granja comercial, para o período compreendido entre o primeiro dia de alojamento das aves na granja até o início do experimento nas câmaras climáticas.

Após essa coleta, metade das aves permaneceram na granja, aguardando o momento de serem transportadas para o experimento. A outra metade foi acondicionada em caixas de transporte e levadas para as câmaras climáticas. Antes de serem alojadas, as aves novamente foram pesadas individualmente. E após a pesagem, foi realizado um sorteio, que definiu para qual câmara climática e qual gaiola cada ave seria alojada.

As aves foram colocadas em gaiolas no interior da câmara climática. As gaiolas foram confeccionadas em arame galvanizado, com comedouro do tipo calha em chapa galvanizada e bebedouros tipo *nipple* (Figura 1.3). A partir do alojamento, as aves passaram por um período de adaptação de sete dias sob temperatura de 26 °C e 60% de umidade relativa, denominado de período pré-experimental, antes de iniciar os tratamentos de temperatura.

(a) (b)

Figura 1.3. Aves nas gaiolas no interior da câmara climática e comedouro tipo calha (a) e (b).

1.4.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no esquema fatorial 2×2 (duas linhagens e duas temperaturas) com parcelas subdivididas. Os tratamentos de temperatura foram aplicados durante 28 dias, contados após o período pré-experimental de adaptação. Em uma das câmaras foi colocado uma condição de estresse térmico intermitente, com 35 ºC das 9:00 às 20:00 horas e 26 °C das 20:00 às 9:00. Na outra câmara climática, foi estabelecida condição de conforto térmico, com temperatura de 26 ºC das 9:00 às 20:00 horas e 24 °C das 20:00 às 9:00. Em ambos os tratamentos a umidade relativa foi controlada em torno de 60%. Tratamento é o fator da parcela completa e a linhagem o fator da subparcela e a repetição o bloco A Tabela 1.1 resume como foi executado o experimento proposto.

Tabela 1.1. Distribuição aleatória dos tratamentos e das subparcelas nas câmaras climáticas.

Repetição	Câmara climática	Tratamento ambiental	Distribuição linhagens
Ciclo 1	I	Estresse	**112 111 110 109 108 107** **101 102 103 104 105 106**
	II	Conforto	**212 211 210 209 208 207** **201 202 203 204 205 206**
Ciclo 2	I	Conforto	**112 111 110 109 108 107** **101 102 103 104 105 106**
	II	Estresse	**212 211 210 209 208 207** **201 202 203 204 205 206**

A cor marrom indica gaiolas com galinhas Dekald Brown, enquanto as brancas indicam com a Dekalb White, ambos identificados pelo número da gaiola.

Este experimento foi realizado com duas repetições. Na primeira repetição, 96 galinhas (48 Dekalb White e 48 Dekalb Brown), com 34 semanas de idade, foram divididas em grupos de quatro aves/gaiola nas câmaras climáticas. A distribuição das linhagens no interior da câmara climática foi aleatória, e dentro de uma gaiola foi colocado apenas uma linhagem. Em cada câmara climática havia seis gaiolas de cada linhagem.

Na segunda repetição, houve inversão dos tratamentos de temperatura nas câmaras climáticas com outras aves, com o objetivo de controlar possível efeito da câmara nos dados. Todas as aves, com idade de 45 semanas, foram provenientes da mesma granja e do mesmo lote, para que não houvesse sobreposição dos tratamentos. A disposição das linhagens nas gaiolas no interior de cada uma das câmaras é descrita na Tabela 1.1.

1.4.3 Arraçoamento

A ração utilizada foi a mesma formulada na granja de origem (Tabela 1.2), fornecida na quantidade de 110 g/ave, dividida duas vezes ao dia, às 8:00 e às 16:00 horas. O consumo de ração foi aferido diariamente, calculado a partir da diferença entre a ração total fornecida a cada gaiola com as sobras de ração coletadas e pesadas diariamente. A água fornecida foi *ad libitum* em bebedouros tipo *nipple*. A quantidade de ração fornecida e as sobras foram pesadas e registradas diariamente. Como as linhagens foram dispostas aleatoriamente nas gaiolas no interior das câmaras climáticas, não medimos a sobra de ração por linhagem, mas o total de ração não consumida em cada tratamento de temperatura.

Tabela 1.2. Composição da dieta em quilos e percentual nutricional da ração utilizada para as aves durante o experimento.

Ingredientes	**Quantidade (kg/ton de ração)**
Milho	676,40
Farelo de soja 45/80	206,00
Calcário 39	59,00
Calcário granulado	50,00
Sal fino	2,40
Bicarbonato de sódio	2,00
DL-metionina 99%	1,30
Cloreto colina 60%	0,40
L-Lisina 98%	0,50
Vitamicil postura fitase	1,00
AMIX FOS SE DG 2[(1)]	1,00
Nutrientes calculados	**Valor disponível por kg de ração**
Energia metabolizável (Kcal/kg)	2.846,00
Proteína bruta (%)	14,93
Cálcio (%)	4,48
Fósforo (%)	0,49
Fósforo disponível (%)	0,29
Metionina total	0,38

[(1)] Suplemento vitamínico-mineral - Suplemento vitamínico-mineral vitamina A (mín.) 1.000.000,00 UI/kg, vitamina D3 (mín.) 200.000,00 UI/kg, vitamina E (mín.)10.000,00 UI/kg, vitamina B1(mín.) 1.000,00 mg/kg, vitamina B2 (mín.) 1.000,00 mg/kg, vitamina B6 (mín.) 1.5000,00 mg/kg, vitamina B12 (mín.) 10.000,00 mcg/kg, ácido nicotínico (mín.) 5.000,00 mg/kg, pantotenato de cálcio (mín.) 2.500,00 mg/kg, selênio (mín.) 200,00 mg/kg, fitase 1.000,00 FTU/kg, betaglucanase 12,50 U/g, celulase 101,25 U/kg, protease 2.062,50 U/g, lipase 50.00 U/g, amilase 1.312,50 U/g *bacillus subtilis* 125×10^9 UFC/kg.

1.4.4 Análises de sangue, peso corporal e temperatura interna

As análises foram realizadas no primeiro dia do experimento e a cada sete dias, até completar os 28 dias de ciclo, para o acompanhamento das mudanças fisiológicas, totalizando cinco coletas (Figura 1.4).

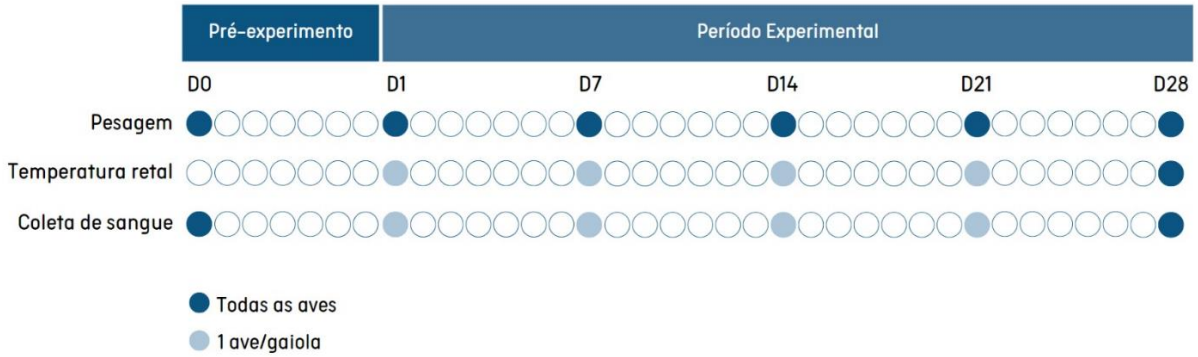


Figura 1.4. Cronograma das atividades de pesagem, temperatura retal e coleta de sangue.

Dessa forma, pretendeu-se comparar os efeitos da exposição as temperaturas na granja (D0) e as coletas realizadas semanalmente, para comparar os efeitos dos tratamentos de temperatura. No primeiro e último dia de tratamento, foi realizada a coleta de sangue, pesagem e medição da temperatura interna de todas as aves (Figura 1.5. Aferição do peso (a) e da temperatura interna das aves (b).

5). Na primeira (D7), segunda (D14) e terceira (D21) semana de tratamento, pesamos todas as poedeiras, e coletamos o sangue e medimos a temperatura retal de uma ave por gaiola, garantindo que fosse sempre a mesma ave nas três coletas, para avaliação do perfil hematológico, glicose sanguínea, pH, eletrólitos e análise do conteúdo da metilação global do DNA, totalizando 24 amostras (6 aves × 2 linhagens × 2 condições ambientais). O peso foi registrado em balança de plataforma (B-160, Líder Co. Ltda, Araçatuba, São Paulo, Brasil), com precisão de 5 gramas, e a temperatura interna foi aferida com um termômetro digital clínico inserido no reto.

(a) (b)

Figura 1.5. Aferição do peso (a) e da temperatura interna das aves (b).

1.4.5 Coleta das amostras de sangue e das variáveis analisadas no sangue

Foi coletado 3 mL de sangue venoso com agulha 25 × 7 mm e seringa de 3 mL (Figura 1.6), acondicionado em microtubo de 0,5 mL contendo EDTA K3 como substância anticoagulante e 2,5 mL disposto em tubo com acelerador de coagulação. Em seguida, a concentração de glicose foi determinada pelo glicosímetro (Accu-Check®, Guide Roche®) (Figura 1.7a), utilizando 0,6 µL de sangue total fresco por método eletroquímico, e as amostras dispostas em EDTA (Figura 1.7b) foram homogeneizadas para determinação de hematócrito, contagem de hemácias, contagem de leucócitos, proteínas plasmáticas totais, hemoglobina, e eletrólitos.

(a) (b)

Figura 1.6. Coleta de sangue da veia ulnar debaixo da asa (a) e venopunção femoral na face posterior da tíbia (b).

(a) (b)

Figura 1.7. Verificação da glicose através do kit accu-chek guide (a), tubos de 0,5 mL com EDTA.

O hematócrito (Figura **1.8**) foi determinado pela técnica do microhematócrito, adicionando sangue em tubos capilares e centrifugando-os à 12.500 rpm por 5 min em Centrífuga Fanem de Microhematócritos Mod.100® (Figura 1.9).

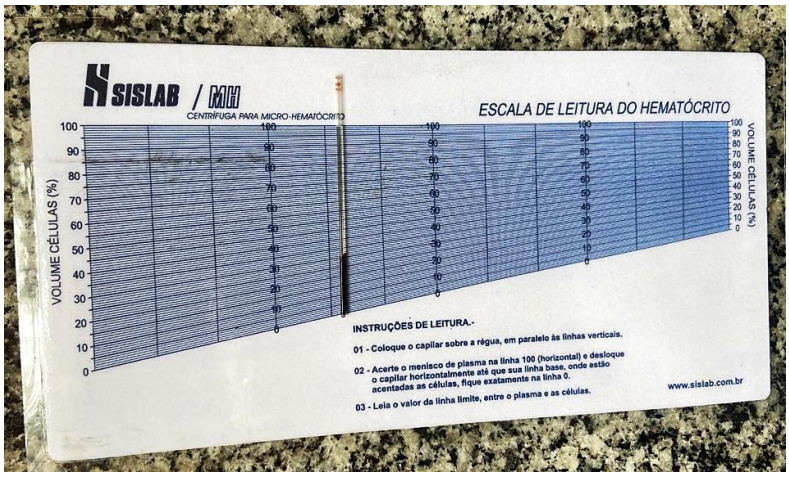
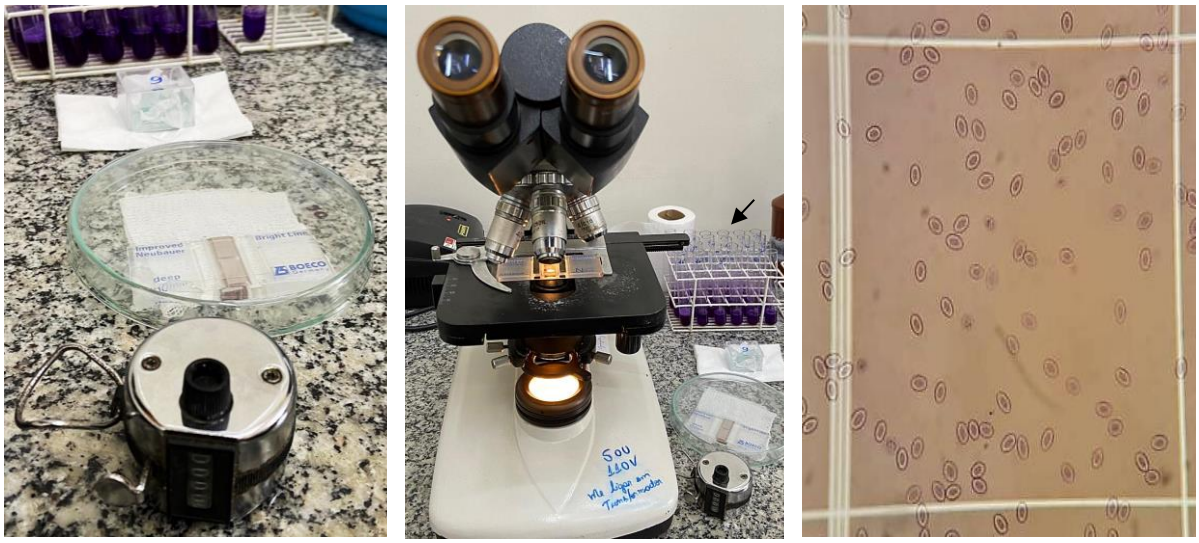


Figura 1.8. Leitura manual do hematócrito.

(a) (b) (c)

Figura 1.9. Confecção dos capilares (a), capilares dentro da centrífuga (b), Centrífuga Fanem de Microhematócritos Mod.100® (b) e (c).

A contagem de hemácias e leucócitos (Figura 1.10) foi realizada pelo método de Natt & Herrick (1952) em câmara de Neubauer após diluição na razão de 10 µL de sangue para 2000 µL de solução de Nat-Herrick.



(a) (b) (c)

Figura 1.10. Câmara de Neubauer preparada, contador celular (a), microscópio de luz e tubos de ensaio com amostras diluídas (seta preta) (b), hemácias no microscópio aumento 40× (c).

A correção dos valores observados na câmara de Neubauer para as hemácias e os leucócitos foi realizada multiplicando o número de células observadas pelo fator de correção (Fc) descrito a seguir (Garcia-Navarro & Pachaly, 1994).

$$Fc = \frac{1}{D \times A \times H}$$

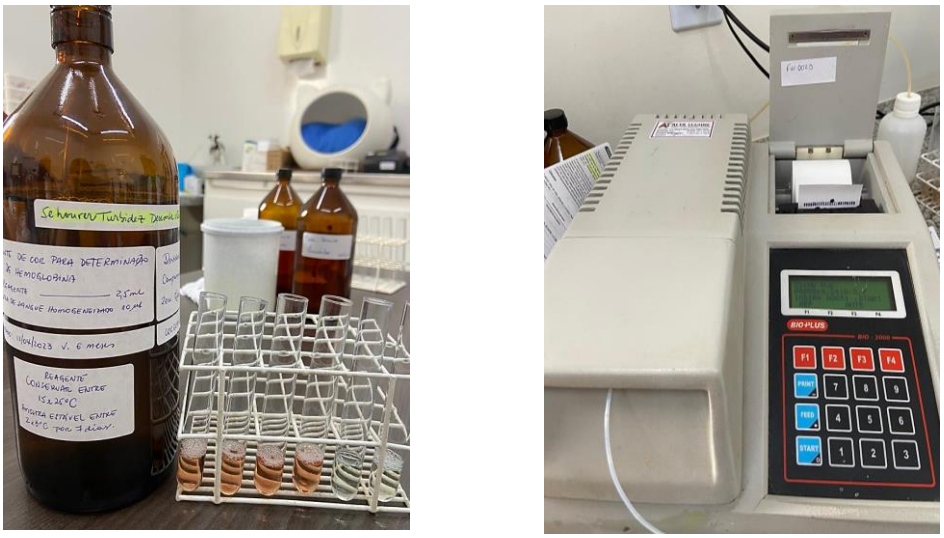
Neste contexto, Fc é o fator de correção, D é a diluição calculada a partir do volume de amostra dividido pelo volume total de solução, A é a área de contagem na câmara de Neubauer, que nesse trabalho para a contagem de hemácias foi 0,2, equivalente a 5 quadros de 25 disponíveis, e para a contagem para Leucócitos foi de 4 quadrantes completos, e H é a altura da câmara é fixa 0,1 mm³.

Para o total de hemácias, o número de células visualizado na câmara de Neubauer foi multiplicado por 10.050 (fator das hemácias) e o resultado dividido por 1.000.000, expresso em $\times 10^6/mm^3$. Para a leucometria global considerou-se o total de leucócitos multiplicado por 502,5 (fator de leucócitos), expresso em $\times 10^3/mm^3$.

Para a quantificação de hemoglobina, foi utilizado, seguidos de centrifugação por 5 min em 3500 rpm para realizar a separação da hemoglobina e, posteriormente, a leitura na máquina BioPlus® realizada por espectrofotometria em modo absorbância a 540 nm (Figura 1.11b).

A determinação de hemoglobina foi realizada pelo método cianeto de hemoglobina utilizando o kit Hemoglobina (Labtest® Ref. 43 e Padrão de hemoglobina Ref.47), onde foi

utilizado 10 µL de sangue com EDTA e 2,5 mL de diluente (Figura 1.11a), em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 min a 3.500 rpm e realizada a leitura no espectrofotômetro (BioPlus®) a 540 nm (Figura 1.11b).



(a) (b)

Figura 1.11. Amostras de sangue com diluente para determinação da hemoglobina (a) e máquina BioPlus® (b).

A proteína plasmática total foi realizada por refratometria manual, utilizando-se refratômetro de proteínas e urina veterinário (Ion RHC-200®), com intervalo de medição entre 0-12 g/dL e precisão de 0,2 g/dL, e as amostras de soro foram submetidas à determinação do pH e de eletrólitos pelo método de eletrodo seletivo (IonPro®), com faixa de sensibilidade e linearidade para Na^+: 40-205 mmol/L, K^+: 1,5-15 mmol/L, Ca^+: 0,2-5,0 mmol/L (Figura 1.12).

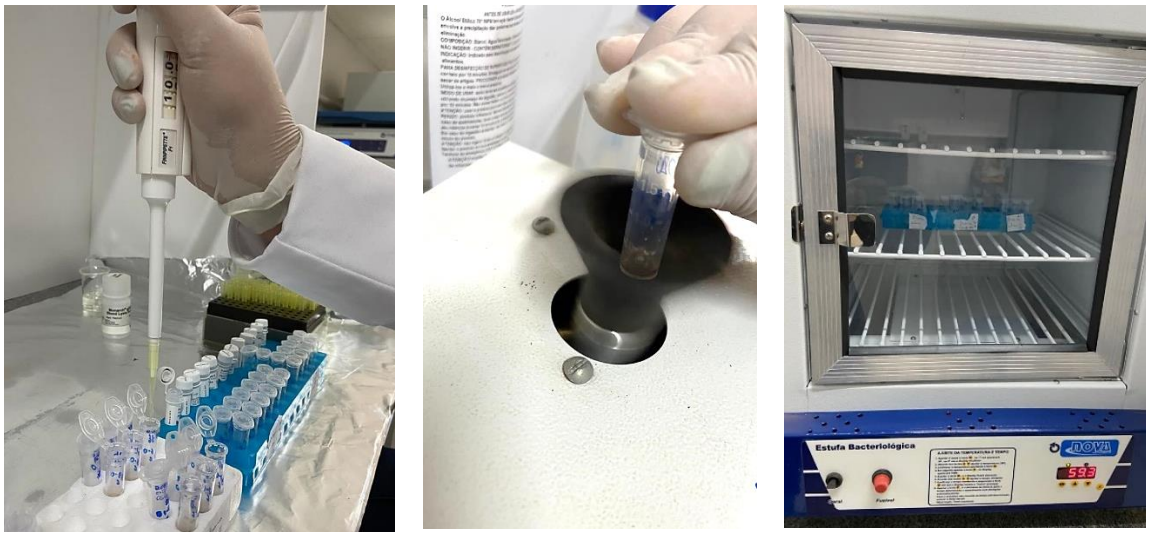
Figura 1.12. Eletrodo seletivo (IonPro®) para avaliação do pH e dos eletrólitos do soro.

1.4.6 Determinação de metilação genômica

As análises do conteúdo da metilação global do DNA foram realizadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Câmpus de Dracena, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sendo dividida em duas etapas: extração e metilação do DNA.

1.4.6.1 Extração do DNA

As amostras utilizadas são referentes as coletas do D0, D1 e D28. A extração de DNA total genômico foi realizada pelo kit de purificação de DNA genômico Monarch Biolab®. Em um tudo de eppendorf com 10 µL de sangue total foi adicionado 90 µL de tampão CTAB 2% (NaCl (5 µ = 28 mL), EDTA (0,5 µ = 4 mL), Tris – HCl (1 µ = 10 mL) e água q.s.p (100 mL) adicionado mercaptoetanol e agitados em vórtex, em seguida foi adicionado 10 µL de proteinase K e 3 µL de RNAse misturados em vórtex. Em seguida, foi adicionado 100 µL de tampão de lise sanguínea e agitado em vórtex até o momento que a solução ficou viscosa. Então, a amostra foi incubada durante 5 min a aproximadamente 60 °C na estufa e a cada 1 min foi agitada no vórtex (Figura 1.13).

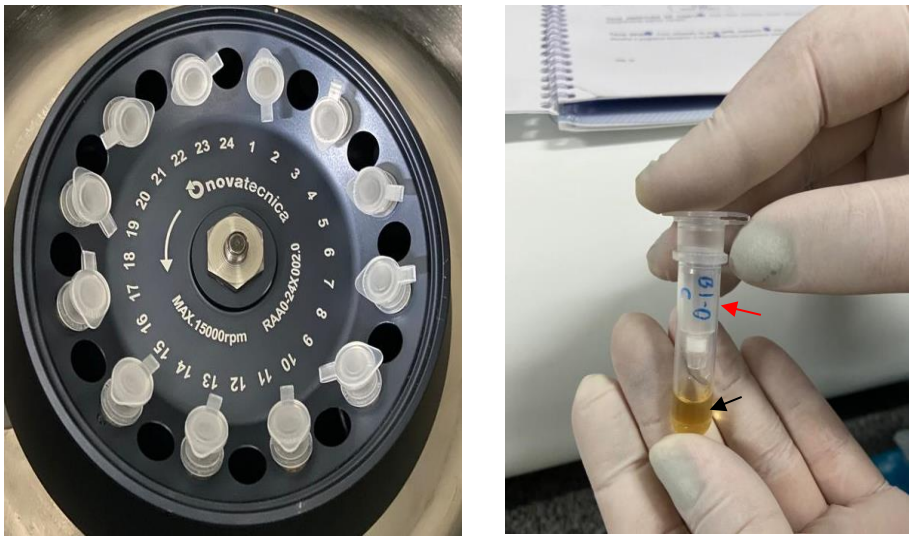


(a) (b) (c)

Figura 1.13. Adição de 10 µL de proteinase K em tubos de eppendorf com 10 µL de sangue (a), agitação da amostra em vórtex (b), amostras incubadas na estufa (c).

Após o preparo do material, foi realizada a ligação e eluição do DNA, onde foi adicionado 400 µL de tampão de ligação misturado em vórtex durante 10 s, e a mistura foi transferida para uma coluna de purificação de DNA pré-inserida num tubo de coleta. Em

seguida foi centrifugada na microcentrífuga NT 805 Nova Técnica® por 3 min a 1.000 rpm e depois 1 min a 12.000 rpm, com descarte do fluxo do tubo de coleta (Figura 1.14).



(a) (b)

Figura 1.14. Centrifugação das amostras (a), fluxo da amostra para descarte (seta preta) no tubo de coleta e coluna de purificação de DNA pré-inserida (seta vermelha) (b).

Após, a coluna foi colocada em outro tubo e adicionado 500 µL de tampão de lavagem centrifugado durante um 1 min à 12.000 rpm repetida duas vezes, também com descarte do fluxo ao final (Figura 1.15)

(a) (b) (c)

Figura 1.15. Pipetagem do tampão de lavagem (a), microcentrífuga NT 805 Nova Técnica® (b), tubo de coleta e coluna de purificação de DNA pré-inserida com descarte do fluxo (seta preta) (b).

Posteriormente, a coluna de purificação de DNA foi colocada em um tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 mL sem DNA e adicionado 50 µL de tampão de eluição (pré-aquecido a 60 °C). Após essa etapa, o material foi incubado em temperatura ambiente (25 °C) por 1 min e, em seguida, centrifugado por um min à 12.000 rpm, para eluir o DNA. Esse DNA eluido foi armazenado a -20 °C.

A quantificação e a avaliação da qualidade das amostras foram realizadas com o espectrofotômetro (Nano Drop 2000 – Thermo Scientific®), sendo medida a absorbância de cada amostra em contraste com uma amostra de tampão, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A razão entre 1,8 e 2,0 é considerada ideal, sendo que valores inferiores a 1,8 indicam excesso de proteínas e valores superiores a 2,0 indicam excesso de solventes orgânicos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

1.4.6.2 Metilação do DNA

A análise do conteúdo da metilação foi realizada por meio do kit Global DNA Methylation Elisa Cell Biolabs®, usando tiras com poços pré-tratados, onde as amostras padrões 5MedCyd são adicionadas a uma placa revestida com DNA 5MedCyd conjugado e após uma breve incubação é adicionado um anticorpo monoclonal anti-5MedCyd, seguido de um anticorpo secundário, permitindo a detecção colorimétrica da quantidade relativa de metilação do DNA em relação ao controle positivo, que apresenta um DNA 100% metilado. As amostras de DNA foram diluídas a uma concentração de 50 ng/µL diluídas em solução de PBS (tampão salina fosfato, pH 7,2), juntamente com o controle negativo (PBS) e controle positivo (DNA metilado fornecido no kit).

Antes de iniciar o protocolo foi necessário realizar a diluição dos reagentes: tampão PBS, 5MedCyd DNA conjugado, diluente (*Standart*), solução de lavagem, anticorpo anti-5MedCyd e o anticorpo anti-5MedCyd secundário.

- Tampão PBS: 1 litro de água destilada para 1 frasco de PBS pH 7,2;
- 5MedCyd de DNA conjugado: 50 µL 5MedCyd DNA conjugado + 9,95 mL de PBS;
- Diluente de ensaio: 5 µL Standart + 95 µL diluente;
- Solução de lavagem: 900 mL de água destilada + 100 mL Wash Buffer;
- Anticorpo anti-5MedCyd: 5 mL de água destilada + 5 µL do anticorpo; anti-5MedCyd;

- Anticorpo 5MedCyd secundário: 20 mL de água destilada + 20 µL do anticorpo 5MedCyd secundário.

Após a preparação dos reagentes, a placa foi revestida com 100 µL de solução 5MedCyd de DNA conjugado diluído em uma concentração de 1:200 incubado a 4 ºC em geladeira durante um período noturno. Posteriormente, a placa foi lavada com 100 µL de água destilada e adicionado 200 µL do diluente de ensaio e incubado durante 60 min em temperatura ambiente. Em seguida foi colocado 50 µL do Standart (DNA 100% metilado) em dois poços da placa, representando o controle positivo e 50 µL do PBS representando o controle negativo e adicionado 50 µL da amostra de DNA diluída em PBS.

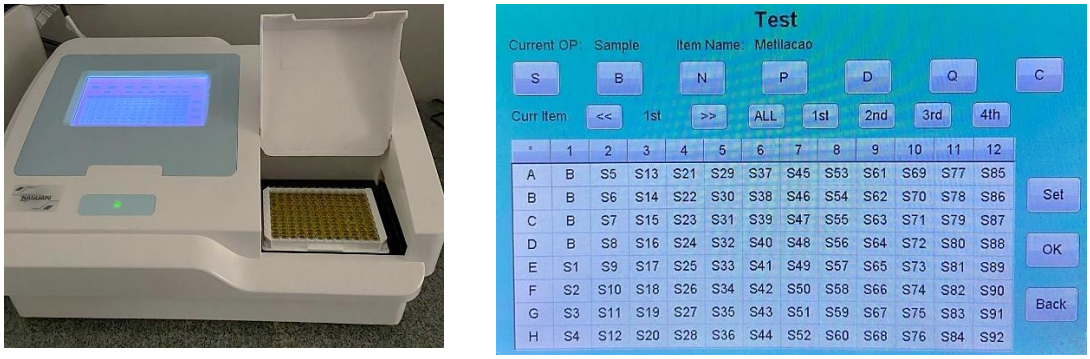
Posteriormente foi adicionado 50 µL do anticorpo Anti-5MedCyd em uma concentração de 1:1000, ficando incubados por 2 h à temperatura ambiente. Após a incubação, o anticorpo foi removido, cada poço foi lavado com 250 µL de solução de lavagem, por quatro vezes, e adicionado 100 µL do anticorpo secundário diluído em uma concentração de 1:1000, incubando-se novamente à temperatura ambiente por 60 min e lavado novamente por quatro vezes (Figura 1.16).

(a) (b) (c)

Figura 1.16. Adição de 50 µL do anticorpo Anti-5MedCyd (a), Lavagem da placa com solução de lavagem (b) e adição do anticorpo secundário diluído (b).

Posteriormente, no escuro, cada poço recebeu 100 µL de solução de substrato (reveladora) ficando incubada por, aproximadamente, 5 a 10 min, seguida da adição de 100 µL da solução de parada em cada poço para interromper a reação.

A absorbância da solução contida nos poços, ou seja, a leitura dos valores, foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm no equipamento PowerWav XS Microplate Reader (Biotek®) (Figura 1.17).



(a) (b)

Figura 1.17. Leitura da placa, PowerWav XS Microplate Reader (Biotek®) (a e b).

1.4.7 Avaliação da qualidade dos ovos

Os ovos foram coletados diariamente às 11:00 e 15:00 horas, colocados em bandejas com capacidade para 30 ovos (Figura 1.18), separados por gaiola e por tratamento para verificação da viabilidade de produção, calculada pela expressão a seguir.

$$Viabilidade\ de\ produção = \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{número\ de\ ovos\ coletados\ na\ gaiola}{número\ de\ aves\ na\ gaiola}}{n}$$

Onde n é o número de gaiolas para cada linhagem.

(a) (b)

Figura 1.18. Armazenamento dos ovos em bandejas plásticas.

A qualidade dos ovos foi aferida para todos os ovos coletados nos três primeiros dias e nos três últimos dias de cada ciclo de 28 dias. Primeiramente, foi avaliada a gravidade específica realizando a imersão dos ovos em soluções salinas ajustadas em densidades variando

de 1,060 a 1,100 g/mL, em intervalos de 0,005. Os ovos foram submersos nos recipientes da menor para a maior concentração, registrando-se a concentração na qual flutuaram. As variáveis de peso, resistência da casca, altura do albúmen, unidade Haugh foram avaliadas no equipamento Digital Egg Tester, (DET-6000, Nabel Co. Ltd., Kyoto, Japan®) e a espessura da casca, no paquímetro digital acoplado ao equipamento (Figura 1.19).

(a) (b) (c)

Figura 1.19. Recipiente com solução salina utilizados para registro da gravidade específica dos ovos (a), equipamento DET-6000® utilizado para a análise da qualidade dos ovos, e aferição da altura do albúmen, unidade Haugh (b), e paquímetro para medição da espessura da casca dos ovos (c).

1.5 Organização da tese

Esta tese está organizada em capítulos. Neste primeiro capítulo, apresentou-se a introdução e justificativa do trabalho, as hipóteses, os objetivos e o resumo das atividades e análises realizadas. No segundo capítulo, é apresentado a fundamentação teórica referente aos mecanismos comportamentais, fisiológicos e biológicos compensatórios adotados por galinhas para manter a homeostase quando submetidas a estresse por calor. No terceiro capítulo, é apresentado o estudo sobre o tempo de adaptação de galinhas poedeiras submetidas a estresse por calor, avaliando o consumo de ração e o impacto do estresse na produção e na qualidade dos ovos. No quarto capítulo, avaliou-se o conteúdo da metilação global do DNA para tecido sanguíneo, associado aos parâmetros sanguíneos de galinhas poedeiras submetidas a estresse por calor. No último capítulo, estão as considerações finais da pesquisa.

1.6 Referências

Abo Ghanima, M. M., Bin-Jumah, M., Abdel-Moneim, A.-M. E., Khafaga, A. F., Abd El-Hack, M. E., Allam, A. A., & El-Kasrawy, N. I. (2020). Impacts of Strain Variation on Response to Heat Stress and Boldo Extract Supplementation to Broiler Chickens. Animals, 10(1), 24. https://doi.org/10.3390/ani10010024

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual 2024. 2024. Disponível em: https://abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/. Acesso em: 05 maio 2024.

Aduasiamah, P., Zhang, Y., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Yang, H., W.L. Zhang, W.L., & Zhang, L. (2021). Evaluation of physiological and molecular responses to acute heat stress in two chicken breeds. Animal, 15(2), 100-106. https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100106

Afsal, A., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., & Bhatta, R. (2018). Heat stress and livestock adaptation: Neuro-endocrine regulation. International Journal of Veterinary and Animal Medicine, 1(2). https://doi.org/10.31021/ijvam.20181108

Boff, S. R., & Oliveira, A. G. (2021). Physiological aspects of stress: A narrative review. Research, Society and Development, 10(17), 1-7. https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i17.23561

Bush, E. C., Ray, F., Alvarez, M. J., Realubit, R., Li, H., Karan, C., Sims, P. A. (2017). Plate-seq for genome-wide regulatory network analysis of high-throughput screens. Nature Communication, 8(1), 1-7. https://doi.org/10.1038/S41467-017-00136-Z

Ferreira, M.E., & Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética (1ªed., pp.220). Embrapa-Cenargen, (Embrapa Cenargen Documento 20). https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00063810.pdf

Garcia-Navarro, C.E.K., & Pachaly, J.R. (1994). Manual de Hematologia Veterinária. (1ªd) São Paulo: Varela (pp.169).

Hong, Y., Hong, S.H., Oh, Y.M., Shin, S.H., Choi, S.S., & Kim, W. J. (2018). Identification of lung cancer specific differentially methylated regions using genome-wide DNA methylation study. Molecular & Cellular Toxicology, 14(3), 315-32. https://doi.org/10.1007/s13273-018-0034-0

Jablonka, E., & Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. The Quarterly Review of Biology, 84(2), 131-176. https://doi.org/10.1086/598822

Koutsos, E. A., & Klasing, K. C. (2014). Chapter 17—Factors modulating the avian immune system. In: K. A. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser (Eds.), Avian Immunology (2nd ed., pp.299–313). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00017-0

Lamarca, D., Pereira, D., Magalhães, M., & Salgado, D. (2018). Climate change in layer poultry farming: Impact of heat waves in region of Bastos, Brazil. Brazilian Journal of Poultry Science, 20(4), 657-664. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0750

Mehaisen, G. M. K., Desoky, A. A., Sark, O. G., Sallam, W., & Abass, A. O. (2019). Propolis alleviates the negative effects of heat stress on egg production, egg quality, physiological and immunological aspects of laying Japanese quail. PLoS ONE, 14(4), e0214839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214839

Natt, M.P., & Herrick, C.A. (1952). A new blood diluent for counting the erytrocytes and leucocites of chickens. Poultry Science, 31 (4), 735-738. https://doi.org/10.3382/ps.0310735

Nawaz, A. H., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Zhang, W. L., & Zhang, L. (2021). Poultry Response to Heat Stress: Its Physiological, Metabolic, and Genetic Implications on Meat Production and Quality Including Strategies to Improve Broiler Production in a Warming World. Frontiers in veterinary science, 8, 699081. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081

Paital, B., Panda, S. K., Hati, A. K., Mohanty, B., Mohapatra, M. K., Kanungo, S., & Chainy, G. B. N. (2016). Longevity of animals under reactive oxygen species stress and disease susceptibility due to global warming. World Journal of Biological Chemistry, 7(1), 110–127. https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.110

Saeed, M., Abbas, G., Alagawany, M., Kamboh, A. A., Abd El-Hack, M. E., Khafaga, A. F., & Chao, S. (2019). Heat stress management in poultry farms: A comprehensive overview. Journal of Thermal Biology, 84, 414–425. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.025

Sobotik, E. B., Nelson, J. R., & Archer, G. S. (2020). How does ultraviolet light affect layer production, fear, and stress. Applied Animal Behaviour Science, 223, 104926. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104926

Son, J., Kim, H.-J., Hong, E.-C., & Kang, H.-K. (2022). Effects of stocking density on growth performance, antioxidant status, and meat quality of finisher broiler chickens under high temperature. Antioxidants (Basel, Switzerland), 11(5), 871. https://doi.org/10.3390/antiox11050871

Xu, Y., Lai, X., Li, Z., Zhang, X., & Luo, Q. (2018). Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. Poultry Science, 97(11),4073-4082. https://doi.org/10.3382/ps/pey256

Yousaf, A., Jabbar, A., Rajput, N., Azizullah, M., Shahnawaz, R., Mukhtar, N., Farooq, F., Abbas, M., & Khalil, R. (2019). Effect of environmental heat stress on performance and carcass yield of broiler chicks. Journal of World's Poultry Research, 9(1), 26–30. https://doi.org/10.36380/scil.2019.wvj4

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Introdução

Na produção animal, o ambiente engloba um conjunto de variáveis que exercem grande influência no desempenho animal, como: ambiente térmico (temperatura, umidade e velocidade do vento), ambiente acústico (ruídos), ambiente aéreo (gases e poeira), ambiente social e ambiente físico. Em condições tropicais, um dos maiores agravantes é o ambiente térmico, pois é comum a ocorrência de altas temperaturas nas instalações avícolas. Sabe-se que temperaturas que excedam ou estejam abaixo da zona termoneutra podem comprometer o funcionamento fisiológico, levando a problemas associados ao estresse térmico, como redução do crescimento, queda do desempenho e alterações metabólicas (Afsal et al., 2018), além da exaustão que, por não conseguir regular a temperatura corporal, pode levar o animal a óbito, promovendo grandes perdas econômicas para a indústria animal (Nawaz et al., 2021).

O estresse por calor é um dos principais fatores associados às mudanças climáticas e pode ser classificado em dois tipos: 1) estresse por calor agudo, que é o aumento intenso da temperatura ambiente por um curto período e 2) estresse por calor crônico, caracterizado por alta temperatura por um período mais longo. Os danos causados pelo estresse térmico à produção animal dependem da intensidade e da duração do estímulo estressor em que o animal está exposto. Nestas condições, o organismo produz respostas que promovem a manutenção e adaptação do organismo para o adequado funcionamento frente aos desafios das alterações no ambiente de alojamento (Aduasiamah et al., 2021).

As respostas têm início com a percepção de alguma ameaça ao organismo pelo sistema nervoso central, que desencadeia vários mecanismos compensatórios no corpo, como: resposta comportamental, resposta do sistema nervoso autônomo, resposta neuroendócrina e resposta do sistema imunológico (Chen et al., 2015). Portanto, o objetivo deste capítulo é apresentar os mecanismos comportamentais, fisiológicos e biológicos compensatórios adotados por galinhas para manter a homeostase quando submetidas a estresse por calor.

2.2 Respostas fisiológicas e comportamentais das aves sob estresse térmico

O sistema neuroendócrino é o principal regulador da resposta fisiológica ao estresse e coordena as outras respostas adaptativas nos animais domésticos (Afsal et al., 2018). Os mecanismos termorreguladores para o estresse térmico são específicos de cada espécie e o seu

desempenho produtivo também difere entre elas (Nawaz et al., 2021). Nas aves, esses mecanismos são regulados por um centro termorregulador localizado no hipotálamo e são acionados quando a temperatura corporal aumenta, induzindo uma resposta periférica (Gomes et al., 2012). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é responsável por desencadear sequências de secreções hormonais, começando no hipotálamo e terminando com o aumento da síntese de glicocorticóides, cortisol e corticosterona nas aves, que resultam em um conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais (Figura 2.1).

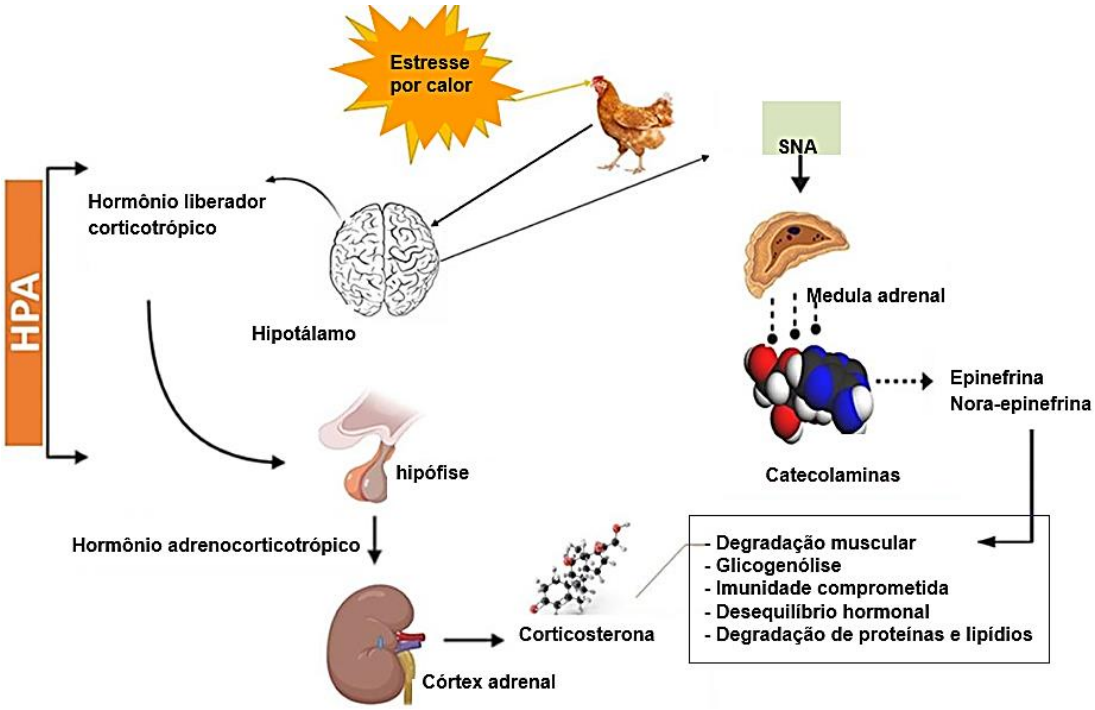


Figura 2.1. Relação do estresse térmico com alterações fisiológicas e bioquímicas em frangos. HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: Adaptado de Nawaz et al. (2021).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal aumenta os níveis sanguíneos de corticosterona nas aves, mobilizando energia por meio da gliconeogênese e alterando o comportamento, indicado pela maior busca por alimento, atividade de fuga e aumento de repouso noturno, como modo de economizar energia para ser usada como meio de sobrevivência no dia seguinte (Romero & Wingfield, 2015). Entretanto, sob o efeito de altas temperaturas, há diminuição significativa no consumo de ração, para o organismo reduzir a produção metabólica de calor (Franco-Jimenez et al., 2007; Oluwagbenga & Fraley, 2023). A elevação da temperatura corporal interna da ave, determinada pela temperatura retal, também é uma resposta fisiológica ao estresse por calor (Chang et al., 2018; Farag & Alagawany, 2018; Kim et al., 2021).

O aumento do consumo hídrico, na tentativa de reduzir o calor corporal, pode gerar desequilíbrio no balanço eletrolítico, aumentando a quantidade de urina excretada e, consequentemente, ocasionando maior perda de eletrólitos, como sódio, potássio e cloro. Quando os níveis desses minerais são afetados no plasma sanguíneo, pode ocorrer redução na concentração de sódio e potássio e aumento de cloro, resultando na reabsorção de bicarbonato pelos rins, contribuindo para acidificação do sangue, podendo desenvolver acidose metabólica (Brossi et al., 2009).

Outro mecanismo compensatório ao calor é a vasodilatação periférica, na qual a ave aumenta sua área superficial, elevando as asas e eriçando as penas, intensificando a circulação periférica (Shakeri et al., 2018). Nas aves, essas respostas são bem evidentes, já que são animais propensos ao estresse térmico devido à falta de glândulas sudoríparas funcionais, o que dificulta a troca de calor com o meio (Gonzalez-Rivas et al., 2020).

As aves possuem duas fases de regulação térmica corporal, a primeira é o momento após a eclosão que dura aproximadamente duas ou três semanas de vida. Quando o sistema termorregulador ainda não está totalmente desenvolvido, a ave é extremamente sensível às temperaturas abaixo de 32 °C, 30 °C e 28 °C, podendo facilmente ocorrer hipotermia quando submetidas a ambientes desfavoráveis (Yousaf et al., 2019). A hipotermia pode causar severa depressão do sistema nervoso central, danos ao sistema cardiovascular, aos órgãos internos e ao metabolismo, podendo ocorrer hipotensão devido à redução do débito cardíaco, bradicardia (diminuição da frequência respiratória), coagulopatias, resposta imunológica suprimida, entre outros, e, se esses pintinhos são reaquecidos sem prévia aclimatação, podem apresentar colapso cardiovascular com severa hipóxia tecidual e acidose metabólica (Gomes et al., 2012).

A segunda fase é quando, conforme o desenvolvimento da ave, ocorre redução da exigência térmica de, aproximadamente, 3 °C a cada semana, devendo permanecer igual ou abaixo dos 22 °C a partir da sexta semana, temperatura considerada próxima a faixa de conforto térmico (Gomes et al., 2012).

Um dos principais mecanismos compensatórios utilizados pelas aves para perda de calor é a evaporação respiratória. O resfriamento por meio da evaporação pelo sistema respiratório constitui um importante meio de perda de calor para as aves e quanto maior a pressão de vapor no ambiente, maior a dificuldade de liberação de calor. Se a temperatura e umidade relativa estiverem muito altas, a aves terão dificuldade em dissipar o calor por essa via, o que pode aumentar ainda mais a temperatura corporal que, ao alcançar o limite fisiológico vital da ave, levará à prostração e à morte (Odom et al., 1986; Nascimento et al., 2017).

Linsley & Berger (1964) relataram que, em galinhas poedeiras, a frequência respiratória pode variar de 23 movimentos por minutos em temperatura ambiente a 273 movimentos por minutos em situações de temperaturas elevadas e a de frangos de corte aproximadamente 25 movimentos por minuto a 250 movimentos por minuto quando submetidos ao estresse por calor agudo. Quando as aves passam por estresse térmico, o aumento da frequência respiratória pode trazer consequências que afetam o metabolismo por meio do desiquilíbrio ácido-base com o surgimento de alcalose respiratória, devido à perda excessiva de dióxido de carbono. Essa perda ocasiona redução de ácido carbônico e dos íons H^+, aumentando o pH sanguíneo (Cottrell et al., 2015).

2.3 Respostas fisiológicas ligadas aos parâmetros sanguíneos

2.3.1 Parâmetros sanguíneos avícola

O tecido sanguíneo é composto por eritrócitos, leucócitos e trombócitos, que estão imersos em uma matriz celular denominada plasma. A porcentagem de sangue e plasma em relação ao peso corporal variam conforme a idade dos animais. Estudo relatou valores sanguíneos de 12% em pintinhos (1 semana de idade) e 6,5% em poedeiras adultas (32 semanas de idade), e valores de plasma de 8,7% e 4,6% respectivamente. O conteúdo de água do plasma também apresentou redução com a idade, passando de 95,5% para 94,6% (Medway & Kare, 1959). O baixo volume, quando comparado aos mamíferos, é compensado pela elevada taxa de reposição sanguínea, caracterizada pela meia-vida útil entre 25 e 45 dias (Mitchell & Johns, 2008).

Todas as células do sangue das aves são nucleadas, diferente dos mamíferos, nos quais os eritrócitos e trombócitos são anucleados (Capitelli & Crosta, 2013). Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação sanguínea e, quando adultas, apresentam formato oval ou elíptico, com citoplasma eosinofílico não granular e núcleo oval centralizado. As hemácias possuem em seu interior uma proteína chamada hemoglobina, que possibilita o transporte de gases no organismo pelos complexos oxiemoglobina (hemoglobina ligada ao gás oxigênio) e carboemoglobina (hemoglobina ligada ao gás carbônico). Ao regular o nível de dióxido de carbono sanguíneo, a hemoglobina também controla o pH do meio (Bounous et al., 2000).

Já os trombócitos, similares as plaquetas nos mamíferos, são fragmentos celulares derivados de precursores de células-tronco, atuando no processo de cicatrização, por meio da formação da tromboplastina, e na defesa do organismo, pela fagocitose (Mitchell & Johns, 2008).

Os leucócitos, conhecidos como série branca, correspondem às células do sistema imunológico inato, primeira linha de defesa, e adaptativo, responsável pelas células de memória e reconhecimento antígeno/anticorpo. As células do sistema imunológico são divididas de acordo com a morfologia nuclear, sendo classificadas em granulócitos (heterófilos, basófilos e eosinófilos) e agranulócitos (monócitos e linfócitos) (Capitelli & Crosta, 2013).

Os heterófilos e linfócitos são as principais células de defesa do organismo frente aos agentes patogênicos. O heterófilo é a primeira célula a ir ao local da infecção para combater as substâncias estranhas, semelhante aos neutrófilos dos mamíferos (Mitchell & Johns, 2008). Morfologicamente, os heterófilos são células arredondadas, com grânulos eosinófilos no citoplasma e núcleo lobulado e basofílico. Considerados importantes mediadores da imunidade natural das aves, os heterófilos respondem a estímulos quimiotáticos e realizam a fagocitose, principal característica da célula (Harmon, 1998; Morgulis, 2002; Wang et al., 2020).

Já os linfócitos atuam na imunidade humoral, semelhante as funções nos mamíferos. Os linfócitos são arredondados, com núcleo não-lobulado, citoplasma basofílico e homogêneo, e alta relação núcleo/citoplasma (Schmidt et al., 2007b; Mitchell & Johns, 2008). Seu tamanho pode variar e, em certas espécies de aves, os linfócitos representam 70% dos leucócitos, seguido pelos heterófilos (Mitchell & Johns, 2008).

Em menores proporções, encontram-se os basófilos, com grânulos ricos em histamina, e os eosinófilos, com grânulos ricos em lisozima, peroxidase e arginina. Apesar da função exata dessas células ainda não estar definida em aves, sua atuação em mamíferos corresponde a participação nas respostas a hipersensibilidade, inflamações e infecções parasitárias (Mitchell & Johns, 2008).

Destacam-se também os monócitos, células de forma arredondada ou amorfa com núcleo redondo, oval ou lobado e grânulos ricos em lisozimas. Os monócitos presentes na corrente sanguínea são atraídos para o foco inflamatório através da quimiotaxia, iniciando a explosão respiratória (*burst*). Após migrar do sangue aos tecidos, o monócito passa a ser chamado de macrógafo. Em ambas as formas, a célula apresenta ação antimicrobiana e antitumoral, atraindo outros componentes do sistema imune e realizando fagocitose (Mitchell & Johns, 2008).

A formação das células sanguíneas ocorre pelo processo chamado de hematopoiese, é influenciada por fatores ambientais, biológicos e nutricionais, acarretando alterações nos constituintes sanguíneos. O sistema circulatório está envolvido no funcionamento de todo o organismo, portanto, é um importante indicador de resposta fisiológica, avaliando os aspectos

imunológicos e hematológicos das aves (Borges et al., 2003). O hemograma possibilita determinar valores de contagem de hemácias, hematócrito (porcentagem de eritrócitos em relação ao volume total de sangue), contagem de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos, hemoglobina e proteína total (Schmidt et al., 2007a).

A concentração total de eritrócitos, o hematócrito, e a concentração de hemoglobina e de proteína plasmática podem ser influenciadas pela idade, sexo, hormônios, métodos de determinação e outros fatores (Sturkie & Newman, 1951; Cardoso & Tessari, 2003). O hematócrito e a contagem total de eritrócitos tendem a ser mais elevados no sexo masculino, e a aumentar com a idade (Weiss et al., 2010). A proteína sérica de poedeiras também apresentou aumento na concentração com o avançar da idade (Brandt et al., 1951).

Os valores de eritrócitos registrados como normais na literatura variam de $2,5\times10^6$ a $3,5\times10^6/\mu L$ (Weiss et al., 2010). O hematócrito é considerado normal, aproximadamente, entre 35% e 55% (Mitchell & Johns, 2008). Baixo índice de hematócrito pode ser observado em doenças agudas ou crônicas, septicemias e doenças hemorrágicas (Campbell & Dein, 1984). Cardoso & Tessari (2003), avaliando frangos de corte entre 1 e 52 dias, determinaram valores mínimo e máximo de hematócrito em 30,6 e 37,0%, respectivamente. Para Weiss et al. (2010), entretanto, o valor de hematócrito pode variar entre 22% e 35%, com valores abaixo de 24% quando pintinhos, aumentando com a idade.

A concentração da hemoglobina é importante para determinar a capacidade de oxigenação tissular e para classificar o processo anêmico (Sturkie & Newman, 1951). Cardoso & Tessari (2003) determinaram valores mínimo e máximo de hemoglobina entre 7,88 e 8,46 g/dL, respectivamente. Entretanto, Weiss et al. (2010) relataram que valores médios para frangos e perus têm variado de 8,6 a 15,2 g/dL.

As proteínas plasmáticas, sintetizadas majoritariamente no fígado, compreendem a albumina, as globulinas alfa, beta e gama e o fibrinogênio, responsáveis por manter a pressão osmótica, regular o mecanismo ácido-base do sangue, transportar hormônios e compor enzimas e imunoglobulinas. Sua mensuração possibilita a detecção de processos inflamatórios graves (Cardoso & Tessari, 2003). Sturkie & Newman (1951), avaliando a proteína total de poedeiras em diferentes tempos de postura, ovulação e número de amostras, determinaram valores entre 3,90 e 5,34 g/100 mL. Em seguida, Cardoso & Tessari (2003) determinaram valores mínimo e máximo de proteína plasmática entre 3,00 e 3,68 g/dL, respectivamente. Já Barbosa et al. (2011), avaliando o perfil sérico de poedeiras, determinaram intervalo de confiança de 27,12 a 29,00 g/L de proteína total.

Outros testes bioquímicos, como a determinação da glicemia, também podem ser utilizados para avaliar as alterações do organismo (Schmidt et al., 2007b; Oluwagbenga & Fraley, 2023). Ding et al. (2021), avaliando a glicemia plasmática da linhagem Lohmann Silver, determinaram intervalo de referência de 199 a 287,65 mg/dL em poedeiras de 5 a 17 semanas de idade e de 203,6 a 269,2 mg/dL em poedeiras de 21 a 37 semanas de idade. Esses valores estão de acordo com os valores referência estabelecidos por Campbell (1994), que considerou variações de 200 a 500 mg/dL como de aves sadias, abaixo de 200 mg/dL situação de hipoglicemia e acima de 500 mg/dL situação de hiperglicemia.

Percebe-se, então, que apesar do sangue possuir a função de proteger o organismo contra agentes etiológicos e ajudar na manutenção do bom funcionamento das reações metabólicas, esse equilíbrio pode ser afetado levando a desordens imunológicas e hematológicas (Garcia et al., 2021). Portanto, o hemograma e as análises bioquímicas do sangue, por refletirem o estado fisiológico do organismo, são uma forma rápida e precisa de avaliar a saúde das aves e correlacioná-la com os aspectos produtivos (Borges et al., 2003; Franzini et al., 2022).

2.3.2 Respostas sanguíneas das aves sob estresse térmico

Quando os animais são expostos a altas temperaturas, desencadeia-se uma série de alterações no funcionamento do organismo, abrangendo desde mudanças na composição e funcionamento das células até o desenvolvimento de patologias mais graves. Os mecanismos de estimulação hormonal também entram em ação, visando preparar e fornecer os recursos necessários para que o organismo possa lidar com as demandas compensatórias impostas pelo ambiente desafiador. É importante notar que o sangue, por sua vez, mostra-se altamente sensível a variações de temperatura, desempenhando um papel crucial na resposta adaptativa do organismo (Borges et al., 2003; Franzini et al., 2022).

A análise da série eritrocítica, que compreende a contagem de glóbulos vermelhos, a dosagem de hemoglobina e o hematócrito, e da série leucocitária, incluindo a contagem total de leucócitos, oferecem informações cruciais sobre as respostas do organismo (Franzini et al., 2022). Em situações que causem desidratação, como jejum e estresse por calor, os animais podem apresentar aumento na concentração total de proteína plasmática (Schmidt et al., 2007a), hematócrito e hemoglobina (Habibu et al., 2017; Hassan et al., 2023). Paralelamente, observa-se uma redução na taxa de leucócitos circulantes, glicogênio hepático e concentração de sais no soro, conforme evidenciado em estudos anteriores (Barton et al., 1987; Chamblee et al., 1989;

Manning et al., 1990; Sartoris & Pörtner, 1997; Berrong & Washburn, 1998). A Tabela 2.1 apresenta resultados da contagem eritrócitos obtidos em diferentes situações de estresse.

Tabela 2.1. Contagem de eritrócitos obtidos em diferentes situações de estresse em poedeiras e frango de corte.

Ave	Agente estressor	Eritrócitos	Referência
Poedeiras	35 °C	$2{,}24\times10^6$ µL a $2{,}34\times10^6$ µL	Abbas et al. (2022)
Poedeiras	35 °C (6 h/dia)	$2{,}46\times10^6$ µL a $3{,}24\times10^6$ µL	Hassan et al. (2023)
Frango de corte	Aflatoxina	$2{,}5\text{x}10^6$ µL	Tessari et al. (2006)
Frango de corte	32 °C	$2{,}28\times10^6$ µL a $2{,}17\times10^6$ µL	Ding et al. (2020)
Frango de corte	Privação alimentar Densidade populacional	$3{,}11\times10^6$ µL a $3{,}38\times10^6$ µL	Nwaigwe et al. (2020)

À medida que as aves enfrentam condições estressantes, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é estimulado, liberando glicocorticoides na corrente sanguínea (Chovatiya & Medzhitov, 2014; Mehaisen et al., 2017), que também comprometem o funcionamento do sistema imunológico, por meio de alterações significativas na quantidade de leucócitos (Chovatiya & Medzhitov, 2014). Alterações nas quantidades dessas células podem prejudicar o desempenho das aves, já que estão ligadas ao processo protetor do corpo contra patógenos. Em condições de estresse por calor, a morfologia do intestino pode ser modificada, afetando a integridade da junção intestinal, aumentando a permeabilidade e, consequentemente, facilitando a entrada de microrganismos patogênicos através da mucosa intestinal, como a *Salmonella* sp., o *Clostridium* sp. e a *Escherichia coli* (He et al., 2018).

Nawab et al. (2018) ressalvam a verificação da concentração de glicose sanguínea, pois o aumento de glicocorticoides induz a liberação de glicose no organismo para a manutenção de seu funcionamento, podendo acarretar diminuição do desempenho produtivo nas aves (Surai et al., 2019). A hiperglicemia também pode estar associada a liberação de catecolaminas em situações de estresse (Campbell, 1994). Além disso, as catecolaminas podem resultar em redução no número de eritrócitos, no valor do hematócrito e nas taxas de hemoglobina, afetando a captação de oxigênio e, consequentemente, na capacidade de transporte e difusão de oxigênio pelo sangue (Barcellos et al., 2004; Falcon et al., 2008; Teixeira et al., 2012).

Assim, a avaliação dos parâmetros sanguíneos como forma de compreensão de fatores imunossupressores, como é o caso do estresse, é essencial para o sucesso do manejo avícola, visando otimizar a saúde, o bem-estar e a eficiência (Hofmann et al., 2020).

2.4 Respostas biológicas ligadas a metilação do DNA

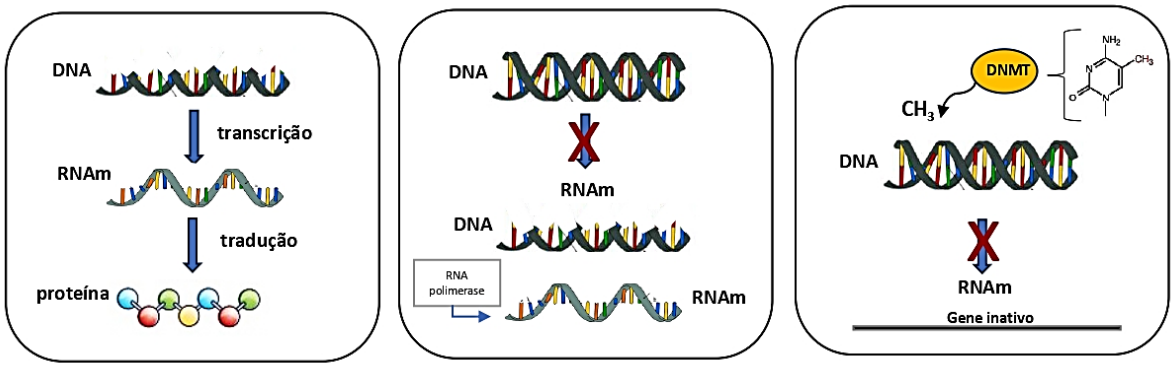
2.4.1 Epigenética e metilação do DNA

A epigenética constitui uma área de conhecimento que estuda as modificações químicas que ocorrem no núcleo celular e nos nucleotídeos e histonas do DNA. A metilação, acetilação e a fosforilação são exemplos dessas modificações, que são expressas nos genes e ocorrem ao longo do tempo em função de experiências ambientais (Noro & Gon, 2015), destacando-se a metilação, que é um mediadores epigenéticos mais estudados para respostas ao estresse em humanos e animais (Wang et al., 2012; Malan-Müller et al., 2014).

A metilação corresponde ao processo bioquímico que adiciona o grupo metil ($-CH_3$) na base nitrogenada citosina, sendo esse local responsável pela regulação da expressão gênica. Quando ocorre essa modificação, é um gerado o composto 5-metilcitosina (Reis, 2015), desenvolvendo uma ligação estável, duradoura e reversível (Champagne, 2008), e induzindo mudanças na expressão dos genes sem alterar a sequência das bases nitrogenadas transmitidas para gerações seguintes (Franklin et al., 2012; Hong et al., 2018). Xu et al. (2005), em estudo com duas linhagens de frangos de corte, encontraram dois conteúdos de metilação: o genético transmitido à primeira geração, que correspondeu a, aproximadamente, 50% herdado de ambos os pais, e o adquirido, que correspondeu a cerca de 5%.

É importante abordar que a expressão gênica é um processo de divisão e multiplicação celular, que ocorre através da transcrição do DNA para um RNA mensageiro, resultando na tradução para a formação de uma proteína (Figura 2.2). Inicialmente, o DNA encontra-se compactado dentro do núcleo celular e envolto por proteínas chamadas histonas, estando, portanto, inativo. Para ocorrer o processo de transcrição, o DNA precisa estar menos compactado. E para que isso ocorra, as histonas devem liberá-lo para que ele fique acessível a ação das enzimas. É durante este processo que ocorrem as alterações epigenéticas, pois são o resultado da adição ou remoção de estruturas químicas das partes “caudais” na ligação de duas histonas nos nucleotídeos, alterando a interação dessas proteínas com o DNA (Noro & Gon, 2015).

A adição do grupo metil no nucleotídeo, torna o DNA altamente compacto e com menor acessibilidade ao processo de transcrição gênica. Desse modo, o DNA metilado leva à redução da atividade biológica, promovendo o “silenciamento” dos genes (Gudsnuk & Champagne, 2011).



(a) (b) (c)

Figura 2.2. Regulação gênica - transcrição do DNA em RNA mensageiro (RNAm) (a), supressão da expressão gênica (b), metilação do DNA, adição do grupo metil pela enzima DNMT (DNA metiltransferase) à citosina na sequência do DNA. Fonte: Adaptado de Gudsnuk & Champagne (2011, p.705).

Segundo Yang et al. (2011), alguns estímulos resultam em modificações no conteúdo de metilação no organismo. Essas alterações podem desenvolver uma maior ou menor atividade celular, dependendo do grau das interações hereditárias e ambientais, promovendo um baixo ou alto nível de metilação (Dudley et al., 2011; Teh et al., 2014).

Baixos níveis de metilação desencadeiam aumento na expressão gênica com ativação de genes que promovem o crescimento celular, a instabilidade cromossômica e a perda de *imprinting* genômico (fenômeno epigenético no qual certos genes são expressos apenas por um alelo, enquanto o outro é metilado - inativado). Já altos níveis de metilação diminuem a expressão dos genes, resultando em baixo crescimento celular, reparação do DNA danificado e iniciação do processo de apoptose (morte celular programada). É importante ressaltar que tais condições são mantidas após a divisão celular e são transmitidas às células filhas (Noro & Gon, 2015). Teh et al. (2014) relatam que essas modificações constituem um mecanismo importante na regulação de células normais, pois permitem que ocorram mudanças na expressão gênica refletidas no fenótipo sem alterar a sequência de DNA e são altamente influenciados por componentes hereditários e ambientais Gan et al. (2013).

Estudos têm demonstrado que alguns indivíduos, quando submetidos ao estresse enquanto jovens, geram uma memória fisiológica promovendo, por exemplo, uma melhor adaptação ao ambiente durante a vida adulta (Yahav, 2009; Vinoth et al., 2018). A sobrevivência dessas aves aos extremos de calor ocorre devido a sua capacidade adaptativa, conhecida como mecanismo epigenético. Essas modificações podem ser desencadeadas no genoma de um indivíduo em qualquer momento de sua vida (Jirtle & Skinner, 2007). Paiva et

al. (2019) relatam que os mecanismos epigenéticos respondem a fatores externos e internos, como clima e nutrição, predispondo à mudanças nos fenótipos.

2.4.2 O estudo da Epignética e da metilação do DNA em aves

Vários estudos epigenéticos têm sido relatados em animais de interesse zootécnico como: suínos, ovinos, bovinos, frangos e galinhas (Hao et al., 2016; Lu et al., 2019; Garner et al., 2020; Pértille et al., 2020; Livernois et al., 2021). Esses animais estão constantemente expostos às condições de altas temperaturas em suas instalações, ocasionando estresse e, consequentemente, afetando a produtividade e o bem-estar animal (Frésard et al., 2013).

Segundo Tzschentke & Basta (2002), mudanças nas condições ambientais estão diretamente relacionadas aos processos epigenéticos, e a temperatura do ambiente afeta o sistema fisiológico durante a fase de desenvolvimento embrionário, podendo causar alterações no sistema termorregulador dos animais. Neste estudo, mudanças de 1 °C na faixa de temperatura para valores mais baixos ou mais altos foram suficientes para alterar a sensibilidade dos neurônios termorreguladores, pressupondo que a alteração foi causada pela adaptação epigenética à temperatura. Vinoth et al. (2018), em estudos com frangos de corte, observaram que os pintainhos que passaram por tratamento de alta temperatura no incubatório, apresentaram maior tolerância ao calor quando adultos e níveis de metilações mais altos em relação as aves que não passaram pelo estímulo térmico (Kisliouk et al., 2017; Vinoth et al., 2018).

Essas respostas podem representar um mecanismo protetor para manter a integridade e sobrevivência das células que passaram por estímulos estressantes, permitindo compreender as vias moleculares envolvidas nesses processos e identificar animais mais resilientes, suscetíveis e resistentes às condições ambientais (Livernois et al., 2021). Frésard et al. (2013) e Malan-Müller et al. (2014) relatam que os mecanismos epigenéticos podem ajudar a compreender a adaptação dos animais às mudanças ambientais relacionadas ao processo de resposta ao estresse.

De acordo com Wang et al. (2012), animais constantemente submetidos ao estresse podem promover alterações celulares influenciadas por mecanismos epigenéticos, e as células sanguíneas podem servir como biomarcadores epigenéticos da condição evolutiva do estresse (Frésard et al., 2013). Animais constantemente submetidos ao estresse têm alterações fisiológicas e biológicas em diferentes tecidos, incluindo células as sanguíneas (Perini et al., 2021). Estudos destacaram o uso do sangue como mediador de informações sobre as alterações epigenéticas, por ser um tecido não invasivo e uma amostragem das modificações de diversos

estímulos que o organismo passa. Pértille et al. (2020) comparou o conteúdo da metilação do DNA em hemácias de galinhas submetidas em diferentes biomas para verificar um perfil epigenético relacionado ao estresse, e Pértille et al. (2017) encontraram diferenças no conteúdo da metilação global em hemácias de galinhas criadas em diferentes condições.

Além das alterações nas hemácias, as diferenças na metilação também podem estar relacionadas com respostas imunológicas (Bélteky et al., 2018). Alguns estudos observaram alterações moleculares epigenéticas em resposta ao estresse térmico, alterando a função imunológica (Dahl et al., 2019). Pejaković et al. (2020) e Wang et al. (2017) observaram relação entre a metilação e a resistência a doenças causadas por *Salmonella* e herpervírus galídeo. Porém, é importante ressaltar que mesmo utilizando o sangue como amostra biológica, existem diferenças entre o conteúdo da metilação com os outros tecidos e variação entre indivíduos da mesma espécie (Husby, 2020).

O conteúdo de metilação é específico de um determinado tecido, pois está relacionado com a funcionalidade do órgão. A maioria dos estudos utilizam tecidos específicos, como o hipotálamo, o fígado e os rins, porém, para a coleta, é necessário o sacrifício do animal, algo que geralmente é indesejável. Nätt et al. (2012) e Han et al. (2020) utilizaram o hipotálamo e Han et al. (2020) utilizou o ovário para o estudo de metilação em poedeiras. Yang et al. (2011) relatam que o grau e o local de metilação podem ser encontrados em qualquer tipo de tecido, pois está relacionado com o mecanismo regulador da expressão gênica durante a diferenciação tecidual, e também por diferenças genéticas entre as aves (Sun et al., 2005; Xu et al., 2007).

As alterações observadas podem expressar diversas respostas ao estresse térmico e, podem variar entre diferentes linhagens de frangos de corte e de galinhas poedeiras em suas características morfológicas, metabolismo e mecanismos reguladores (Aduasiamah et al., 2021), fato este que pode estar ligado a própria individualidade do organismo, sua exposição ao ambiente e a predisposição genética. As diferentes respostas adaptativas podem estar ligadas a genes funcionais relacionados à resiliência e variações genéticas em todo o genoma da ave (Bush et al., 2017).

A obtenção de informações sobre a expressão gênica em resposta aos desafios ambientais, bem como as alterações moleculares, pode melhorar as estratégias adotadas nos sistemas produtivos e a identificação e seleção de animais mais resistentes, resilientes e suscetíveis ao calor (Zhang et al., 2023). Assim, estudos de quantificação global da metilação do DNA e avaliação dos mecanismos de adaptação fisiológica e biológica desencadeadas pelo estresse por calor são de extrema importância.

2.5 Efeito do estresse térmico sobre a qualidade do ovo

2.5.1 Principais características do oviduto das aves

As poedeiras são refratárias à luz nas primeiras 10 semanas de vida, passando a serem fotossensíveis após essa idade. Assim, o estímulo luminoso captado pelos receptores hipotalâmicos sinaliza ao hipotálamo para produzir o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH age na adeno-hipófise, liberando o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), direcionados ao ovário para produção dos estrógenos e da progesterona. Essa regulação hormonal indica o aumento na atividade de desenvolvimento do sistema reprodutivo das aves (Costa et al., 2017; Sah & Mishra, 2018). O sistema reprodutivo das aves é composto pelo ovário e oviduto esquerdos, sendo o lado direito atrofiado devido a substâncias inibidoras do ducto de Müller (origem do oviduto) pelo ovário (Froman et al., 2000). O desenvolvimento desse sistema ocorre a partir da 13ª semana de idade da ave, acentuando sua velocidade nas duas semanas que antecedem a postura do primeiro ovo. Nesse período, destacam-se o desenvolvimento das cristas e barbelas, características sexuais secundárias, e o aumento na deposição de tecido adiposo (Costa et al., 2017).

O ovário, portanto, é responsável pela produção de hormônios reprodutivos e de gametas femininos, os oócitos, popularmente conhecidos como ovócitos que, posteriormente, serão a gema dos ovos. Cada oócito está envolto por uma cápsula membranosa, formando um folículo, e sua quantidade é determinada antes mesmo do nascimento, correspondendo a cerca de 3.600 a 4.000 folículos minúsculos (USDA, 2000).

Quando ocorre a maturação dos oócitos, devido a ação do FSH e LH, o estigma se rompe e o oócito é liberado na cavidade abdominal, sendo captado pelo infundíbulo e encaminhado às demais partes do oviduto. O infundíbulo, primeiro segmento do oviduto, é onde ocorre a fecundação, caso haja presença de espermatozóides, e a adição da membrana vitelínica e da chalaza, em um período de 10 a 20 minutos (Costa et al., 2017).

Em seguida, o oócito passa pelo magno, havendo deposição de albúmen por um período de três horas. No ístmo, próximo segmento, camadas de albúmen continuam sendo adicionadas, juntamente com as membranas interna e externa da casca, permanecendo entre uma hora e uma hora e meia. Chegando na glândula da casca ou útero, há deposição de água, sais e glicose no ovo, até que atinja seu tamanho final. Posteriormente, inicia-se a deposição do cálcio pelas glândulas calcíferas para formação da casca, levando entre 20 e 23 horas. A vagina é o último segmento do oviduto, onde o ovo permanece entre 5 e 10 minutos, sendo responsável

por adicionar uma cutícula protetora para vedar os poros da casca e pela oviposição (Costa et al., 2017; Sah & Mishra, 2018).

Ao final do canal, está localizada a cloaca, que une os sistemas reprodutivo e excretor. O processo de formação do ovo leva entre 24 e 26 horas (Costa et al., 2017) e, aproximadamente meia hora após a oviposição, outra gema é liberada (ovulação), seguindo as mesmas etapas anteriores para a formação de um novo ovo (USDA, 2016).

A morfologia do oviduto pode ser afetada por fatores intrínsecos, como a genética das aves, ou por fatores externos, como a nutrição, a sanidade e o ambiente, resultando em alterações na composição dos ovos, na proporção de seus componentes e no tamanho e formato dos ovos (Carvalho & Fernandes, 2013).

As características internas e externas dos ovos dependem de inúmeras variáveis (Monira et al., 2003; Nikolova & Kocevski, 2006; Tůmová & Gous, 2012). No entanto, os resultados das análises de qualidade dos ovos podem indicar as possíveis alterações morfológicas do sistema reprodutivo de aves submetidas a determinadas condições de criação.

2.5.2 Principais características da qualidade interna e externa do ovo

A manutenção da qualidade dos ovos é importante para toda a cadeia produtiva e, visto a susceptibilidade de suas estruturas a fatores diversos, pesquisas devem ser realizadas buscando determinar respostas aos principais agentes estressores, como a elevada temperatura.

Apesar de muitas das análises de qualidade de ovos serem viáveis apenas em ambiente experimental, a determinação das características internas e externas dos ovos é uma forma de padronizar e garantir a qualidade do produto, principalmente considerando as exigências do mercado consumidor. Além disso, a demanda por ovos tem aumentado ao longo dos anos, seja pelo baixo custo em relação às outras fontes de proteína de origem animal ou pela busca de alimentos mais saudáveis (Michel et al., 2011; Medeiros & Alves, 2014).

O ovo é um alimento completo, composto por 75,8% de água, 12,4% de proteína, 9,96% de lipídeo, 0,96% de carboidrato e pequenas concentrações de minerais e vitaminas, totalizando 147 kcal de energia em 100 g de ovo (USDA, 2000). Além disso, apresenta compostos bioativos com ação anti-inflamatória e antioxidante, caracterizando-se como um alimento nutracêutico (Sarcinelli et al., 2007; Maia et al., 2017).

A composição e o tamanho do ovo podem variar conforme a idade da ave, a linhagem, a alimentação, a estação do ano e a temperatura (Graner & Trivelin, 1947; Carvalho & Fernandes, 2013). Entretanto, as proporções entre albúmen (63%), gema (27,5%) e casca (9,5%) permanecem similares (Maia et al., 2017).

Na gema, encontra-se a maior parte dos lipídeos, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), fósforo e ferro (Mazzuco, 2008). As vitaminas B2 (riboflavina) e B9 (ácido fólico) estão presentes na gema e no albúmen. A gema é recoberta pela membrana vitelínica, composta por fosfatidilcolina e esfingomielina, sendo responsável pela proteção contra a ruptura da gema. Conectando-se a essa membrana e ao albúmen, as chalazas (mucinas retorcidas) são responsáveis por centralizar a gema no ovo (Mazzuco, 2008; USDA, 2016).

O albúmen apresenta mais da metade das proteínas presentes no ovo (57%), destacando as ovoalbuminas, ovoglobulinas, ovomucoides e conoalbuminas, que possuem funções desejadas na indústria alimentícia, como gelatinização, formação de espuma e aeração. Também são encontradas vitaminas B1 (tiamina) e B12 (cianocobalamina) (Mazzuco, 2008).

A casca é composta por uma armação de substâncias orgânicas (escleroproteína e colágeno) e minerais (carbonato de cálcio, carbonato de magnésio e fosfato tricálcico), protegendo contra rompimentos e microrganismos e proporcionando trocas gasosas (Hunton, 2005). As membranas internas e externa da casca servem de base para a inserção da camada mamilar, composta principalmente por mucopolissacarídeos, sobre a qual tem início o processo de cristalização para formação da camada de cones e paliçada. Nessa etapa, o cálcio se liga aos mucopolissacarídeos, formando colunas de carbonato de cálcio na forma de calcita (Maia et al., 2017).

O processo de calcificação é resultado da combinação entre íons de cálcio (Ca_2^+) e bicarbonato (HCO_3^-), formando carbonato de cálcio ($CaCO_3$) e liberando hidrogênio (H^+). Caso não haja cálcio prontamente disponível, haverá remoção óssea (processo lento). A regulação desse mecanismo ocorre de acordo com o nível plasmático de cálcio, mediado pelos hormônios paratormônio, calcitonina, estrógeno e 1,25-dihidroxicolecalciferol, e pela ação do trato gastrointestinal (absorção), rins (regulação plasmática) e ossos (reserva) (Maia et al., 2017).

Os componentes dos ovos são obtidos, principalmente, via dieta, como no caso dos carotenoides amarelos (luteína e zeaxantina) e vermelhos (cantaxantina), responsáveis pela coloração da gema (Mazzuco, 2008). A coloração da gema, portanto, pode ser modulada de acordo com o mercado consumidor. As características desejáveis variam de acordo com fatores socioeconômicos, culturais e sensoriais, destacando-se o preço, a cor da gema, a aparência do ovo e o sabor (Rondoni et al., 2020).

Pode-se avaliar a qualidade desses ovos de acordo com características internas e externas. A qualidade da casca, por exemplo, pode ser avaliada pelo teste de gravidade específica, resistência de casca e espessura de casca. Os valores dessas variáveis podem ser

influenciados pela qualidade da matriz orgânica, deposição de cálcio, organização das colunas de calcita, tamanho e forma do ovo (Sapkota et al., 2017).

A gravidade específica é uma forma rápida, fácil e econômica de avaliar a densidade da casca (Reis et al., 2021). Os resultados são geralmente avaliados entre 1,060 e 1,100 g/mL, sendo que, quanto maior o valor, melhor a qualidade de casca. Com relação a resistência de casca, deve-se atentar às diversas metodologias disponíveis para a realização da análise, visto os diferentes resultados obtidos, dificultando sua padronização e comparação. No entanto, quanto maior a força registrada pelo equipamento, maior a resistência da casca (Montenegro et al., 2019).

Para avaliar a qualidade interna, pode-se medir a altura de albúmen e a coloração da gema. A unidade Haugh (UH) é calculada a partir dos dados de peso do ovo e altura de albúmen (Eisen, 1962). A técnica é de fácil execução e identificação visual durante a quebra dos ovos. A classificação do albúmen por esse método pode ser denso ($UH > 72$), média densidade ($60 < UH > 72$) e fluido ($UH < 60$), no qual quanto maior o valor, melhor a qualidade do ovo (USDA, 2000). Para ovos frescos, valores superiores a 88 foram considerados ideais (Long et al., 2016).

Carvalho et al. (2007), avaliando diferentes linhagens de poedeiras em idades de 29, 60 e 69 semanas, relataram aumento no tamanho do ovo e da gema e redução da unidade Haugh e da gravidade específica com o avançar da idade, independente da linhagem. Porém, a linhagem afetou a qualidade interna dos ovos.

Outras características internas dos ovos que indicam qualidade adequada são a altura da câmara de ar e o pH da gema e do albúmen. Em ovos frescos, o pH da gema deve ser 6,0 e do albúmen 6,6 (Sarcinelli et al., 2007).

Algumas condições externas do ovo interessam, principalmente, ao produtor. Nesta etapa, pode-se avaliar a incidência de ovos sujos, defeituosos, trincados e com manchas de sangue, representando a situação do lote e possibilitando ajustes de manejo (Alleoni & Antunes, 2001).

2.5.3 Efeito do estresse térmico na qualidade interna e externa do ovo

Quando em condições de estresse térmico, há uma resposta fisiológica do organismo na tentativa de retornar à homeostase, utilizando mecanismos evaporativos (hiperventilação) e não-evaporativos (condução, convecção e radiação) para perda de calor. Com o aumento da ofegação, há maior eliminação de dióxido de carbono (CO_2) pelo

sistema respiratório e, consequentemente, menos CO_2 disponível no sangue para formação de ácido carbônico (H_2CO_3). Como haverá menos H_2CO_3, menor será a quantidade de íons hidrogênio (H^+) resultantes de sua dissociação, contribuindo ainda mais com a alcalinização do sangue (Maia et al., 2017).

Os componentes citados compreendem o sistema tampão do sangue, indicado abaixo:

$$CO_2 + H_2O \longleftrightarrow H_2CO_3 \longleftrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

Ao mesmo tempo, os rins aumentam a excreção de bicarbonato (HCO_3^-) e diminuem a de H^+, na tentativa de reduzir o pH e reverter a alcalose respiratória. O conhecimento dessa síndrome metabólica é muito importante na produção de galinhas poedeiras, pois o processo de calcificação da casca dos ovos depende da formação do carbonato de cálcio ($CaCO_3$), que corresponde a 95% dos componentes da casca e ocorre a partir da combinação entre íons de cálcio (Ca_2^+) e bicarbonato (HCO_3^-), com a liberação do H^+. Assim, a menor disponibilidade de HCO_3^- no sangue reduz a mineralização da casca, afetando a qualidade dos ovos (Parsons, 1982; Marder & Arad, 1989; Nys et al., 2004).

Barrett et al. (2019) avaliaram poedeiras da linhagem Hy-line (24 a 28 semanas de idade) submetidas à estresse cíclico de temperatura, determinaram redução da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue (PCO_2) e do cálcio ionizado (iCa), e aumento do pH sanguíneo, resultando em menor peso de casca e confirmando o efeito negativo da alcalose respiratória. Além disso, houve redução no peso corporal, na produção de ovos e na UH, e aumento da eficiência alimentar (queda de consumo maior que a produtiva). Supôs-se que a qualidade da casca também piorou por uma possível redução absortiva de cálcio no intestino delgado, provavelmente alinhada com a redução do consumo de ração observado (Mashaly et al., 2004; Vandana et al., 2021).

Estudos avaliando poedeiras White Leghorn sob estresse térmico revelaram comportamento semelhante de diminuição no consumo, indicando uma resposta adaptativa para preservar a energia metabólica (Odihambo Mumma et al., 2006; Mack et al., 2013). A diminuição do consumo de ração objetiva amenizar o calor gerado pela digestão e metabolismo energético (Mack et al., 2013; Vandana et al., 2021). Aproximadamente 60% da ingestão total de energia é direcionada à manutenção da taxa metabólica basal. Em períodos de escassez energética, as galinhas podem deslocar o uso de energia de funções biológicas, como a reprodução, temporariamente interrompendo a postura de ovos para garantir a integridade fisiológica (Mack et al., 2013; Franco-Jimenez et al., 2007; Rozenboim et al., 2007).

O mecanismo responsável por reduzir a produção de ovos está ligado ao *feedback* negativo dos glicocorticóides (corticosterona) sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A corticosterona age nos receptores de glicocorticóides do hipotálamo, inibindo a liberação do GnRH e, consequentemente, prejudicando a secreção de LH e FSH pela adeno-hipófise. Esses hormônios são direcionados ao ovário para produção de estrógenos e da progesterona, induzindo ao amadurecimento dos folículos e ovulação. Assim, a ausência de FSH e LH nas gônadas pode causar a regressão do ovário, prejudicar a esteroidogênese e levar à diminuição na eficiência reprodutiva (Oguntunji & Alabi, 2010; Oluwagbenga & Fraley, 2023).

Li et al. (2020) avaliaram poedeiras da linhagem Hy-Line Brown (32 semanas de idade) sob condições de estresse, obtiveram diminuição das taxas de postura e número reduzido de grandes folículos amarelos e hierárquicos, resultado do aumento dos níveis de estresse oxidativo, do hormônio liberador de corticotrofina e corticosterona, da redução da proporção estradiol/progesterona no fluido folicular em folículos amarelos pequenos e grandes e da indução de apoptose nas células foliculares.

Outra resposta prejudicial à produção e qualidade de ovos é a vasodilatação para dissipar o calor corporal. Sob estresse térmico, os vasos periféricos se expandem e há aumento no fluxo sanguíneo para as extremidades do corpo, reduzindo simultaneamente o suprimento de sangue para órgãos internos, incluindo intestino, ovário e oviduto. Assim, há redução no nível de Ca^{+} no plasma que chega na glândula da casca e de demais nutrientes ao ovário, levando à diminuição da qualidade da casca e do peso e número ovariano, respectivamente (Ebeid et al., 2012).

O estresse térmico também reduz a intensidade da calbindina, proteína ligadora do cálcio que está presente em altas concentrações no intestino e na glândula da casca, afetando a absorção e transporte do mineral (Franco-Jimenez & Beck, 2007; Sugiyama et al., 2007; Ebeid et al., 2012; Moraes et al., 2021). Também há supressão da atividade da glândula tireóide, impedindo a formação da forma ativa de vitamina D3 nos rins e, consequentemente, afetando a disponibilidade de cálcio (Miller & Sunde, 1975; Franco-Jimenez & Beck, 2007; Ebeid et al., 2012; Khan et al., 2012; Moraes et al., 2021).

Estudos relatam redução na expressão gênica da calbindina e da anidrase carbônica (enzima que regula a produção de íon carbonato durante a formação da casca) na glândula da casca de aves submetidas a estresse térmico (Ebeid et al., 2012; Ma et al., 2014). Essas alterações levam à redução no peso absoluto e relativo da casca, na espessura e resistência da

casca e na gravidade específica, e maior porcentagem de ovos quebrados (Ebeid et al., 2012; Fouad et al., 2016).

O tecido ósseo desempenha papel crucial no controle da calcemia, através da remodelação óssea, na qual os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea (desmineralização e degradação da matriz óssea), liberando cálcio ao meio, e os osteoblastos são relacionados à formação óssea (mineralização e síntese da matriz), retirando cálcio do meio. Esse processo ocorre conforme a demanda de Ca^{+} do organismo, sendo de extrema importância em poedeiras, visto a contínua demanda do mineral para formação da casca do ovo (Whitehead & Fleming, 2000; Webster, 2004).

Em situações de estresse crônico, tem-se menor aproveitamento de cálcio dietético pela queda do consumo e menor absorção e transporte do mineral, ocasionados pela elevação da corticosterona. Para atender as necessidades produtivas da ave, então, há desequilíbrio na remodelação óssea, mediada pelo aumento do número de osteoclastos e da atividade de fatores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6 e TNF-α, resultando no aumento da reabsorção óssea e na supressão da osteoblastogênese. Isso, por sua vez, culmina na fragilidade óssea ou osteoporose, conhecida como fadiga da gaiola, e em baixa qualidade na casca dos ovos (Whitehead & Fleming, 2000; Webster, 2004; Ng & Chin, 2021; Stefanaki et al., 2023).

Adicionalmente, a alta frequência respiratória das aves eleva a taxa de respiração celular, aumentando a produção de espécies reativas. Esse estado de estresse oxidativo causa danos às células do organismo e, posteriormente, afetam tecidos e órgãos. Neste processo, são afetados o pâncreas, o intestino, o fígado e os órgãos imunológicos e reprodutivos, havendo redução na secreção de enzimas digestivas, absorção de nutrientes (cálcio e fósforo), produção de vitamina D3 e secreção da anidrase-carbônica e da calbindina (Mashaly et al., 2004; Franco-Jimenez et al., 2007; Ebeid et al., 2012; Diaz de Barboza et al., 2017; Sah & Mishra, 2018; Kim et al., 2020).

No sistema reprodutivo, ocorrem danos oxidativos nos folículos pequenos, causando redução do peso relativo do ovário e do oviduto, redução no comprimento do oviduto e no número de folículos grandes (Rozenboim et al., 2007; Sahin et al., 2010; Ma et al., 2014). A peroxidação lipídica elevada na gema também resulta em valores elevados de malonaldeído, reduzindo a cor da gema e o valor nutricional do ovo (Akdemir et al., 2009; Akdemir et al., 2015).

Situações de estresse também demonstraram afetar a coloração da casca dos ovos de poedeiras marrons durante sua formação (Mills et al., 1991; Nys et al., 1991; Mertens et al.,

2010), levando ao branqueamento dos ovos pelo término prematuro da pigmentação da casca. Características da qualidade interna dos ovos também apresentaram alterações, como redução da unidade Haugh após 2 e 4 semanas de exposição crônica de poedeiras ao estresse térmico (Barrett et al., 2019). Codornas submetidas a estresse térmico apresentaram ovos com menor altura e peso de albúmen, altura e diâmetro da gema, índice de gema e unidade Haugh (El-Tarabany, 2016). O grau de impacto negativo sobre a qualidade do ovo depende do tempo de exposição das aves às altas temperaturas, da idade das galinhas, da genética, da sanidade e da nutrição (Lara & Rostagno, 2013).

Tendo em vista o impacto das alterações de temperatura sobre as aves, estudos avaliando os parâmetros sanguíneos, o conteúdo da metilação global do DNA, o desempenho e a qualidade de ovos evidenciarão as respostas fisiológicas, biológicas e comportamentais das poedeiras frente ao estresse por calor.

2.6 Referências

Abbas, A. O., Alaqil, A. A., Mehaisen, G. M., & El Sabry, M. I. (2022). Effect of organic selenium-enriched yeast on relieving the deterioration of layer performance, immune function, and physiological indicators induced by heat stress. Frontiers in Veterinary Science, 9. https://doi.org/10.3389/fvets.2022.880790

Aduasiamah, P., Zhang, Y., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Yang, H., W.L. Zhang, W.L., & Zhang, L. (2021). Evaluation of physiological and molecular responses to acute heat stress in two chicken breeds. Animal, 15(2), 100-106. https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100106

Afsal, A., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., & Bhatta, R. (2018). Heat stress and livestock adaptation: Neuro-endocrine regulation. International Journal of Veterinary and Animal Medicine, 1(2). https://doi.org/10.31021/ijvam.20181108

Akdemir, F., & Sahin, K. (2009). Genistein supplementation to the quail: Effects on egg production and egg yolk genistein, daidzein, and lipid peroxidation levels. Poultry Science, 88(10), 2125-2131. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00004

Akdemir, F., Sahin, N., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, K., & Hayirli, A. (2015). Chromium-histidinate ameliorates productivity in heat-stressed Japanese quails through reducing oxidative stress and inhibiting heat-shock protein expression. British Poultry Science, 56(2), 247-254. https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1008992

Alleoni, A. C.C., & Antunes, A. J. (2001). Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. Scientia Agrícola, 58(4), 681-685. https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000400005

Barbosa, T. S., Mori, C. K., Polônio, L. B., Ponsano, E. H. G., & Ciarlini, P. C. (2011). Serum biochemical profile of laying hens in the region of Araçatuba, SP. Semina: Ciências Agrárias, 32(4), 1583-1588. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1583

Barcellos, L. J. G., Kreutz, L. C., Souza, C., Rodrigues, L. B., Fioreze, I., Quevedo, R. M., & Terra, S. (2004). Hematological changes in jundiá (Rhamdia quelen Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture, 237, 229-236. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.026

Barret, N. W., Rowland, K., Schmidt, C. J., Lamont, S. J., Rothschild, M. F., Ashwell, C. M., & Persia, M. E. (2019). Effects of acute and chronic heat stress on the performance, egg quality, body temperature, and blood gas parameters of laying hens. Poultry Science, 98, 6684-6692. https://doi.org/10.3382/ps/pez541

Barton, B., Schreck, C., & Barton, L. (1987). Effects of chronic Cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, *2*, 173–185. https://doi.org/10.3354/dao002173

Bélteky, J., Agnvall, B., Bektic, L., Höglund, A., Jensen, P., & Guerrero Bosagna, C. (2018). Epigenetics and early domestication: differences in hypothalamic DNA methylation between red junglefowl divergently selected for high or low fear of humans. Genetics Selection Evolution, 50(13). https://doi.org/10.1186/s12711-018-0384-z

Berrong, S. L., & Washburn, K. W. (1998). Effects of genetic variation on total plasma protein, body weight gains, and body temperature responses to heat stress. Poultry Science, 77 (3), 379-385.10.1093/ps/77.3.379

Borges, S. A., Maiorka, A., & Silva, A. V. F. (2003). Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. Ciência Rural, 33(5), 975-981. https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500028

Bounous, D. I., Roger, W. D., Penelope, G. S., Kilburn, J. V., & Charlotte, Q. F. (2000). Normal hematologic and serum biochemical reference intervals for juvenile wild turkeys. Journal of Wildlife Diseases, 36(2), 393-396. https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.2.393

Brandt, L. W., Clegg, R. E., & Andrews, A. C. (1951). The effect of age and degree of maturity on the serum proteins of the chicken. Journal of Biology Chemistral, 91(1), 105-111. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50956-X

Brossi, C., Contreras-Castilho, C. J., Amazonas, E. A., & Menten, J. F. M. (2009). Estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. Ciência Rural, 39(4), 1296-1305. https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000039

Bush, E. C., Ray, F., Alvarez, M. J., Realubit, R., Li, H., Karan, C., & Sims, P. A. (2017). Plate-seq for genome-wide regulatory network analysis of high-throughput screens. Nature Communication, 8(1), 1-7. https://doi.org/10.1038/S41467-017-00136-Z

Campbell, T. W. (1994). Hematology. Chapter 9. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison, & L. R. Harrison (Eds.), Avian Medicine: Principles and Application (pp. 176-198). Lake Worth: Wingers Publishing. http://www.michianabirdsociety.com/Avian%20Medicine_%20%20Princilpes%20and%20Application.pdf

Campbell, T. W., & Dein, F. J. (1984). Avian Hematology. The Basics. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 14(2), 223-248. https://doi.org/10.1016/S0195-5616(84)50031-X

Capitelli, R., & Crosta, L. (2013). 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, 16(1), 71-120. https://doi.org/10.1016/J.CVEX.2012.10.002

Cardoso, A. L. S. P., & Tessari, E. N. C. (2003). Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo, 70(4), 419-424. http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V70_4/cardoso.pdf

Carvalho, F. B., Stringhini, J. H., Filho, R. M. J., Leandro, N. S. M., Café, M. B., & De Deus, H. A. S. B. (2007). Qualidade interna e da casca para ovos de poedeiras comerciais de diferentes linhagens e idades. Ciência Animal Brasileira, 8(1), 25-29. https://doi.org/10.5216/cab.v8i1.1155

Carvalho, L. S. S., & Fernandes, E. A. (2013). Formação e qualidade da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. Medicina Veterinária, 7(1), 35-44. ISSN 1809-4678 https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/604

Chamblee, T. N., Morgan, G. W., & Schultz, C. D. (1989). Effect of refeeding following short-term deprivation of feed or water, or both, on selected physiological parameters for broiler chickens. Poultry Science, 68(12), 1619-1623. https://doi.org/10.3382/ps.0681619

Champagne, F. A. (2008). Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. Frontiers in Neuroendocrinology, 29, 386-397. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.03.003

Chang, Y., Wang, X. J., Feng, J. H., Zhang, M. H., Diao, H. J., Zhang, S. S., & Li, X. (2018). Real-time variations in body temperature of laying hens with increasing ambient temperature at different relative humidity levels. Poultry Science, 97(9), 3119–3125. https://doi.org/10.3382/ps/pey184

Chen, Y., Arsenault, R., Napper, S., & Griebel, P. (2015). Models and methods to investigate acute stress responses in cattle. Animals, 5(4), 1268-1295. https://doi.org/10.3390/ani5040411

Chovatiya, R., & Medzhitov, R. (2014). Stress, inflammation, and defense of homeostasis. Molecular Cell, 54(2), 281-288. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.030

Costa, F. G. P., Oliveira, D. V. G., Lima, M. R., & Oliveira, C. F. S. (2017). Fase de postura: pré-postura e primeiro ciclo de postura (até 40 semanas de idade). In L. F. T. Albino, B. R. Carvalho, R. C. Maia, & V. R. S. M. Barros (Eds.), Galinhas poedeiras: criação e alimentação (pp. 98-197). Aprenda Fácil.

Cottrell, J. J., Liu, F., Hung, A. T., DiGiacomo, K., Chauhan, S. S., Leury, B. J., & Dunshea, F. R. (2015). Nutritional strategies to alleviate heat stress in pigs. Animal Production Science, 55(12), 1391-1402. https://doi.org/10.1071/AN15255

Dahl, G. E., Skibiel, A. L., & Laporta, J. (2019). In utero heat stress programs reduced performance and health in calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 35(2), 343-353. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.02.005

Diaz de Barboza, G., Guizzardi, S., Moine, L., & Tolosa de Talamoni, N. (2017). Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. World Journal of Gastroenterology, 23(16), 2841-2853. https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i16.2841

Ding, H., Yue, Q., Chang, L., Xi, J., Chen, hui, Li, F., Wang, D., & Zhou, R. (2021). Whole blood gas and biochemical reference intervals for Lohmann Silver layers. Poultry Science, 100(9), 101368. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101368

Ding, J., He, S., Xiong, Y., Liu, D., Dai, S., & Hu, H. (2020). Effects of dietary supplementation of fumaric acid on growth performance, blood hematological and biochemical profile of broiler chickens exposed to chronic heat stress. Brazilian Journal of Poultry Science, 22, eRBCA. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1147

Dudley, K. J., Li, X., Kobor, M. S., Kippin, T. E., & Bredy, T. W. (2011). Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 35(7), 1544-1551. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.016

Ebeid, T. A., Suzuki, T., & Sugiyama, T. (2012). High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. Poultry Science, 91(9), 2282–2287. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01898

Eisen, E. J., Bohren, B. B., & McKeon, H. E. (1962). The Haugh unit for measuring egg quality. Poultry Science, 41(5), 1461-1468. https://doi.org/10.3382/ps.0411461

El-Tarabany, M. S. (2016). Effect of thermal stress on fertility and egg quality of Japanese quail. Journal of Thermal Biology, 61, 38–43. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.08.004

Falcon, D. R., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Solarte, W. V. N., & Guimarães, I. G. (2008). Leucograma da tilápia-do-nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. Ciência Animal Brasileira/Brazilian Animal Science, 9(3), artigo 3. https://doi.org/10.5216/cab.v9i3.519

Farag, M. R., & Alagawany, M. (2018). Physiological Alterations of Poultry to the High Environmental Temperature. Journal of Thermal Biology, 76, 101–106. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.012

Fouad, A. M., Chen, W., Ruan, D., Wang, S., Xia, W.G., & Zheng, C.T. (2016). Impact of heat stress on meat, egg quality, immunity and fertility in poultry and nutritional factors that overcome these effects: a review. International Journal of Poultry Science, 15, 81–95. https://doi.org/10.3923/ijps.2016.81.95

Franco-Jimenez, D. J., & Beck, M. M. (2007). Physiological changes to transient exposure to heat stress observed in laying hens. Poultry Science, 86(3), 538-544. https://doi.org/10.1093/ps/86.3.538

Franco-Jimenez, D. J., Scheideler, S. E., Kittok, R. J., Brown-Brandl, T. M., Robeson, L. R., Taira, H., & Beck, M. M. (2007). Differential effects of heat stress in three strains of laying

hens. Journal of Applied Poultry Research, 16(4), 628-634. https://doi.org/10.3382/japr.2005-00088

Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. Neuron, 75(5), 747–761. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016

Franzini, B. D., Cruz, L. C. F., Sampaio, S. A., Borges, K. F., Barros, H. S. S., Santana, F. X. de C., & Minafra, C. S. (2022). Indicadores sanguíneos hematológicos e hormonais do estresse na avicultura. Research, Society and Development, 11(3), artigo 3. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26303

Frésard, L., Morisson, M., Brun, J.-M., Collin, A., Pain, B., Minvielle, F., & Pitel, F. (2013). Epigenetics and phenotypic variability: some interesting insights from birds. Genetics Selection Evolution, 45(1), article 16. https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-16

Froman, D. P., Kirby, J. D., & Proudman, J. A. (2000). Chapter 16 Reproduction in Poultry: Male and Female. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds.), Reproduction in Farm Animals (7th ed., pp. 237–257). https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch16

Gan, J. K., Zhang, D. X., He, D. L., Zhang, X. Q., Chen, Z. Y., & Luo, Q. B. (2013). Promoter methylation negatively correlated with mRNA expression but not tissue differential expression after heat stress. Genetics and Molecular Research, 12(1), 809-819. https://doi.org/10.4238/2013.march.15.1

Garcia, P., Wang, Y., Viallet, J., & Jikova, Z. M. (2021). The chicken embryo model: a novel and relevant model for immune-based studies. Frontiers in Immunology, 12, article 791081. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.791081

Garner, J. B., Chamberlain, A. J., Vander Jagt, C., et al. (2020). Gene expression of the heat stress response in bovine peripheral white blood cells and milk somatic cells in vivo. Scientific Reports, 10(1), article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75438-2

Gomes, A. R. A., Litz, F. H., Morais, H. R., Oliveira, R. P. de, & Nascimento, M. R. B. de M. (2012). Estresse por calor na produção de frangos de corte. PUBVET, 6(34), article 34. https://doi.org/10.11606/D.10.2013.tde-18112013-112533

Gonzalez-Rivas, P. A., Chauhan, S. S., Ha, M., Fegan, N., Dunshea, F. R., & Warner, R. D. (2020). Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: a review. Meat Science, 162, article 108025. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025

Graner, E. A., & Trivelin, A. P. (1947). Análise do tamanho e da forma do ovo em galinhas das raças Rhode Island Red e Light Sussex e do híbrido entre essas duas raças. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 4, 393-402. https://doi.org/10.1590/S0071-12761947000100024

Gudsnuk, K. M. A., & Champagne, F. A. (2011). Epigenetic effects of maternal care. Clinics in Perinatology, 38, 703-717. https://doi.org/10.1016/j.clp.2011.08.005

Habibu, B., Kawu, M.U., Aluwong, T., & Makun, H.J. (2017). Influence of seasonal changes on physiological variables, hematology and serum thyroid hormones profile in male Red Sokoto

and Sahel goats. Journal of Applied Animal Research, v.45(1),508-516. https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1220384

Han, W., Xue, Q., Li, G., Yin, J., Zhang, H., Zhu, Y., & Zou, J. (2020). Genome-wide analysis of the role of DNA methylation in inbreeding depression of reproduction in Langshan chicken. Genomics, 112(4), 2677–2687. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.007

Hao, Y., Cui, Y., & Gu, X. (2016). Genome-wide DNA methylation profiles changes associated with constant heat stress n pigs as measured by bisulfite sequencing. Scientific Reports, 6(1). Available at: https://doi.org/10.1038/srep27507

Harmon, B. (1998). Avian heterophils in inflammation and disease resistance. Poultry Science, 77(7), 972–977. Available at: https://doi.org/10.1093/ps/77.7.972

Hassan, S., Habashy, W., Ghoname, M., & Elnaggar, A. (2023). Blood hematology and biochemical of four laying hen strains exposed to acute heat stress. International Journal of Biometeorology, 67(4), 675–686. Available at: https://doi.org/10.1007/s00484-023-02445-z

He, X., Lu, Z., Ma, B., Zhang, L., Li, J., Jiang, Y., Zhou, G., & Gao, F. (2018). Effects of chronic heat exposure on growth performance, intestinal epithelial histology, appetite-related hormones and genes expression in broilers. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(12), 4471–4478. https://doi.org/10.1002/jsfa.8971

Hofmann, T., Schmucker, S. S., Bessei, W., Grashorn, M., & Stefanski, V. (2020). Impact of Housing Environment on the Immune System in Chickens: A Review. Animals: An Open Access Journal from MDPI, 10(7), 1138. https://doi.org/10.3390/ani10071138

Hong, Y., Hong, S.H., Oh, Y.M., Shin, S.H., Choi, S.S., & Kim, W. J. (2018). Identification of lung cancer specific differentially methylated regions using genome-wide DNA methylation study. Molecular & Cellular Toxicology, 14(3), 315-32. https://doi.org/10.1007/s13273-018-0034-0

Hunton, P. (2005). Research on eggshell structure and quality: An historical overview. Brazilian Journal of Poultry Science, 7, 67–71. https://doi.org/10.1590/S1516-635X2005000200001

Husby, A. (2020). On the use of blood samples for measuring DNA methylation in ecological epigenetic studies. Integrative and Comparative Biology, 60(6), 1558–1566. https://doi.org/10.1093/icb/icaa123

Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nature Reviews Genetics, 8(4), 253-262. https://doi.org/10.1038/nrg2045

Khan, R. U., Naz, S., Nikousefat, Z., Selvaggi, M., Laudadio, V., & Tufarelli, V. (2012). Effect of ascorbic acid in heat-stressed poultry. World's Poultry Science Journal, 68(3), 477–490. https://doi.org/10.1017/S004393391200058X

Kim, D. H., Lee, Y. K., Lee, S. D., Kim, S. H., & Lee, K. W. (2021). Physiological and behavioral responses of laying hens exposed to long-term high temperature. Journal of Thermal Biology. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103017

Kim, D.-H., Lee, Y.-K., Lee, S.-D., Kim, S.-H., Lee, S.-R., Lee, H.-G., & Lee, K.-W. (2020). Changes in production parameters, egg qualities, fecal volatile fatty acids, nutrient digestibility, and plasma parameters in laying hens exposed to ambient temperature. Frontiers in Veterinary Science, 7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00412

Kisliouk, T., Cramer, T., & Meiri, N. (2017). Methyl CpG level at distal part of heat-shock protein promoter HSP70 exhibits epigenetic memory for heat stress by modulating recruitment of POU2F1-associated nucleosome-remodeling deacetylase (NURD) complex. Journal of Neurochemistry, 141(3), 358–372. https://doi.org/10.1111/jnc.14014

Lara, L. J., & Rostagno, M. H. (2013). Impact of heat stress on poultry production. Animals: An Open Access Journal from MDPI, 3(2), 356–369. https://doi.org/10.3390/ani3020356

Li, G.-M., Liu, L.-P., Yin, B., Liu, Y.-Y., Dong, W.-W., Gong, S., Zhang, J., & Tan, J.-H. (2020). Heat stress decreases egg production of laying hens by inducing apoptosis of follicular cells via activating the FasL/Fas and TNF-α systems. Poultry Science, 99(11), 6084–6093. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.024

Linsley, J. G., & Berger, R. R. (1964). Respiratory and cardiovascular responses in the hyperthermic domestic cock. Poultry Science, 43(2), 291–305. https://doi.org/10.3382/ps.0430291

Livernois, A. M., Mallard, B. A., Cartwright, S. L., & Cánovas, A. (2021). Heat stress and immune response phenotype affect DNA methylation in blood mononuclear cells from Holstein dairy cows. Scientific Reports, 11. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89951-5

Long, H., Zhao, Y., Xin, H., Hansen, H., Ning, Z., & Wang, T. (2016). Effect of light-emitting diode (LED) vs. fluorescent (FL) lighting on laying hens in aviary hen houses: Part 2 – Egg quality, shelf-life and lipid composition. Poultry Science, 95(1), 115–124. https://doi.org/10.3382/ps/pev306

Lu, Z., Ma, Y., Li, Q., Liu, E., Jin, M., Zhang, L., & Wei, C. (2019). The role of N6 - methyladenosine RNA methylation in the heat stress response of sheep (*Ovis aries*). Cell Stress and Chaperones, 24, 333–342. https://doi.org/10.1007/s12192-018-00965-x

Ma, X., Lin, Y., Zhang, H., Chen, W., Wang, S., Ruan, D., & Jiang, Z. (2014). Heat stress impairs the nutritional metabolism and reduces the productivity of egg-laying ducks. Animal Reproduction Science, 145, 182–190. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.002

Mack, L. A., Felver-Gant, J. N., Dennis, R. L., & Cheng, H. W. (2013). Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in 2 strains of laying hens. Poultry Science, 92(2), 285–294. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02589

Maia, R. C., Tavernari, F. C., Albino, L. F. T., Petrolli, T. G., Barros, V. R. S. M., & Carvalho, B. R. (2017). Formação e qualidade dos ovos. In L. F. T. Albino, B. R. Carvalho, R. C. Maia, & V. R. S. M. Barros (Eds.), Galinhas poedeiras: Criação e alimentação (1ª ed., pp. 271–346). Aprenda Fácil.

Malan-Müller, S., Seedat, S., & Hemmings, S. M. J. (2014). Understanding posttraumatic stress disorder: Insights from the methylome. Genes, Brain and Behavior, 13(1), 52–68. https://doi.org/10.1111/gbb.12102

Manning, R. O., Wyatt, R. D., & Fletcher, O. J. (1990). Effect of cold acclimation on the broiler chicks' resistance to dietary aflatoxin1. Poultry Science, 69(6), 915–921. https://doi.org/10.3382/ps.0690915

Marder, J., & Arad, Z. (1989). Panting and acid-base regulation in heat stressed birds. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 94(3), 395–400. https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90112-6

Mashaly, M. M., Hendricks, G. L., Kalama, M. A., Gehad, A. E., Abbas, A. O., & Patterson, P. H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens1. Poultry Science, 83(6), 889–894. https://doi.org/10.1093/ps/83.6.889

Mazzuco, H. (2008). Ovo: Alimento funcional, perfeito à saúde. Revista Avicultura Industrial - Embrapa-CNPSA, 2, 12–16. In: Medeiros, F. M., & Alves, M. G. M. (2014). Qualidade de ovos comerciais. Revista Eletrônica NutriTime, 11(4), Artigo 257, 3515–3524. https://www.nutritime.com.br/artigos/artigo-257-qualidade-de-ovos-comerciais/

Medway, W., & Kare, M. R. (1959). Blood and plasma volume, hematocrit, blood specific gravity and serum protein electrophoresis of the chicken. Poultry Science, 38(3), 624–63. https://doi.org/10.3382/ps.0380624

Mehaisen, G. M. K., Eshak, M. G., Elkaiaty, A. M., Atta, A. R. M. M., Mashaly, M. M., & Abass, A. O. (2017). Comprehensive growth performance, immune function, plasma biochemistry, gene expressions and cell death morphology responses to a daily corticosterone injection course in broiler chickens. PLOS ONE, 12(2), e0172684. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172684

Mertens, K., Vaesen, I., Loffel, J., Kemps, B., Kamers, B., Perianu, C., Zoons, J., Darius, P., Decuypere, E., De Baerdemaeker, J., & De Ketelaere, B. (2010). The transmission color value: A novel egg quality measure for recording shell color used for monitoring the stress and health status of a brown layer flock. Poultry Science, 89(3), 609–617. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00261

Michel, L. M., Punter, P. H., & Wismer, W. V. (2011). Perceptual attributes of poultry and other meat products: A repertory grid application. Meat Science, 87(4), 349–355. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.010

Miller, P. C., & Sunde, M. L. (1975). The effects of precise constant and cyclic environments on shell quality and other lay performance factors with Leghorn pullets. Poultry Science, 54(1), 36–46. https://doi.org/10.3382/ps.0540036

Mills, A. D., Nys, Y., Gautron, J., & Zawadski, J. (1991). Whitening of brown shelled eggs: Individual variation and relationships with age, fearfulness, oviposition interval and stress. British Poultry Science, 32(1), 117–129. https://doi.org/10.1080/00071669108417333

Mitchell, E. B., & Johns, J. (2008). Avian hematology and related disorders. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 11(3), 501–522. https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.004

Monira, K. N., Salahuddin, M., & Miah, G. (2003). Effect of breed and holding period on egg quality characteristics of chicken. International Journal of Poultry Science, 2(4), 261–263. https://doi.org/10.3923/ijps.2003.261.263

Montenegro, A. T., Garcia, E. A., Molino, A. B., Cruvinel, J. M., Ouros, C. C., & Alves, K. S. (2019). Methods To Evaluate The Eggshell Quality Of Table Eggs. Brazilian Journal of Poultry Science, 21, eRBCA. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1046

Moraes, L. R. de, Delicato, M. E. A., Cruz, A. da S., Silva, H. T. F. N. P. da, Alves, C. V. B. de V., Campos, D. B., Saraiva, E. P., Costa, F. P. da, & Guerra, R. R. (2021). Methionine supplementing effects on intestine, liver and uterus morphology, and on positivity and expression of calbindin-D28k and TRPV6 epithelial calcium carriers in laying quail in thermoneutral conditions and under thermal stress. PLOS ONE, 16(1), e0245615. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245615

Morgulis, M. S. (2002). Capítulo 18 Imunologia aplicada. In M. Macari, R. L. Furlan, & E. Gonzales (Eds.), Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte (pp. 231-245). Jaboticabal: FUNEP/UNESP.

Nascimento, S. T., Maia, A. S. C., Gebremedhin, K. G., & Nascimento, C. C. N. (2017). Metabolic heat production and evaporation of poultry. Poultry science, 96(8), 2691–2698. https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.3382/ps/pex094

Nätt, D., Rubin, C. J., Wright, D., Johnsson, M., Beltéky, J., Andersson, L., & Jensen, P. (2012). Heritable genome-wide variation of gene expression and promoter methylation between wild and domesticated chickens. Genomics, 13(59). http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/59

Nawab, A., Ibtisham, F., Li, G., Kieser, B., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Nawab, Y., Li, K., Xiao, M., & An, L. (2018). Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. Journal of Thermal Biology, 78, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010

Nawaz, A. H., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Zhang, W. L., & Zhang, L. (2021). Poultry Response to Heat Stress: Its Physiological, Metabolic, and Genetic Implications on Meat Production and Quality Including Strategies to Improve Broiler Production in a Warming World. Frontiers in veterinary science, 8, 699081. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081

Ng, J.-S., & Chin, K.-Y. (2021). Potential mechanisms linking psychological stress to bone health. International Journal of Medical Sciences, 18(3), 604–614. https://doi.org/10.7150/ijms.50680

Nikolova, N., & Kocevski, D. (2006). Forming egg shape index as influenced by ambient temperatures and age of hens. Biotechnology in Animal Husbandry, 22 (1–2), 119–125. https://doi.org/10.2298/BAH0602119

Noro, G., & Gon, M. C. C. (2015). Epigenética, cuidados maternais e vulnerabilidade ao estresse: Conceitos básicos e aplicabilidade. Psychology/Psicologia: Reflexão e Crítica, 2(4), 829–839. https://doi.org/10.1590/1678-7153.201528422

Nwaigwe, C. U., Ihedioha, J. I., Shoyinka, S. V., & Nwaigwe, C. O. (2020). Evaluation of the hematological and clinical biochemical markers of stress in broiler chickens. Veterinary World, 13(10), 2294–2300. https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2294-2300

Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2004). Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins. Comptes Rendus Palevol, 3(6), 549–562. https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.08.002

Nys, Y., Zawadzki, J., Gautron, J., & Mills, A. D. (1991). Whitening of brown-shelled eggs: Mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. Poultry Science, 70(5), 1236–1245. https://doi.org/10.3382/ps.0701236

Odihambo Mumma, J., Thaxton, J. P., Vizzier-Thaxton, Y., & Dodson, W. L. (2006). Physiological stress in laying hens. Poultry Science, 85(4), 761–769. https://doi.org/10.1093/ps/85.4.761

Odom, T. W., Harrison, P. C., & Bottje, W. G. (1986). Effects of thermal induced respiratory alkalosis on blood ionized calcium levels in the domestic hen. Poultry Science, 65(3), 570–573. https://doi.org/10.3382/ps.0650570

Oguntunji, A. O., & Alabi, O. M. (2010). Influence of high environmental temperature on egg production and shell quality: A review. World's Poultry Science Journal, 66(4), 739–750. doi:10.1017/S004393391000070X

Oluwagbenga, E. M., & Fraley, G. S. (2023). Heat stress and poultry production: A comprehensive review. Poultry Science, 102(12), 103141. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103141

Paiva, J. T., Resende, M. D. V., Resende, R. T., Oliveira, H. R., Silva, H. T., Caetano, G. C., Lopes, P. S., & Silva, F. F. (2019). Epigenética: Mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. Archivos de Zootecnia, 68(262), 304–311. https://doi.org/10.21071/az.v68i262.4151

Parsons, A. H. (1982). Structure of the eggshell 1. Poultry Science, 61(10), 2013–2021. https://doi.org/10.3382/ps.0612013

Pejaković, S., Mboumbouo Mfossa, A. C., Wiggers, L., Kheimar, A., Coupeau, D., Kaufer, B. B., & Muylkens, B. (2020). Role of DNA methylation and CpG sites in the viral telomerase RNA promoter during gallid herpesvirus 2 pathogenesis. Journal of Virology, 94(23). https://doi.org/10.1128/JVI.01488-20.

Perini, F., Cendron, F., Rovelli, G., Castellini, C., Cassandro, M., & Lasagna, E. (2021). Emerging genetic tools to investigate molecular pathways related to heat stress in chickens: A review. Animals, 11(46). https://doi.org/10.3390/ani11010046

Pértille, F., Brantsæter, M., Nordgreen, J., Coutinho, L. L., Janczak, A. M., Jensen, P., & Guerrero-Bosagna, C. (2017). DNA methylation profiles in red blood cells of adult hens correlate with their rearing conditions. Journal of Experimental Biology, 220, 3579–3587. https://doi.org/10.1242/jeb.157891

Pértille, F., Ibelli, A. M. G., Sharif, M. E., Poleti, M. D., Fröhlich, A. S., Rezaei, S., Ledur, M. C., Jensen, P., Guerrero-Bosagna, C., & Coutinho, L. L. (2020). Putative epigenetic biomarkers of stress in red blood cells of chickens reared across different biomes. Frontiers in Genetics, 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.508809

Reis, A. P. (2015). Epigenética da asma: Revisão. Brazilian Journal Allergy and Immunology, 3(1), 13–18. http://aaai-asbai.org.br/detalhe_artigo.asp?id=716

Reis, T. L., Moraes, J. E., Calixto, L. F. L., & Pizzolante, C. C. (2021). Acurácia de dias de avaliação da gravidade específica como medida da qualidade de casca de ovos de galinhas. Research, Society and Development, 10(5), artigo 5. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.15148

Romero, L. M., & Wingfield, J. C. (2015) Tempests, Poxes, Predators, and People: Stress in Wild Animals and How They Cope. Oxford Series in Behavioral Neuroendocrinology, New York, online edn, Oxford Academic), https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195366693.001.0001

Rondoni, A., Asioil, D., & Millan, E. (2020). Consumer behaviour, perceptions, and preferences towards eggs: A review of the literature and discussion of industry implications. Trends in Food Science & Technology, 106, 391–401. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.038

Rozenboim, I., Tako, E., Gal-Garber, O., Proudman, J. A., & Uni, Z. (2007). The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. Poultry Science, 86(8), 1760–1765. https://doi.org/10.1093/ps/86.8.1760

Sah, N., & Mishra, B. (2018). Regulation of egg formation in the oviduct of laying hen. World's Poultry Science Journal, 74(3), 509–522. https://doi.org/10.1017/S0043933918000442

Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., Ali, S., Sahin, N., & Hayirli, A. (2010). Epigallocatechin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defense system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-stressed quails. Poultry Science, 89(10), 2251–2258. https://doi.org/10.3382/ps.2010-00749

Sapkota, S., Kolachhapati, M. R., Devkota, N. R., Gorkhali, N. A., & Bhattarai, N. (2017). Evaluation of egg laying and egg quality parameters of local chicken Sakini (Gallus gallus domesticus) of Nepal. Journal of Agriculture and Forestry University, 1, 181–188. https://www.researchgate.net/publication/335881928_EVALUATION_OF_EGG_LAYING_AND_EGG_QUALITY_PARAMETERS_OF_LOCAL_CHICKEN_SAKINI_Gallus_gallus_domesticus_OF_NEPAL

Sarcinelli, M. F., Venturini, K. S., & da Silva, L. C. (2007). Características dos ovos. Boletim Técnico, Programa Institucional de Extensão UFES - Universidade Federal do Espírito Santo. https://www.agais.com/telomc/b00707_caracteristicas_ovos.pdf

Sartoris, F. J., & Pörtner, H. O. (1997). Increased concentrations of haemolymph Mg2+ protect intracellular pH and ATP levels during temperature stress and anoxia in the common shrimp Crangon crangon. Journal of Experimental Biology, 200(4), 785–792. https://doi.org/10.1242/jeb.200.4.785

Schmidt, E. M. S., Paulillo, A. C., Santin, E., Dittrich, R. L., & Oliveira, E. G. (2007a). Hematological and serum chemistry values for the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): Variation with sex and age. International Journal of Poultry Science, 6(2), 137–139. https://doi.org/10.3923/ijps.2007.137.139

Schmidt, E. M. S., Santin, E., Dittrich, R., & Paulillo, A. C. (2007b). Clinical pathology in poultry – A tool to improve poultry health – A review. Archives of Veterinary Science, 12(3), 9–20. https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/10906/7366

Shakeri, M., Cottrell, J. J., Wilkinson, S., Ringuet, M., Furness, J. B., & Dunshea, F. R. (2018). Betaine and antioxidants improve growth performance, breast muscle development and ameliorate thermoregulatory responses to cyclic heat exposure in broiler chickens. Animals, 8(10). https://doi.org/10.3390/ani8100162

Stefanaki, C., Paltoglou, G., Mastorakos, G., & Chrousos, G. P. (2023). Chronic stress and steatosis of muscles, bones, liver, and pancreas: A review. Hormone Research in Paediatrics, 96(1), 66–73. https://doi.org/10.1159/000522540

Sturkie, P. D., & Newman, H. J. (1951). Plasma proteins of chickens as influenced by time of laying, ovulation, number of blood samples taken and plasma volume 1. Poultry Science, 30(2), 240–248. https://doi.org/10.3382/ps.0300240

Sugiyama, T., Kikuchi, H., Hiyama, S., Nishizawa, K., & Kusuhara, S. (2007). Expression and localisation of calbindin D28k in all intestinal segments of the laying hen. British Poultry Science, 48(2), 233–238. https://doi.org/10.1080/00071660701302270

Sun, D., Wang, D., Zhang, Y., Yu, Y., Xu, G., & Li, J. (2005). Differential gene expression in liver of inbred chickens and their hybrid offspring. Animal Genetics, 36(3), 210–215. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01288.x

Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., & Kidd, M. T. (2019). Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. Antioxidants, 8(7), article 7. https://doi.org/10.3390/antiox8070235

Teh, A. L., Pan, H., Chen, L., Ong, M.-L., Dogra, S., Wong, J., MacIsaac, J. L., Mah, S. M., McEwen, L. M., Saw, S.-M., Godfrey, K. M., Chong, Y.-S., Kwek, K., Kwoh, C.-K., Soh, S.-E., Chong, M. F. F., Barton, S., Karnani, N., Cheong, C. Y., & Holbrook, J. D. (2014). The effect of genotype and in utero environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes. Genome Research, 24(7), 1064–1074. https://doi.org/10.1101/gr.171439.113

Teixeira, C. P., Barros, M. M., Pezzato, L. E., Fernandes, A. C., Koch, J. F. A., & Padovani, C. R. (2012). Growth performance of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. Aquaculture Research, 43(8), 1081–1088. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02911.x

Tessari, E. N. C., Oliveira, C. A. F., Cardoso, A. L. S. P., Ledoux, D. R., & Rottinghaus, G. E. (2006). Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. British Poultry Science, 47(3), 357–364. https://doi.org/10.1080/00071660600756071

Tůmová, E., & Gous, R. M. (2012). Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. Poultry Science, 91(5), 1269–1275. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01951

Tzschentke, B., & Basta, D. (2002). Early development of neuronal hypothalamic thermosensitivity in birds: Influence of epigenetic temperature adaptation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 131(4), 825–832. https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00020-X

USDA. (2000). Egg-Grading Manual. United States Department of Agriculture Agricultural Marketing Service Agricultural Handbook Number 75. https://www.ams.usda.gov/grades-standards/egg-grading-manual

USDA. United States Department of Agriculture. (2016). Biology of eggs. https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1f13a3dd-8931-4d5a-af1b597917db353e/ept_biology_eggs.pdf?MOD=AJPERES

Vandana, G. D., Sejian, V., Lees, A. M., Pragna, P., Silpa, M. V., & Maloney, S. K. (2021). Heat stress and poultry production: Impact and amelioration. International Journal of Biometeorology, 65(2), 163–179. https://doi.org/10.1007/s00484-020-02023-7

Vinoth, A., Thirunalasundari, T., Shanmugam, M., Uthrakumar, A., Suji, S., & Rajkumar, U. (2018). Evaluation of DNA methylation and mRNA expression of heat shock proteins in thermal manipulated chicken. Cell Stress and Chaperones, 23(2), 235–252. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0837-2

Wang, D., Szyf, M., Benkelfat, C., Provençal, N., Turecki, G., Caramaschi, D., Côté, S. M., Vitaro, F., Tremblay, R. E., & Booij, L. (2012). Peripheral SLC6A4 DNA methylation is associated with in vivo measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression. PLoS One, 7(6), e39501. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039501

Wang, F., Li, J., Li, Q., Liu, R., Zheng, M., Wang, Q., Wen, J., & Zhao, G. (2017). Changes of host DNA methylation in domestic chickens infected with Salmonella enterica. Journal of Genetics, 96(4), 545–550. https://doi.org/10.1007/s12041-017-0818-3

Wang, J., Zhu, B., Wen, J., Li, Q., & Zhao, G. (2020). Genome-wide association study and pathway analysis for heterophil/lymphocyte (H/L) ratio in chicken. Genes, 11(9), 1005. https://doi.org/10.3390/genes11091005

Webster, A. B. (2004). Welfare implications of avian osteoporosis. Poultry Science, 83(2), 184–192. https://doi.org/10.1093/ps/83.2.184

Weiss, D. J., Wardrop, K. J., & Schalm, O. W. (2010). Schalm's veterinary hematology (6ª ed.). Wiley-Blackwell.

Whitehead, C. C., & Fleming, R. H. (2000). Osteoporosis in cage layers. Poultry Science, 79(7), 1033–1041. https://doi.org/10.1093/ps/79.7.1033

Xu, Q., Sun, D., & Zhang, Y. (2005). F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome. Chinese Science Bulletin, 50(18), 2039–2044. https://doi.org/10.1007/bf03322798

Xu, Q., Zhang, Y., Sun, D., Wang, Y., & Yu, Y. (2007). Analysis on DNA methylation of various tissues in chicken. Animal Biotechnology, 18(4), 231–241. https://doi.org/10.1080/10495390701574838

Yahav, S. (2009). Alleviating heat stress in domestic fowl: Different strategies. World's Poultry Science Journal, 65(4), 719–732. https://doi.org/10.1017/s004393390900049x

Yang, C., Zhang, M., Niu, W., Yang, R., Zhang, Y., Qiu, Z., Sun, B., & Zhao, Z. (2011). Analysis of DNA methylation in various swine tissues. PLoS One, 6(1), e16229. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016229

Yousaf, A., Jabbar, A., Rajput, N., Azizullah, M., Shahnawaz, R., Mukhtar, N., Farooq, F., Abbas, M., & Khalil, R. (2019). Effect of environmental heat stress on performance and carcass yield of broiler chicks. Journal of World's Poultry Research, 9(1), 26–30. https://doi.org/10.36380/scil.2019.wvj4

Zhang, T., Li, C., Deng, J., Jia, Y., Qu, L., & Ning, Z. (2023). Chicken hypothalamic and ovarian DNA methylome alteration in response to forced molting. Animals, 13, article 6. https://doi.org/10.3390/ani13061012

CAPÍTULO 3

COMPREENDENDO A RESILIÊNCIA DA PRODUÇÃO DE OVOS EM GALINHAS POEDEIRAS ESTRESSADAS PELO CALOR: UMA INVESTIGAÇÃO COMPARATIVA DE DUAS LINHAGENS

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o tempo de recuperação da produção de ovos de duas linhagens de poedeiras sob duas temperaturas, considerando o peso corporal, a temperatura retal, o consumo de ração e a qualidade de ovos. Avaliamos 192 poedeiras, 96 Dekalb White e 96 Dekalb Brown, em condições de estresse por calor (35 ºC de dia e 26 ºC à noite) e de conforto térmico (26 ºC de dia e 24 ºC à noite), com umidade relativa de 60%. A produção de ambas as linhagens teve queda acentuada durante a primeira semana de estresse térmico, recuperando a produção a partir da segunda semana, sendo que para a linhagem Dekalb White a viabilidade equiparou ao patamar de conforto, e a linhagem Brown permaneceu cerca de 10% inferior. O estresse por calor elevou a temperatura corporal, e reduziu o consumo de ração, o peso das aves e o peso do ovo em ambas as linhagens. A qualidade da casca para a linhagem Dekalb Brown foi mantida, e na Dekalb White houve piora. Encontramos indícios de que o processo adaptativo das aves pode ocorrer na primeira semana de desafio ambiental, de modo que, após esse período, espera-se manutenção da produção e qualidade de ovos em aves sob o desafio por calor. As estratégias de adaptação foram distintas entre as linhagens, com a linhagem Dekalb White reduzindo a qualidade de casca para a manter a produção, enquanto a Dekalb Brown manteve a qualidade de casca em detrimento da produtividade.

Palavras-chave: Aclimatação. Avicultura. Ganho de peso. Qualidade de ovos.

3.1 Introdução

Temperaturas elevadas representam um dos desafios ambientais que mais prejudicam a produção avícola (Lee et al., 2021). Se a temperatura exceder a zona termoneutra, há um desregulamento do funcionamento fisiológico reduzindo o desempenho produtivo (Afsal et al., 2018).

O estresse por calor ocorre quando a capacidade de dissipar o calor extra ao ambiente é reduzida (Surai, 2020). O estresse por calor é considerado agudo quando ocorre por um curto período, e crônico quando ocorre por longos períodos. Os danos causados dependem da intensidade e da duração do estímulo estressor em que o animal está exposto (Adu-Asiamah

et al., 2021), podendo resultar na diminuição da produção e da qualidade dos ovos, e no aumento da mortalidade (Wasti et al., 2020).

As aves possuem alta atividade metabólica e uma zona termoneutra limitada (Lara & Rostagno, 2013; Kim et al., 2020) que, somada a ausência de glândulas sudoríparas e a presença de penas, dificulta dissipar o calor e resulta em termorregulação ineficiente, podendo ocasionar morte. Esse problema é constantemente observado nas épocas de intensas ondas de calor, na qual a mortalidade das aves aumenta significativamente (Wolf & Walsberg, 2000; Adu-Asiamah et al., 2021). A onda de calor é uma condição climática que predispõe o estresse agudo, classificado como intenso e de curta duração, proporcionando grande dificuldade das aves em se adaptarem a mudança do ambiente térmico. Devido às mudanças climáticas, esses eventos extremos têm aumentado a frequência, intensidade e duração (Lamarca et al., 2018; Riquena et al., 2019), proporcionando desafios de estresse por calor crônico para aves criadas nas regiões produtoras entre os trópicos.

O ofego é uma resposta fisiológica das aves sob estresse por calor que favorece a perda de calor latente através do sistema respiratório. No entanto, esse processo reduz a taxa de dióxido de carbônico (CO_2) sanguíneo e eleva seu pH, caracterizando a alcalose respiratória. O desequilíbrio causado no organismo da ave, caso não consiga se adaptar, causará a morte da galinha (Odom et al., 1986). A alcalose do sangue reduz a concentração de cálcio ionizado, aumenta a proporção do cálcio ligado à proteína ou conjugado com ácidos orgânicos, e reduz o CO_2 necessário para a formação do carbonato de cálcio ($CaCO_3$), tornando-os indisponíveis para a formação da casca do ovo (Usayran et al., 2001). A má formação da casca resultará em menor resistência e espessura de casca, deixando os ovos mais suscetíveis a contaminação e a quebra (Mazzuco & Bertechini, 2014).

A elevada temperatura ambiente aumenta a temperatura interna da ave, indicada pela temperatura retal, e, na tentativa de reduzir o calor endógeno originário da digestão, há redução do consumo de ração e, consequentemente, de nutrientes prontamente disponíveis para manutenção das aves e produção de ovos (Franco-Jimenez et al., 2007; Oluwagbenga & Fraley, 2023). A redução do consumo, além de reduzir o peso corporal (Garriga et al., 2006; Lin et al., 2008; Nawab et al., 2018), também ocasiona expressão gênica ovariana e níveis hormonais reprodutivos anormais, afetando o peso do ovo (Huston et al., 1957; Li et al., 2020). Também ocorrem alterações no equilíbrio ácido-base e na concentração de cálcio (Mahmoud et al., 1996; Kim et al., 2024), que podem resultar em efeitos mais ou menos expressivos de acordo com a genética, indicando que as poedeiras lidam com essas alterações de maneira diferente durante

a adaptação (Jiménez & Beck, 2007), apesar destes mecanismos não estarem totalmente compreendidos.

Melesse et al. (2011) verificaram que há diferença na termotolerância entre cinco linhagens de poedeiras, indicando que algumas são mais resistentes. Entretanto, o entendimento do processo adaptativo e quais os mecanismos vinculados ainda permanecem incertos, sendo necessários estudos que explorem as especificidades de cada linhagem, o que permitirá elaborar estratégias mais eficazes para mitigar os efeitos do estresse por calor.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o tempo de recuperação da produção de ovos de duas diferentes linhagens de poedeiras sob estresse por calor crônico, avaliando o peso corporal, a temperatura retal, o consumo de ração e a qualidade de ovos, para melhor entender os mecanismos adaptativos destas galinhas.

3.2 Metodologia

3.2.1 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi realizado em duas câmaras climáticas com 96 aves Dekalb White e 96 Dekalb Brown, totalizando 192 aves. Os animais foram divididos em dois grupos e os tratamentos foram repetidos, invertendo as câmaras climáticas. Todas as aves eram do mesmo lote de produção e foram cedidas por uma granja comercial. Na primeira repetição, as aves de ambas as linhagens estavam com 34 semanas de idade e, na segunda repetição, as aves estavam com 45 semanas. Foram alojadas em grupos de 4 aves/gaiola dentro das câmaras climáticas, totalizando 6 gaiolas para cada linhagem por tratamento de temperatura e repetição. Cada câmara climática foi programada para um tratamento de temperatura, que foi aplicado nas aves por 28 dias consecutivos. O tratamento de estresse por calor foi caracterizado por uma temperatura de 35 ºC durante o dia (9:00 às 20:00), reduzindo a temperatura para 26 ºC durante a noite (20:00 às 9:00). No tratamento de controle, a temperatura durante o dia foi de 26 ºC e a noite de 24 ºC. A umidade relativa foi mantida constante em 60%. Na segunda repetição, nós invertemos os tratamentos nas câmaras climáticas para controlar o efeito das salas nos resultados. As aves de cada repetição foram submetidas a um período de adaptação de sete dias com uma temperatura constante de 26 ºC.

O fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro foi adotado, obtido por iluminação artificial. As aves tiveram acesso *ad libitum* à água e 110 g/ave de ração dividida duas vezes ao dia, às 8:00 e às 16:00 horas, com uma dieta contendo 2.846 kcal/kg de energia metabolizável, 14,93% de proteína bruta, 4,48% de cálcio e 0,29% de fósforo disponível. O delineamento

experimental considerado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2×2 em parcelas subdivididas.

3.2.2 Registro da produção e qualidade do ovo

Os ovos foram coletados diariamente para verificação da viabilidade de produção, calculada pela expressão a seguir.

$$Viabilidade\ de\ produção = \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{número\ de\ ovos\ coletados\ na\ gaiola}{número\ de\ aves\ na\ gaiola}}{n}$$

Onde n é o número de gaiolas.

A qualidade dos ovos foi aferida para todos os ovos coletados nos três primeiros dias e nos três últimos dias de cada ciclo de 28 dias. Primeiramente, foi avaliada a gravidade específica realizando a imersão dos ovos em soluções salinas ajustadas em densidades variando de 1,060 a 1,100 g/mL, em intervalos de 0,005. Os ovos foram submersos nos recipientes da menor para a maior concentração, registrando-se a concentração na qual flutuaram. As variáveis de peso, resistência da casca, altura do albúmen, unidade Haugh e cor da gema foram avaliadas no equipamento Digital Egg Tester, (DET-6000, Nabel Co. Ltd., Kyoto, Japan) e a espessura da casca, no paquímetro digital acoplado ao equipamento.

3.2.3 Peso das aves, temperatura interna e consumo de ração

O peso corporal e a temperatura interna de todas as aves foram monitorados semanalmente durante o ciclo de 28 dias, totalizando quatro coletas em cada repetição. O peso foi registrado em balança de plataforma (B-160, Líder Co. Ltda, Araçatuba, São Paulo, Brasil), com precisão de 5 gramas, e a temperatura interna foi aferida com um termômetro digital clínico inserido no reto.

A quantidade de ração fornecida e as sobras foram pesadas e registradas diariamente. Como as linhagens foram dispostas aleatoriamente nas gaiolas no interior das câmaras climáticas, não medimos a sobra de ração por linhagem, mas o total de ração não consumida em cada tratamento de temperatura.

3.2.4 Análise dos dados

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no esquema fatorial 2×2 (duas strains e dois tratamentos de temperatura) com parcelas subdivididas. Treatment é o fator da parcela completa e strain o fator da subparcela e a repetição o bloco.

Eliminamos valores de outliers por meio da análise de boxplot. A partir desse dataset, realizamos ANOVA para cada dia de coleta para as variáveis peso das aves e temperatura retal. Posteriormente, aplicamos o teste de Tukey para verificar diferenças entre os tratamentos de temperatura e linhagem combinados.

A variação da viabilidade dos ovos foi avaliada diariamente e comparado pelo teste t pareado. A quantidade de ovos trincados foi comparada pelo teste de qui-quadrado. A qualidade dos ovos foi comparada dentro de cada linhagem, entre os níveis Conforto e Estresse por calor, utilizando o teste t-Student.

3.3 Resultados

3.3.1 Peso e temperatura retal

A Figura 3.1 mostra a curva de ganho de peso das aves Dekalb White e Dekalb Brown para os tratamentos conforto e estresse por calor. Os grupos submetidos a estresse por calor tiveram queda do peso durante todo o período experimental. Verifica-se uma queda mais acentuada para a linhagem Dekalb Brown, sendo que o grupo sob estresse por calor ficou com peso cerca de 15% inferior ao peso esperado para a linhagem.

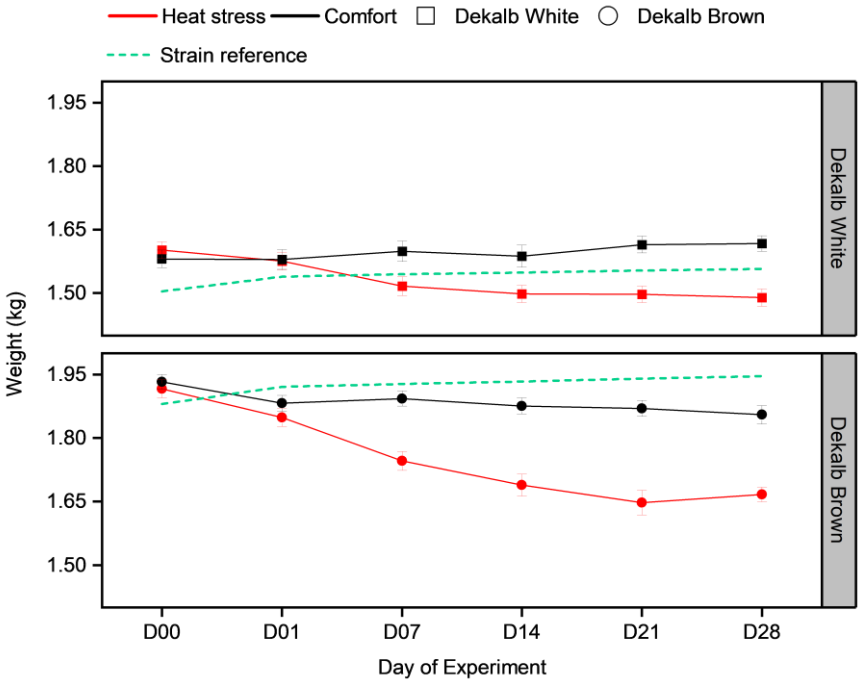


Figura 3.1. Gráfico de ganho de peso semanal das linhagens Dekalb White e Dekalb Brown submetidas aos tratamentos de conforto e estresse por calor.

A Tabela 3.1 mostra o resultado do teste de comparação de médias para as galinhas por data de pesagem, tratamento de temperatura e linhagem. Observa-se que nas pesagens D0 e D1, não havia diferença de peso entre os grupos dos tratamentos de temperatura. A partir da pesagem D7, observamos diferença significativa entre os tratamentos de temperatura para cada linhagem.

Tabela 3.1. Teste de comparação de médias do peso (kg) das galinhas para cada dia de pesagem, tratamento de temperatura e linhagem.

Dia do experimento	Tratamento	Linhagem	
		Dekalb White	Dekalb Brown
D0	Conforto	1,5808 ± 0,1426 b	1,9323 ± 0,1200 a
	Estresse	1,6015 ± 0,1378 b	1,9160 ± 0,1495 a
D1	Conforto	1,5796 ± 0,1606 b	1,8827 ± 0,1248 a
	Estresse	1,5758 ± 0,1476 b	1,8487 ± 0,1480 a
D7	Conforto	1,5987 ± 0,1685 c	1,8938 ± 0,1246 a
	Estresse	1,5167 ± 0,1527 d	1,7471 ± 0,1504 b
D14	Conforto	1,5871 ± 0,1829 c	1,8748 ± 0,1323 a
	Estresse	1,4983 ± 0,1398 d	1,6908 ± 0,1769 b
D21	Conforto	1,6181 ± 0,1357 b	1,8658 ± 0,1324 a
	Estresse	1,4977 ± 0,1335 c	1,6483 ± 0,1919 b
D28	Conforto	1,6198 ± 0,1275 b	1,8521 ± 0,1468 a
	Estresse	1,4900 ± 0,1400 c	1,6717 ± 0,1116 b

* Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para o dia de pesagem, entre os níveis de temperatura e de linhagem.

A Figura 3.2 mostra a quantidade de ração não consumida pelas aves diária e acumulada em cada repetição realizada. Verificamos que as galinhas submetidas a estresse por calor na primeira repetição deixaram de consumir uma quantidade maior de ração, totalizando uma perda de 56,6 kg, ou 29,1% do total de ração fornecida durante o período. Nessa mesma repetição, as aves do conforto deixaram sobra de ração de 15,7 kg, ou equivalente a 8% do total oferecido. Na segunda repetição, a sobra de ração do grupo do estresse por calor foi de 32,5 kg (16,6%) e do grupo do conforto foi 20,1 kg (10,2%). Na primeira repetição, durante a primeira semana de experimento a redução de consumo foi maior.

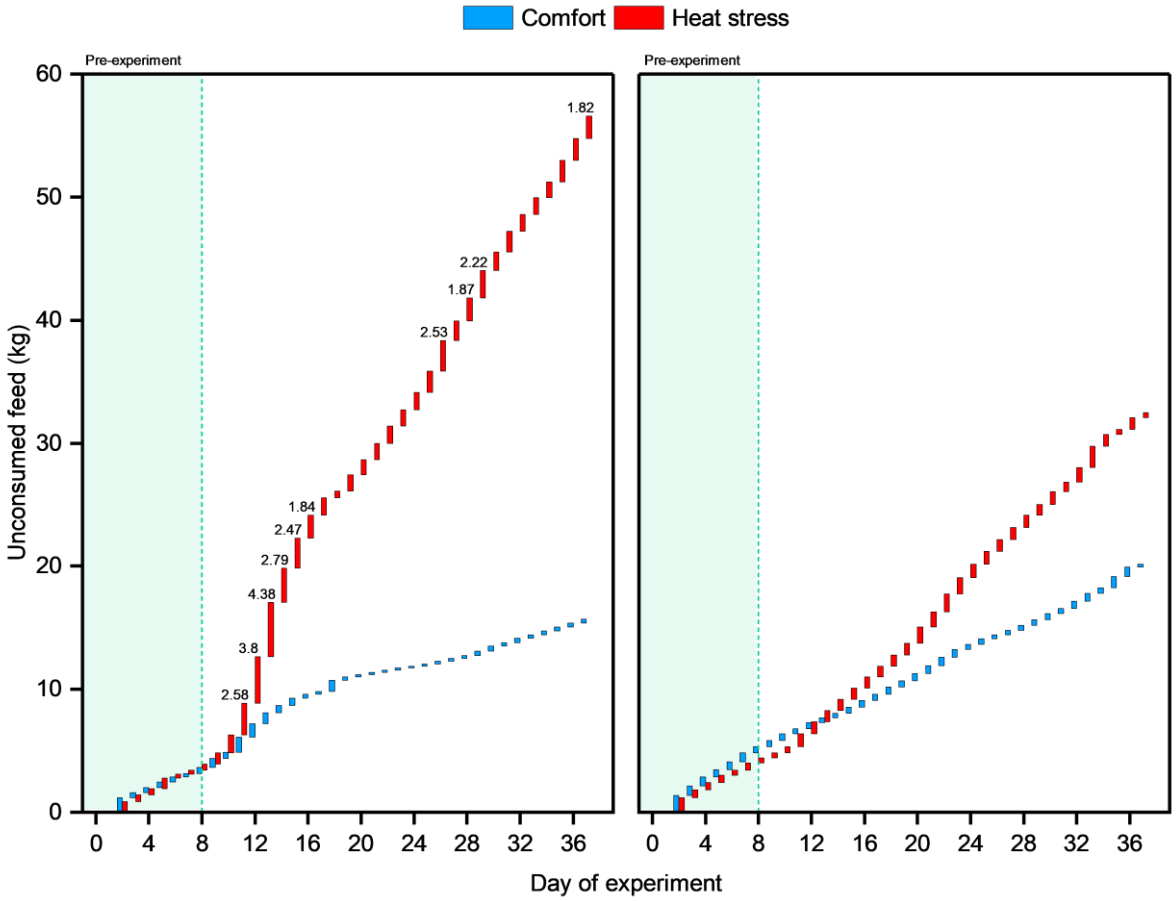


Figura 3.2. Gráfico da ração não consumida diária para os tratamentos de conforto e estresse por calor, para a primeira repetição (esquerda) e segunda repetição (direita).

A Figura 3.3 mostra a variação da temperatura retal das aves de ambas as linhagens submetidas aos tratamentos de conforto e estresse por calor. Nos gráficos, nas medições D7 a D21, a temperatura retal das aves submetidas a estresse por calor ficou maior que das aves submetidas a conforto térmico. Nesse período, as aves demonstraram maior sensibilidade ao estresse por calor, porém, na medição de D28, verificamos que a temperatura retal deste grupo se equiparou com a temperatura do grupo de conforto.

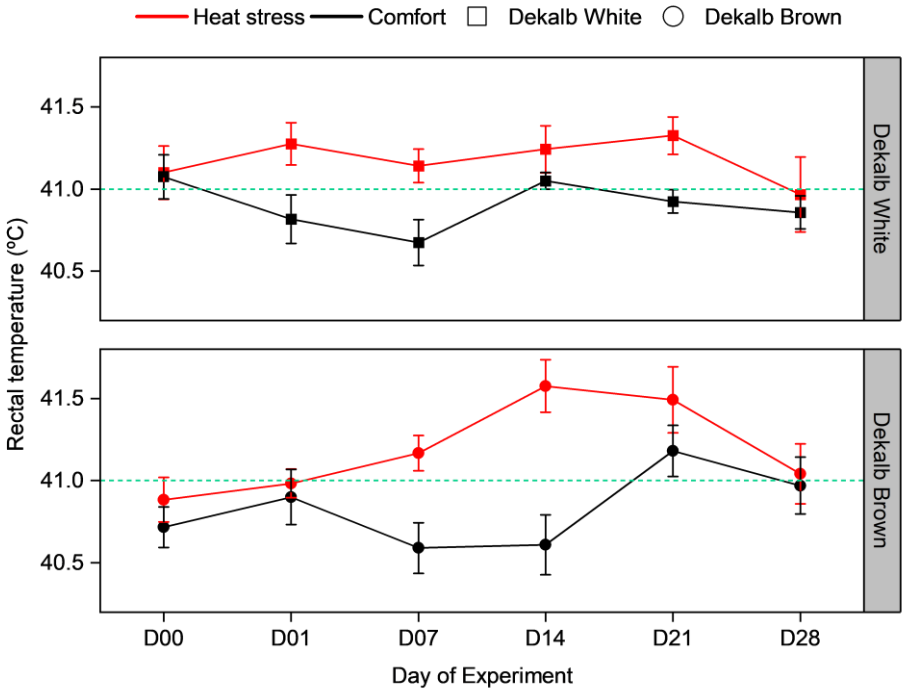


Figura 3.3. Gráficos de variação da temperatura retal das aves Dekalb White e Dekalb Brown submetidas aos tratamentos de conforto e estresse por calor.

A Tabela 3.2 mostra o resultado do teste de comparação de médias da temperatura retal das galinhas por data de pesagem, tratamento de temperatura e linhagem. Observa-se que, a partir de D7, há um aumento significativo da temperatura retal das poedeiras sob estresse por calor, que permanece até D21, quando as temperaturas internas começam a equilibrar.

Tabela 3.2. Teste de comparação de médias da temperatura retal (ºC) das galinhas para cada dia de medição, tratamento de temperatura e linhagem.

Dia do experimento	Tratamento	Linhagem	
		Dekalb White	Dekalb Brown
D0	Conforto	41,075 ± 0,463 a	40,636 ± 0,335 b
	Estresse	41,100 ± 0,564 a	40,883 ± 0,469 ab
D1	Conforto	40,817 ± 0,511 a	40,900 ± 0,531 a
	Estresse	41,275 ± 0,449 a	40,983 ± 0,301 a
D7	Conforto	40,675 ± 0,481 b	40,590 ± 0,489 b
	Estresse	41,142 ± 0,350 a	41,167 ± 0,370 a
D14	Conforto	41,050 ± 0,178 bc	40,610 ± 0,572 c
	Estresse	41,242 ± 0,496 ab	41,575 ± 0,555 a
D21	Conforto	40,925 ± 0,245 b	41,180 ± 0,494 ab
	Estresse	41,325 ± 0,393 ab	41,492 ± 0,695 a
D28	Conforto	40,858 ± 0,350 a	40,970 ± 0,548 a
	Estresse	40,967 ± 0,789 a	41,042 ± 0,629 a

* Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para o dia de medição da temperatura retal, entre os níveis de temperatura e de linhagem.

Observa-se na Tabela 3.2 que a partir de D7 há um aumento significativo da temperatura retal que permanece até D21, quando as temperaturas internas começam a equilibrar. Há indícios por esses dados que as aves conseguiram compensar fisiologicamente o estresse por calor a partir da terceira semana de exposição a este desafio térmico.

3.3.2 Análise de viabilidade de produção dos ovos

A Figura 3.4 mostra os gráficos de viabilidade média observada nas duas repetições para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown. As diferenças na produção de ovos entre os tratamentos de temperatura foram evidentes. Durante o período de pré-experimento, no qual os grupos de controle e estresse estavam sob o mesmo ambiente térmico, resultou em produções equivalentes. Quando se inicia o estresse por calor, durante a primeira semana houve queda acentuada da produção de ambas as linhagens na segunda semana, cujas viabilidades alcançaram patamares abaixo de 70%. Na semana seguinte houve recuperação gradativa da produção. As duas linhagens recuperaram a produção, com a diferença de que Dekalb White recuperou a produção em nível equivalente ao grupo do controle e a Dekalb Brown manteve-se em um patamar de produção inferior.

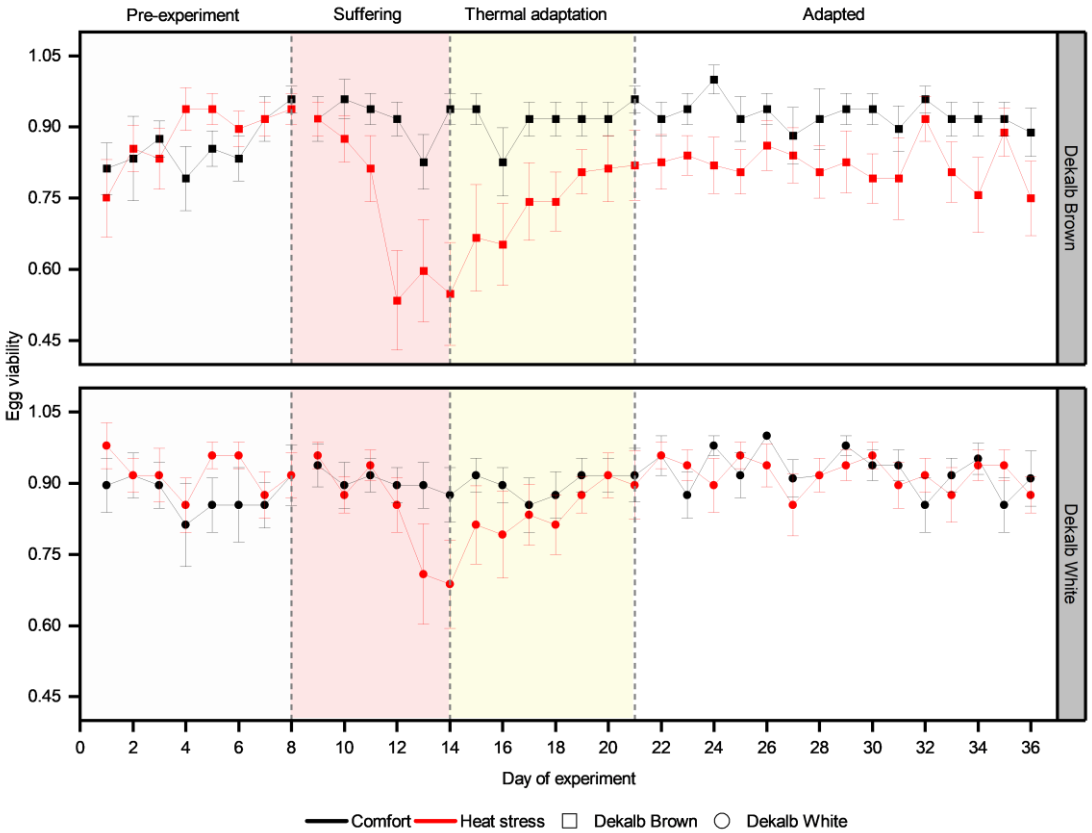


Figura 3.4. Gráfico de viabilidade média entre as duas fases experimentais e gaiolas de cada tratamento de temperatura para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown. Do dia 1 ao 7 – período de adaptação (pré-experimento), seguidos dos dias experimentais.

A Tabela 3.3 resume os resultados do teste *t* pareado de viabilidade de produção para cada linhagem e temperatura, levando em conta as duas repetições. As linhagens Dekalb White e Dekalb Brown sob influência do estresse térmico tiveram uma perda de viabilidade de 3,33% e 14%, respectivamente, quando comparadas às em temperatura termoneutra.

Tabela 3.3. Resultado do teste *t* pareado da viabilidade de produção (%) para cada linhagem e condição de temperatura, considerando as duas fases experimentais.

Variáveis	Dekalb White			Dekalb Brown		
	Conforto	Estresse	Teste *t* pareado	Conforto	Estresse	Teste *t*
Viabilidade produção (%)	**91,44±5,35**	**88,39±10,41**	**0,031**	**91,99±6,55**	**78,05±17,54**	**<0,001**

A Tabela 3.4 mostra a média de ovos trincados para cada linhagem. A quantidade de ovos trincados no conforto e no estresse não foi significativa na linhagem Dekalb Brown, mas foi significativa para a linhagem Dekalb White, indicando que a produção em patamar inferior observado pode ter favorecido na manutenção da qualidade de casca para a linhagem Dekalb Brown.

Tabela 3.4. Resultado do teste χ^2 entre os tratamentos de temperatura para o número de observações de ovos trincados durante os 28 dias de experimento, considerando seis gaiolas para cada linhagem e as duas fases experimentais.

Quantidade ovos trincados observados	Dekalb White			Dekalb Brown		
	Conforto	Estresse	Teste χ^2 (Pearson)	Conforto	Estresse	Teste χ^2 (Pearson)
0	304	275	**0,006**	310	298	0,188
1	31	54		24	37	
2	1	5		2	1	
3+	0	2		0	0	
Total	336	336		336	336	

3.3.3 Análise de qualidade dos ovos

A Tabela 3.5 mostra que, após 28 dias sob estresse, o peso dos ovos diminuiu nas duas linhagens. A linhagem Dekalb White teve uma redução média de 3,84 g (6,5%) e a linhagem Brown de 6,34 g (11,1%). A resistência e a espessura da casca também mostraram resultados relevantes entre os tratamentos e entre as linhagens. Na Dekalb White, foram observadas cascas mais finas e menor resistência de casca após o período de estresse por calor, enquanto na Dekalb Brown não foram observadas diferenças. A altura de albúmen e a unidade Haugh não apresentaram diferença entre os tratamentos em nenhuma das linhagens. A gravidade específica também foi menor na Dekalb White após o estresse.

Tabela 3.5. Resultado do teste t-Student entre os tratamentos de temperatura conforto e estresse para as variáveis de qualidade dos ovos.

Variáveis	Dekalb White			Dekalb Brown		
	Conforto	Estresse	Teste *t*	Conforto	Estresse	Teste *t*
Peso (g)	**61,21±5,25**	**57,27±4,51**	**<0,001**	**62,73±5,65**	**56,39±3,23**	**<0,001**
Resistência da casca (kgf/cm²)	**4,86±0,10**	**4,13±1,40**	**<0,001**	4,23±0,99	4,19±1,02	0,751
Espessura da casca (mm)	**0,432±0,029**	**0,416±0,047**	**0,007**	0,428±0,036	0,428±0,053	0,963
Altura albúmen (mm)	9,11±3,35	9,56±3,36	0,287	9,01±3,21	9,55±3,95	0,243
Unidade Haugh	91,71±18,98	94,47±17,62	0,242	90,72±18,31	93,96±19,84	0,191
Gravidade específica (g/cm³)	**1091,1±5,18**	**1087±6,74**	**<0,001**	1089±4,79	1089,3±5,28	0,726

Valores em negrito apresentaram diferenças entre os tratamentos dentro da linhagem para o teste *t-student* a 5% de significância.

3.4 Discussão

O animal reage a estímulos estressantes por meio de respostas comportamentais e fisiológicas, ativando o metabolismo para manter ou restabelecer a homeostase (Basile et al., 2020). Neste estudo, observamos efeito da temperatura e da linhagem, indicando que as linhagens possuem mecanismos de adaptação distintos durante situações de estresse por calor.

A temperatura retal das aves foi maior durante o estresse por calor em comparação ao conforto, no entanto, a temperatura ainda se manteve dentro da normalidade, entre 41 e 42 °C (Chang et al., 2018). A elevação da temperatura retal é uma resposta fisiológica ao estresse por calor bem documentada na literatura (Chang et al., 2018; Farag & Alagawany, 2018; Kim et al., 2021) e utilizada para avaliar o grau de adaptação das aves às condições de estresse térmico (Chen et al., 2013; Farag & Alagawany, 2018). A flutuação da temperatura retal nas poedeiras em estresse por calor, com valores elevados entre D7 e D21, indicam que houve um desequilíbrio neste período, seguido de aclimatação quando as temperaturas internas voltam aos patamares observados no grupo controle.

O estresse por calor reduziu o consumo de ração das poedeiras, principalmente na primeira semana da primeira repetição. A redução de consumo está relacionada ao mecanismo adaptativo para evitar o aumento da temperatura corporal devido a produção de calor metabólico originado durante a digestão dos alimentos (Franco-Jimenez et al., 2007; Rozenboim et al., 2007; Star et al., 2008; Baxter et al., 2020). Aparentemente, também há um efeito da idade na redução do consumo da ração em condições de estresse por calor. Em uma meta-análise, avaliando poedeiras de diferentes idades em estresse por calor, a interação entre essas variáveis resultou em poedeiras mais velhas (70 semanas) consumindo menos ração do que as mais jovens (30 semanas) (Mignon-Grasteau et al., 2015), oposto ao observado neste

trabalho. A explicação para esta resposta ainda não está bem compreendida, mas a diferença entre os estudos pode ter relação com a linhagem e a idades das aves.

As duas linhagens testadas apresentaram menor peso corporal em condição de estresse por calor, consequência da redução do consumo de ração durante o período. Estes achados corroboram com outros trabalhos que estudaram a redução do peso em situações de estresse (Garriga et al., 2006; Lin et al., 2008; Nawab et al., 2018; Welay et al., 2023). Apesar de ambas as linhagens terem perdido peso, a Dekalb Brown apresentou queda mais acentuada, com peso cerca de 15% inferior ao esperado para a linhagem. Franco-Jimenez et al. (2007), ao comparar as linhagens Hy-line W36, W98 e Brown, observaram queda produtiva mais acentuada na Brown que, somado a outros resultados, indicou que as poedeiras Brown são mais sensíveis a temperaturas elevadas por serem aves mais pesadas, precisando de mais energia para manutenção, e por possuírem uma cobertura de penas mais espessa que limita a dissipação de calor. Estudos destacam que a genética pode culminar em respostas distintas ao estresse (Boddicker et al., 2014; Jaiswal et al., 2017), inclusive indicando que animais mais pesados e de alta produção são mais sensíveis às condições ambientais (Rauw et al., 2020; Nawaz et al., 2023).

A viabilidade total dos ovos das poedeiras sob estresse por calor foi menor, porém a perda maior ocorreu nas duas primeiras semanas, sendo que, durante a primeira semana, observamos queda e, durante a segunda semana a recuperação dessa produção. A partir da terceira semana, a produção se manteve estável até o final do experimento. Observamos também, elevação na temperatura retal nas duas primeiras semanas de experimento. Esses resultados indicam que, durante a primeira semana de estresse por calor, houve uma resposta adaptativa primária voltada à economia de energia metabólica para alocar esses recursos em funções vitais (Franco-Jimenez et al., 2007), seguida do retorno produtivo após o início da aclimatação dessas galinhas. Poedeiras submetidas ao estresse cíclico apresentaram queda no consumo de ração, peso corporal e produção de ovos na segunda semana de experimento, mas estabilizaram seus valores nas quatro semanas seguintes, indicando uma aclimatação dessas poedeiras (Barrett et al., 2019). A exposição de poedeiras Lohmann Brown ao estresse térmico (33° e 66% UR) também reduziu o peso do ovo desde a primeira semana e a produção de ovos a partir da segunda semana, permanecendo até o final do experimento, provavelmente consequência do consumo de ração reduzido. Kim et al. (2024) verificaram aumento da temperatura retal aos 14 dias e aos 28 dias, diferindo dos resultados do nosso estudo. Apesar

dos mecanismos de adaptação entre os estudos serem similaridades, o período no qual cada etapa ocorre e seu modo de ação ainda permanecem incertos.

Apesar de ambas as linhagens reduzirem o peso do ovo em situação de estresse térmico, corroborando com a literatura (Oliveira et al., 2014), a linhagem Dekalb Brown manteve a qualidade de casca, enquanto a Dekalb White apresentou redução dessa qualidade, o que gerou aumento do número de ovos trincados. Nas poedeiras Dekalb Brown observamos maior redução da produção e peso dos ovos, o que favoreceu a manutenção da quantidade de minerais necessários para a boa qualidade de casca. Estudo com poedeiras demonstrou que a Hy-line Brown tinha maior comprimento de perna, melhor qualidade óssea da tíbia e espessura de casca quando comparada a linhagem White (Mekky et al., 2016; Rayan et al. 2020). A partir dos nossos achados, pressupõe-se que as poedeiras Dekalb Brown possuem mecanismo equivalente a outras linhagens vermelhas, explicando a adequada manutenção da casca durante o estresse pelo maior aporte mineral ósseo.

3.5 Conclusão

Observamos que os mecanismos de resposta adaptativa são acionados na primeira semana de exposição estresse por calor, refletindo em aumento da temperatura corporal e redução da viabilidade de ovos. A partir da segunda semana, observamos os efeitos de uma adaptação ao ambiente estressor, com recuperação da produção e da temperatura retal. Concluímos que ambas as linhagens estudadas tiveram tempo de adaptação semelhantes, porém, em nossos achados, ficou evidente que estratégias biológicas diferentes foram adotadas, uma vez que a linhagem Dekalb Brown conseguiu manter a qualidade de casca dos ovos em detrimento da produção, e a linhagem Dekalb White manteve produção em detrimento a qualidade de casca dos ovos.

3.6 Referências

Adu-Asiamah, P., Zhang, Y., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Yang, H., Zhang, L. (2021). Evaluation of physiological and molecular responses to acute heat stress in two chicken breeds. Animal, 15(2), 100106. https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100106

Afsal, A., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., & Bhatta, R. (2018). Heat Stress and Livestock Adaptation: Neuro-endocrine Regulation. International Journal of Veterinary and Animal Medicine, 1(2). https://doi.org/10.31021/ijvam.20181108

Barrett, N. W., Rowland, K., Schmidt, C. J., Lamont, S. J., Rothschild, M. F., Ashwell, C. M., & Persia, M. E. (2019). Effects of acute and chronic heat stress on the performance, egg quality,

body temperature, and blood gas parameters of laying hens. Poultry Science, 98(12), 6684–6692. https://doi.org/10.3382/ps/pez541

Basile, F., Capaccia, C., Zampini, D., Biagetti, T., Diverio, S., & Guelfi, G. (2020). Omics insights into animal resilience and stress factors. Animals, 11(1), 47. https://doi.org/10.3390/ani11010047

Baxter, M. F. A., Greene, E. S., Kidd, M. T., Tellez-Isaias, G., Orlowski, S., & Dridi, S. (2020). Water amino acid-chelated trace mineral supplementation decreases circulating and intestinal HSP70 and proinflammatory cytokine gene expression in heat-stressed broiler chickens. Journal of Animal Science, 9(3), 1–13. https://doi.org/10.1093/jas/skaa049

Boddicker, R. L., Seibert, J. T., Johnson, J. S., Pearce, S. C., Selsby, J. T., Gabler, N. K., & Ross, J. W. (2014). Gestational Heat Stress Alters Postnatal Offspring Body Composition Indices and Metabolic Parameters in Pigs. PLOS ONE, 9(11), e110859. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110859

Chang, Y., Wang, X. J., Feng, J. H., Zhang, M. H., Diao, H. J., Zhang, S. S., & Li, X. (2018). Real-time variations in body temperature of laying hens with increasing ambient temperature at different relative humidity levels. Poultry Science, 97(9), 3119–3125. https://doi.org/10.3382/ps/pey184

Chen, X. Y., Wei, P. P., Xu, S. Y., Geng, Z. Y., & Jiang, R. S. (2013). Rectal temperature as an indicator for heat tolerance in chickens. Animal Science Journal, 84(11), 737–739. https://doi.org/10.1111/asj.12064

Farag, M. R., & Alagawany, M. (2018). Physiological Alterations of Poultry to the High Environmental Temperature. Journal of Thermal Biology, 76, 101–106. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.012

Franco-Jimenez, D. J., Scheideler, S. E., Kittok, R. J., Brown-Brandl, T. M., Robeson, L. R., Taira, H., & Beck, M. M. (2007). Differential effects of heat stress in three strains of laying hens. Journal of Applied Poultry Research, 16(4), 628-634. https://doi.org/10.3382/japr.2005-00088

Garriga, C., Hunter, R. R., Amat, C., Planas, J. M., Mitchell, M. A., & Moreto, M. (2006). Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. American Journal Physiological Regulation and Integrative Comparative Physiology, 290(1), R195–R201. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00393.2005

Huston, T. M., Joiner, W. P., & Carmon, J. L. (1957). Breed differences in egg production of domestic fowl held at high environmental temperatures. Poultry Science, 36, 1247–1254. https://doi.org/10.3382/ps.0361247

Jaiswal, S. K., Raza, M. A. K., & Chaturvedani, A. K. (2017). Effect of Thermal Stress on Serum Biochemical and Haematological Parameters in Broiler Chicken. The Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology, 12(3), 19–22. https://doi.org/10.21887/ijvsbt.v12i3.7082

Jiménez, D. J. F., & Beck, M. M. Physiological Changes to Transient Exposure to Heat Stress Observed in Laying Hens. Poultry Science. https://doi.org/10.1093/ps/86.3.538

Kim, D. H., Lee, Y. K., Lee, S. D., Kim, S. H., & Lee, K. W. (2021). Physiological and behavioral responses of laying hens exposed to long-term high temperature. Journal of Thermal Biology. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103017

Kim, D.-H., Lee, Y.-K., Lee, S.-D., Kim, S.-H., Lee, S.-R., Lee, H.-G., & Lee, K.-W. (2020). Changes in Production Parameters, Egg Qualities, Fecal Volatile Fatty Acids, Nutrient Digestibility, and Plasma Parameters in Laying Hens Exposed to Ambient Temperature. Frontiers in Veterinary Science, 7. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00412

Kim, H.-R., Ryu, C., Lee, S.-D., Cho, J.-H., & Kang, H. (2024). Effects of Heat Stress on the Laying Performance, Egg Quality, and Physiological Response of Laying Hens. Animals, 14(7), Artigo 7. https://doi.org/10.3390/ani14071076

Lamarca, D. S. F., Pereira, D. F., Magalhães, M. M., & Salgado, D. D. (2018). Climate Change in Layer Poultry Farming: Impact of Heat Waves in Region of Bastos, Brazil. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 20(4), 657–664. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0750

Lara, L., & Rostagno, M. (2013). Impact of Heat Stress on Poultry Production. Animals, 3(2), 356–369. https://doi.org/10.3390/ani3020356

Lee, K. W., Michiels, J., & Choi, Y. H. (2021). Impact of climate change on poultry metabolism. Frontiers in Veterinary Science, 8. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.654678

Li, T., Song, Y., Bao, X., & Zhang, J. (2020). The mediation of mir-34a/mir-449c for immune cytokines in acute cold/heat-stressed broiler chicken. Animals, 10(11), 2168. https://doi.org/10.3390/ani10112168

Lin, H., De Vos, D., Decuypere, E., & Buyse, J. (2008). Dynamic changes in parameters of redox balance after mild heat stress in aged laying hens (Gallus gallus domesticus). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 147(1), 30–35. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.005

Mahmoud, K. Z., Beck, M. M., Scheideler, S. E., Forman, M. F., Anderson, K. P., & Kachman, S. D. (1996). Alta temperatura ambiental aguda e relações cálcio-estrogênio na galinha 1. Poultry Science, 75(12), 1555–1562. https://doi.org/10.3382/ps.0751555

Mazzuco, H., & Bertechini, A. G. (2014). Critical points on egg production: causes, importance and incidence of eggshell breakage and defects. Ciência e Agrotecnologia, 38(1), 07–14. https://doi.org/10.1590/s1413-70542014000100001

Mekky, S. S., Galal, A., Zaky, H. I., & Zein El-Dein, A. L. (2016). Laying Performance and Egg Quality Traits in White and Brown Commercial Hens. Journal of Animal and Poultry Production, 7(5), 185–189. https://doi.org/10.21608/jappmu.2016.48699

Melesse, A., Maak, S., Schmidt, R., & von Lengerken, G. (2011). Effect of long-term heat stress on some performance traits and plasma enzyme activities in Naked-neck chickens and their F1 crosses with commercial layer breeds. Livestock Science, 141(2–3), 227–231. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.06.007

Mignon-Grasteau, S., Moreri, U., Narcy, A., Rousseau, X., Rodenburg, T. B., Tixier-Boichard, M., & Zerjal, T. (2015). Robustness to chronic heat stress in laying hens: a meta-analysis. Poultry Science, 94(4), 586–600. https://doi.org/10.3382/ps/pev028

Nawab, A., Ibtisham, F., Li, G., Kieser, B., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Nawab, Y., Li, K., Xiao, M., & An, L. (2018). Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. Journal of Thermal Biology, 78, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010

Nawaz, A. H., Lin, S., Wang, F., Zheng, J., Sun, J., Zhang, W., & Zhang, L. (2023). Investigating the heat tolerance and production performance in local chicken breed having normal and dwarf size. Animal, 17(3). https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100707

Odom, T. W., Harrison, P. C., & Bottje, W. G. (1986). Effects of thermal induced respiratory alkalosis on blood ionized calcium levels in the domestic hen. Poultry Science, 65(3), 570–573. https://doi.org/10.3382/ps.0650570

Oliveira, D. L. de, Nascimento, J. W. B. do, Camerini, N. L., Silva, R. C., Furtado, D. A., & Araujo, T. G. P. (2014). Desempenho e qualidade de ovos de galinhas poedeiras criadas em gaiolas enriquecidas e ambiente controlado. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 18, 1186–1191. https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n11p1186-1191

Oluwagbenga, E. M., & Fraley, G. S. (2023). Heat stress and poultry production: A comprehensive review. Poultry Science, 102(12), 103141. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103141

Rauw, W.M., Rydhmer, L., Kyriazakis, I., Øverland, M., Gilbert, H., Dekkers, J.C.M., Hermesch, S., Bouquet, A., Gomez ´ Izquierdo, E., Louveau, I., & Gomez-Raya, L. (2020). Prospects for sustainability of pig production in relation to climate change and novel feed resources. Journal of the Science of Food and Agriculture,100(9), 3575–3586. 10.1002/jsfa.10338

Rayan, G. N., El-Attar, A. H., & Fathi, M. M. (2020). Eggshell and Bone Quality in Two Different Genetic Groups of Aged Layer Breeders. Brazilian Journal of Poultry Science, 22, eRBCA. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1250

Riquena, R., Pereira, D., Vale, M., & Salgado, D. (2019). Mortality prediction of laying hens due to heat waves. Revista Ciência Agronômica, 50(1), Artigo 1. http://periodicos.ufc.br/revistacienciaagronomica/article/view/84811

Rozenboim, I., Tako, E., Gal-Garber, O., Proudman, J. A., & Uni, Z. (2007). The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. Poultry Science, 86(8), 1760–1765. https://doi.org/10.1093/ps/86.8.1760

Star, L., Decuypere, E., Parmentier, H. K., & Kemp, B. (2008). Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 2. Endocrine and oxidative stress responses. Poultry Science, 87(5), 1031–1038. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00350

Surai, P. F. (2020). Vitagenes in avian biology and poultry health. Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-906-0

Usayran, N., Farran, M. T., Awadallah, H. H., Al-Hawi, I. R., Asmar, R. J., & Ashkarian, V. M. (2001). Effects of added dietary fat and phosphorus on the performance and egg quality of laying hens subjected to a constant high environmental temperature. Poultry Science, 80(12), 1695-1701. https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1695

Wasti, S., Sah, N., & Mishra, B. (2020). Impact of Heat Stress on Poultry Health and Performances, and Potential Mitigation Strategies. Animals, 10(8), 1266.https://doi.org/10.3390/ani10081266

Welay, K., Amaha, N., Demeke, S., Debusho, L. K., & Girma, M. (2023). Growth performance and carcass characteristics of Koekoek chickens exposed to temperature variation with supplementary Coriander seed powder. Journal of Thermal Biology, 116, 103674. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2023.103674

Wolf, B. O., & Walsberg, G. E. (2000). The Role of the Plumage in Heat Transfer Processes of Birds1. American Zoologist, 40(4), 575–584. https://doi.org/10.1668/0003-1569(2000)040[0575:trotpi]2.0.co;2

CAPÍTULO 4

EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR NA METILAÇÃO GLOBAL DO DNA E NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE DUAS LINHAGENS DE GALINHAS POEDEIRAS

RESUMO

A metilação do DNA é uma alteração epigenética que tem contribuído para o conhecimento de mecanismos associados a processos fisiológicos e biológicos ligados à fatores ambientais. Em condições estressantes, genes podem ser silenciados ou deixarem de ser expressos, a partir do mecanismo de metilação. O objetivo deste estudo foi determinar o conteúdo da metilação global do DNA e, alterações nos parâmetros hematológicos e eletrolíticos de duas linhagens de galinhas poedeiras submetidas em câmaras climáticas a tratamento por calor e conforto térmico. Foram avaliados: glicose sanguínea, hemograma, pH, cálcio iônico, sódio, potássio, cloro e o conteúdo da metilação global do DNA. O estresse elevou o cloro, mas não afetou os demais parâmetros sanguíneos avaliados. Aos 28 dias de experimento, a linhagem Dekalb Brown apresentou níveis maiores de leucócitos e hematócrito e menor concentração de cloro e sódio quando comparada à linhagem Dekalb White. Os níveis de leucócitos, proteína plasmática, sódio e cálcio iônico permaneceram acima dos valores de referência para as duas linhagens. Não houve diferença no conteúdo da metilação entre os tratamentos de temperatura, mas apresentou diferença significativa entre as linhagens aos 28 dias de experimento. O conteúdo da metilação global foi independente dos parâmetros sanguíneos avaliados neste estudo, mas dependente da linhagem da ave, podendo indicar que as linhagens respondem com mecanismos biológicos diferentes para a adaptação ao calor. A ausência de correlação não exclui completamente uma relação causal, e mais estudos são necessários para investigar possíveis associações fisiológicas e biológicas do sangue e como as linhagens respondem a diferentes mecanismos adaptativos ao calor.

Palavras-chave: Ambiência. Avicultura. Epigenética. Glicose Sérica. Hemograma. pH sanguíneo. Eletrólitos. Proteína Plasmática.

4.1 Introdução

Aves sob condições estressoras desenvolvem mecanismos compensatórios de sobrevivência, como alterações morfológicas, anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Afsal et al., 2018; Nawaz et al., 2021). O tecido sanguíneo percorre todo o organismo animal, transportando nutrientes e metabólitos constantemente, o que possibilita identificar as alterações fisiológicas por meio da análise de seus componentes, associando-os ao estímulo estressor e às demais alterações observadas (Mehaisen et al., 2019; Sobotik et al., 2020).

Situações de estresse resultam em aumento na glicemia e na produção de eritrócitos e hemoglobina para suprir a demanda energética e de oxigênio do organismo (Habibu et al., 2017; Hassan et al., 2023). A desidratação do organismo também aumenta as proteínas totais (Schmidt et al., 2007) e altera o equilíbrio ácido-básico do organismo, regulado principalmente pelo potássio, cloro e sódio, que sofrem maior ou menor excreção (Harr, 2002). Os níveis de cálcio ionizado e dos demais eletrólitos também podem ser afetados pela alcalose respiratória, causada pela elevação do pH sanguíneo durante o resfriamento evaporativo (Mushtaq & Pasha, 2013). Além disso, o estado do sistema imune pode ser indicado pela avaliação dos leucócitos, que tendem a aumentar em situações de estresse (Nawab et al., 2018; Wasti et al., 2020).

O sangue também pode elucidar alterações adaptativas que ocorrem na expressão gênica, conhecido como mecanismo epigenético (Hong et al., 2018). A metilação do DNA é uma alteração epigenética que envolve a adição de um grupo metil ao nucleotídeo citosina localizado em ilhas CpG, que são sequências de DNA com alta densidade de bases citosina e guanina (Moore et al., 2013; Reis, 2015). Essas alterações estão diretamente relacionadas às condições vividas pelo animal, podendo ser desencadeadas no genoma de um indivíduo a qualquer momento de sua vida, em resposta à fatores externos ou internos (Jirtle & Skinner, 2007; Paiva et al., 2019).

A metilação predispõe a mudanças no fenótipo, podendo estar ligada a genes de resiliência (Bush et al., 2017), possibilitando caracterizar animais sob estresse térmico e identificar sua capacidade adaptativa (Yahav, 2009; Vinoth et al., 2018). Além disso, alterações no conteúdo da metilação global podem estar associadas às células e metabólitos do sangue, onde estudos apontaram a ligação da metilação do DNA com as células sanguíneas sem associação com a expressão gênica (Willmer et al., 2018; Epiphanio et al., 2019; Zaghlool et al., 2020). Pesquisas em aves revelaram variações no conteúdo de metilação global relacionados à idade, aos tecidos e às linhagens (Xu et al., 2007; Nätt et al., 2012; Gryzinska et al., 2013), e

que muitas dessas variações são transmitidas de forma hereditária e decorrem de mudanças selecionadas ao longo da evolução das galinhas durante o processo de domesticação (Nätt et al., 2012).

As galinhas fornecem um modelo único para estudar os efeitos do estresse no epigenoma no sangue pois, devido as hemácias serem nucleadas, tornam-se interessantes para estudar alterações celulares. Além disso, as poedeiras constituem um excelente modelo para estudar os perfis epigenéticos de estresse a longo prazo (Pértille et al., 2017). No entanto, ainda há pouca informação sobre a metilação do DNA em galinhas poedeiras utilizando o sangue como amostra biológica (Guerrero-Bosagna et al., 2018; Xu et al., 2018).

Este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos do estresse por calor sobre os parâmetros sanguíneos e o conteúdo da metilação global do DNA em duas linhagens de poedeiras comerciais, e como essas respostas podem variar entre diferentes linhagens. Além disso, pretendemos explorar a relação entre as alterações fenotípicas observadas e a plasticidade adaptativa, destacando a capacidade de um organismo apresentar diferentes características em função das condições ambientais.

4.2 Metodologia

O experimento foi conduzido de acordo com as diretrizes éticas para experimentação em animais do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Ciências e Engenharia, Campus de Tupã, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp/FCE. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA sob o registro número 02/2022.

4.2.1 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi em blocos casualizados no esquema fatorial com parcelas subdivididas. O experimento foi realizado em duas câmaras climáticas com aves de postura, sendo 96 da linhagem Dekalb White e 96 Dekalb Brown, totalizando 192 aves. Os animais foram divididos em dois grupos e os tratamentos foram repetidos. Todas as aves eram do mesmo lote de produção, cedidas por uma granja comercial.

Na primeira repetição, as aves iniciaram o experimento com 34 semanas de idade e, na segunda repetição com 45 semanas. Foram alojadas em grupos de 4 aves/gaiola dentro das câmaras climáticas, totalizando 6 gaiolas para cada tratamento de temperatura e repetição.

As aves de cada repetição foram submetidas a um período de adaptação de sete dias com uma temperatura constante de 26ºC e 60% de umidade relativa.

Após a adaptação, cada câmara climática foi programada para um tratamento de temperatura, que foi aplicado nas aves por 28 dias consecutivos. O tratamento de estresse por calor foi caracterizado por uma temperatura de 35ºC durante o dia (9:00 às 20:00), reduzindo a temperatura para 26ºC durante a noite (20:00 às 9:00). No tratamento de controle, a temperatura durante o dia foi de 26ºC e a noite de 24ºC. A umidade relativa foi mantida constante em 60%. Na segunda repetição, houve inversão dos tratamentos nas câmaras climáticas para controlar o efeito das salas nos resultados.

O fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro foi adotado, obtido por iluminação artificial. As aves tiveram acesso *ad libitum* à água e a 110 g/ave de ração dividida duas vezes ao dia, às 8:00 e às 16:00 horas, com uma dieta contendo 2.846 kcal/kg de energia metabolizável, 14,93% de proteína bruta, 4,48% de cálcio e 0,29% de fósforo disponível.

4.2.2 Coleta das amostras de sangue e variáveis analisadas

As aves selecionadas para o experimento, considerando as duas repetições, tiveram amostras de sangue coletada ainda na granja, antes do transporte e alojamento para as câmaras climáticas.

Nesse dia comum para as 192 aves, denominado de dia zero (D0), a idade das aves era de 33 semanas. O objetivo dessa coleta foi garantir uma amostra de sangue de todas as aves com o mesmo histórico de vida até aquele momento.

Após a primeira semana de adaptação, coletamos amostras de sangue de todas as aves no início do tratamento térmico (D1). Iniciado o experimento, coletamos sangue de uma mesma ave de cada gaiola semanalmente (D7, D14, D21). Na última semana (D28), coletamos sangue novamente de todas as aves. Esse procedimento foi repetido duas vezes, sendo que em D1 da primeira repetição a idade das aves era de 34 semanas e na segunda repetição era de 45 semanas.

Foi coletado 3 mL de sangue venoso, acondicionado em microtubo de 0,5 mL contendo EDTA K3 como substância anticoagulante e 2,5 mL disposto em tubo com acelerador de coagulação. Em seguida, a concentração de glicose foi determinada pelo glicosímetro (Accu-Check®, Guide Roche®), utilizando 0,6 µL de sangue total fresco por método eletroquímico, e as amostras dispostas em EDTA foram homogeneizadas para determinação de hematócrito, hemoglobina, contagem de hemácias, contagem de leucócitos e determinação de proteínas plasmáticas totais.

O hematócrito foi determinado pela técnica do microhematócrito, adicionando sangue em tubos capilares e centrifugando-os à 12.500 rpm por 5 minutos em Centrífuga Fanem de Microhematócritos Mod.100.

Determinamos a hemoglobina pelo método cianeto de hemoglobina utilizando o kit Hemoglobina (Labtest® Ref. 43 e Padrão de hemoglobina Ref.47), sendo necessário centrifugar as amostras em tubos cônicos após a hemólise, por 5 min a 3.500 rpm, para remover os núcleos celulares, seguida da leitura em espectrofotômetro (BioPlus®) à 540 nm.

A proteína plasmática total foi realizada por refratometria manual, utilizando-se refratômetro de proteínas e urina veterinário (Ion RHC-200®) com intervalo de medição entre 0-12 g/dL e precisão de 0,2 g/dL.

A contagem de hemácias e leucócitos foi realizada pelo método de Natt-Herrik (1952) atualizado por Almosny et al. (1988), em câmara de Neubauer após diluição na razão de 10 µL de sangue para 2000 µL de solução de Nat-Herrick. A correção dos valores observados na câmara de Neubauer para as hemácias e os leucócitos foi realizada multiplicando o número de células observadas pelo fator de correção (Fc) descrito a seguir (Garcia-Navarro & Pachaly, 1994).

$$Fc = \frac{1}{D \times A \times H}$$

Neste contexto, Fc é o fator de correção, D é a diluição calculada a partir do volume de amostra dividido pelo volume total de solução, A é a área de contagem na câmara de Neubauer, que nesse trabalho para a contagem de hemácias foi 0,2, equivalente a 5 quadros de 25 disponíveis, e para a contagem para Leucócitos foi de 4 quadrantes completos, e H é a altura da câmara é fixa 0,1 mm³.

Para o total de hemácias, o número de células visualizado na câmara de Neubauer foi multiplicado por 10.050 (fator das hemácias) e o resultado dividido por 1.000.000, expresso em $\times 10^6/mm^3$. Para a leucometria global considerou-se o total de leucócitos multiplicado por 502,5 (fator de leucócitos), expresso em $\times 10^3/mm^3$.

As amostras de soro foram submetidas à determinação do pH e de eletrólitos pelo método de eletrodo seletivo (IonPro®), com faixa de sensibilidade e linearidade para Na^+: 40-205 mmol/L, K^+: 1,5-15 mmol/L, Ca^+: 0,2-5,0 mmol/L. A Tabela 4.1 resume as funções e os limites esperados para os parâmetros sanguíneos testados neste trabalho.

Tabela 4.1. Valores e funções de parâmetros hematológicos e bioquímicos de galinhas descritos na literatura

Parâmetros testados	Funções	Limites descritos na literatura*	Referências
Hemoglogina (g/dL)	Transporte de CO_2 e O_2 no sangue e controle do pH (Cardoso & Tessari, 2003). Porcentagem de eritrócitos no sangue (Mitchell & Johns, 2008)	7,65 a 10,75	Sturkie & Newman (1951) Islam et al. (2004) Lisbôa et al. (2008) Mitchell & Johns (2008) Grunitzky et al. (2020) Ding et al. (2021) Hassan et al. (2023) Youssef et al. (2023)
Hemácias ($\times 10^6$/mm^3)		2,08 a 3,36	
Hematócrito (%)		26,90 a 42,00	
Leucócitos ($\times 10^3$/mm^3)	Reflete a resposta imunológica geral (Cardoso & Tessari, 2003)	13.285 a 26.165	
Glicose (mg/dL)	Fonte de energia ao organismo (Faria et al., 2021)	168,5 a 359,4	
Proteínas totais (g/dL)	Manutenção da pressão osmótica, mecanismo ácido-base, transporte de substâncias (Melillo, 2013)	4,45 a 6,35	
K^+ (mmol/L)	Manutenção da pressão osmótica e eletroneutralidade (Harr, 2002)	3,52 a 5,76	Pech-Waffenschmidt et al. (1995) Harr (2002) Board et al. (2018) Wang et al. (2018) Ding et al. (2021)
Na^+ (mmol/L)		137,40 a 155,76	
Cl^- (mmol/L)		123,30	
iCa^{2+} (mmol/L)	Formação óssea e da casca do ovo, e manutenção da atividade elétrica (Faria et al., 2021)	0,97 a 1,44	
pH	Regula o sistema enzimático e as funções celulares (Hopkins et al., 2018)	7,20 a 7,57	Calder & Schmidt-Nielsen (1968)

* Limites calculados a partir da média dos valores de referência da literatura indicada.

4.2.3 Isolamento, extração e análise de metilação global de DNA

O DNA genômico total foi extraído do sangue das poedeiras utilizando o kit Monarch (Biolab®, New England). A quantificação do DNA e avaliação da qualidade da amostra foram realizadas em espectrofotômetro NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific). A análise do conteúdo da metilação global foi realizada em duplicata utilizando o kit Global DNA Methylation ELISA (Cell Biolabs®). Tiras com poços pré-tratados contendo reagente de ligação ao DNA metilado, anticorpos de captura sensíveis à metilação do DNA e anticorpos de detecção foram utilizados, permitindo a detecção colorimétrica da quantidade absoluta de metilação do DNA em cada amostra. A absorbância da solução contida nos poços foi medida em espectrofotômetro ELISA (Kasuaki-DR-200Bs-BI) em comprimento de onda de 450 nm. O fluxograma contendo os processos realizados está descrito abaixo (Figura 4.1).

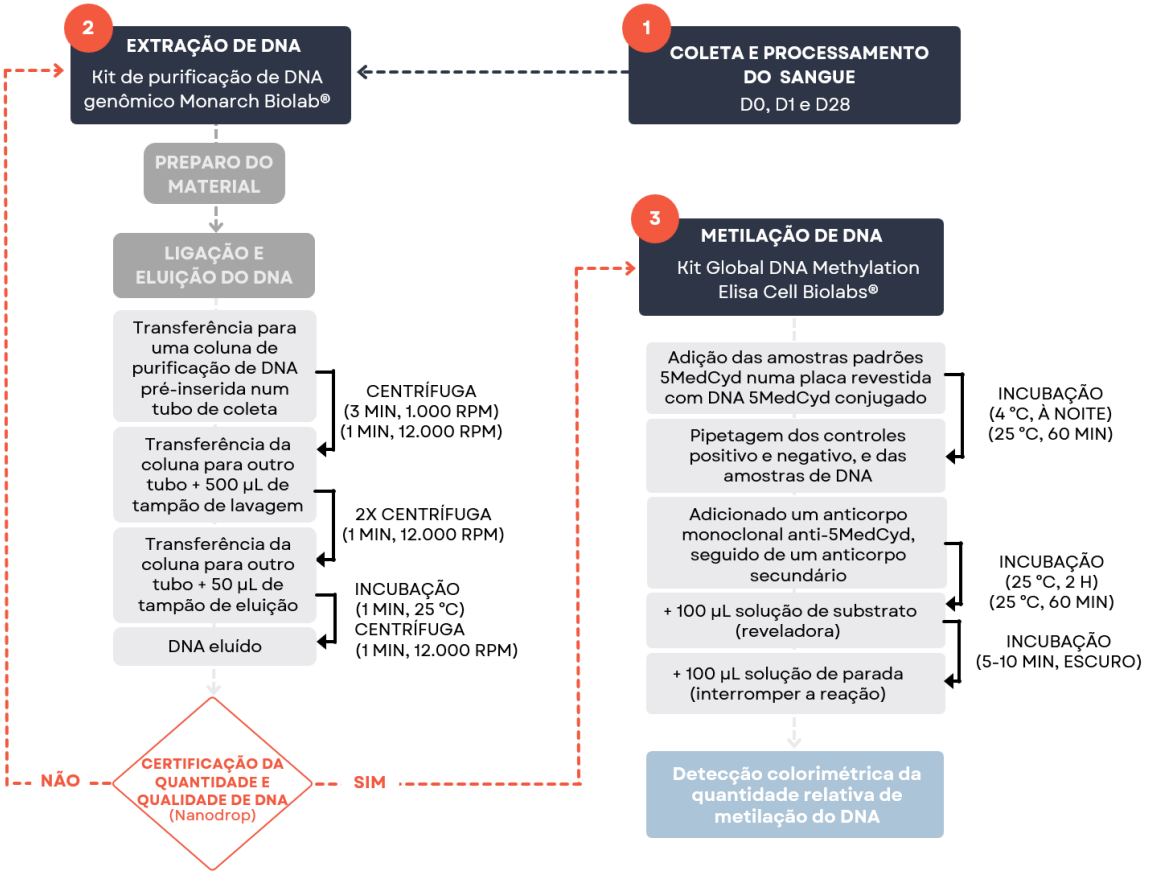


Figura 4.1. Fluxograma da extração do DNA e análise de metilação global do DNA.

4.2.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, no esquema fatorial 2×2 com parcelas subdivididas. *Treatment* é o fator de parcela completa e *Chicken breed* o fator de sub parcela e a repetição do bloco. Analisamos os *boxplot* de cada parâmetro e eliminamos os valores de *outliers*. A partir desse *dataset*, realizamos ANOVA para cada dia de coleta (D0, D1 e D28), buscando verificar se houve diferenças entre os tratamentos e depois entre D0 e D1 para verificar se não houve interferência do tempo de granja entre as duas repetições realizadas.

4.3 Resultados

Não encontramos correlação entre os parâmetros do sangue avaliados e o conteúdo da metilação global do sangue. Não verificamos diferenças estatísticas entre os tratamentos de temperatura para as coletas D0 e D1. Também não observamos diferenças do mesmo grupo de aves entre D0 e D1, dentro de cada repetição realizada. Os resultados da ANOVA apresentados nesse trabalho são para os fatores temperatura e linhagem da coleta D28, e para a variação percentual entre D28 e D1, considerando o *dataset* completo das duas repetições.

4.3.1 Análise do hemograma

A Figura 4.2 mostra a variação média semanal dos parâmetros do hemograma durante o experimento. Os valores de glicose e hematócrito encontrados neste trabalho permaneceram dentro do intervalo preconizado pela literatura durante todo o período experimental. Valores elevados de proteína total e leucócitos foram observados para ambas as linhagens. A concentração de hemoglobina se elevou, inclusive acima do limite estabelecido na literatura, até a segunda semana do experimento (D14), regredindo a partir da terceira semana e retornando ao range na última coleta (D28). Curva parecida foi observada para as hemácias, porém, ficando abaixo dos limites da literatura no início e no final do experimento.

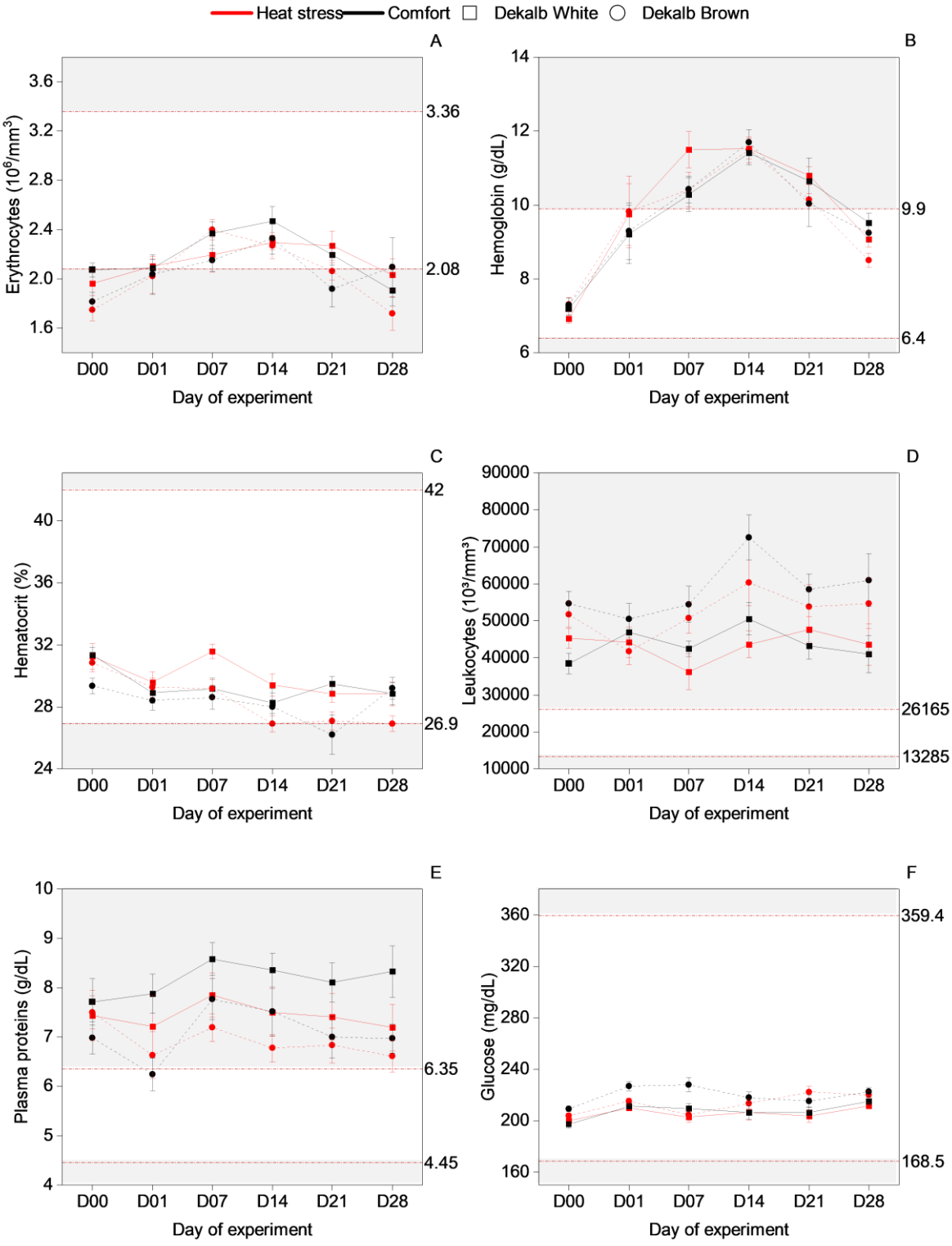


Figura 4.2. Gráficos de intervalo de confiança para as variáveis A) hemácias, B) hemoglobina, C) hematócritos, D) leucócitos, E) proteínas totais e F) glicose, para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown.

A Tabela 4.2 mostra o resultado da ANOVA para os fatores tratamento de temperatura e linhagem para as variáveis do hemograma, ao final do experimento (D28). O

hematócrito e a contagem de leucócitos, estiveram mais altos na linhagem Dekalb Brown, enquanto as demais variáveis (glicose, proteína total, hemoglobina e hemácias) não foram afetadas pelo estresse térmico ou pela linhagem. A ANOVA não mostrou diferenças importantes para os tratamentos de temperatura e para as interações entre os fatores temperatura e linhagem ($p > 0,05$).

Tabela 4.2. Resultado da ANOVA para as variáveis do hemograma entre os níveis de cada fator experimental para os dados observados em D28.

Variável	**Fator**	**CV**	**Nível do fator**	**Média**	**Desvio padrão**	**Teste F**
Hemácias (10^6/mm³)	Tratamento	34,8%	Conforto	1,826	± 0,789	p = 0,62
			Estresse	1,878	± 0,470	
	Linhagem	35,9%	Dekalb Brown	1,732	± 0,796	p = 0,09
			Dekalb White	1,970	± 0,429	
Hemoglobina (g/dL)	Tratamento	2,4%	Conforto	8,604	± 2,722	p = 0,09
			Estresse	8,788	± 0,728	
	Linhagem	41,4%	Dekalb Brown	8,100	± 2,558	p = 0,11
			Dekalb White	9,292	± 0,837	
Hematocritos (%)	Tratamento	14,3%	Conforto	26,58	± 8,340	p = 0,22
			Estresse	27,88	± 2,377	
	Linhagem	21,8%	Dekalb Brown	28,83	± 2,503	p = 0,04 *
			Dekalb White	25,63	± 8,037	
Leucócitos (10^3/mm³)	Tratamento	25,9%	Conforto	50112	± 21621	p = 0,66
			Estresse	49182	± 21394	
	Linhagem	23,1%	Dekalb Brown	57581	± 22416	p < 0,01 **
			Dekalb White	42335	± 17723	
Proteína plasmática (g/dL)	Tratamento	18,2%	Conforto	7,067	± 2,609	p = 0,47
			Estresse	6,900	± 1,364	
	Linhagem	48,9%	Dekalb Brown	6,208	± 2,105	p = 0,06
			Dekalb White	7,758	± 1,743	
Glicose (mg/dL)	Tratamento	52,3%	Conforto	209,66	± 60,111	p = 0,78
			Estresse	214,42	± 15,254	
	Linhagem	15,7%	Dekalb Brown	208,08	± 59,477	p = 0,18
			Dekalb White	216,00	± 16,980	

* Diferença a 5% de significância no teste F (ANOVA design split-plot) entre os níveis do fator experimental.
** Diferença a 1% de significância no teste F (ANOVA design split-plot) entre os níveis do fator experimental.

A Figura 4.3 mostra a variação percentual média dos parâmetros do hemograma entre D28 e D1. Associando os resultados do gráfico com os resultados da ANOVA para essas variações, verificamos que a linhagem Dekalb Brown aumentou a quantidade de leucócitos quando comparado com a Dekalb White.

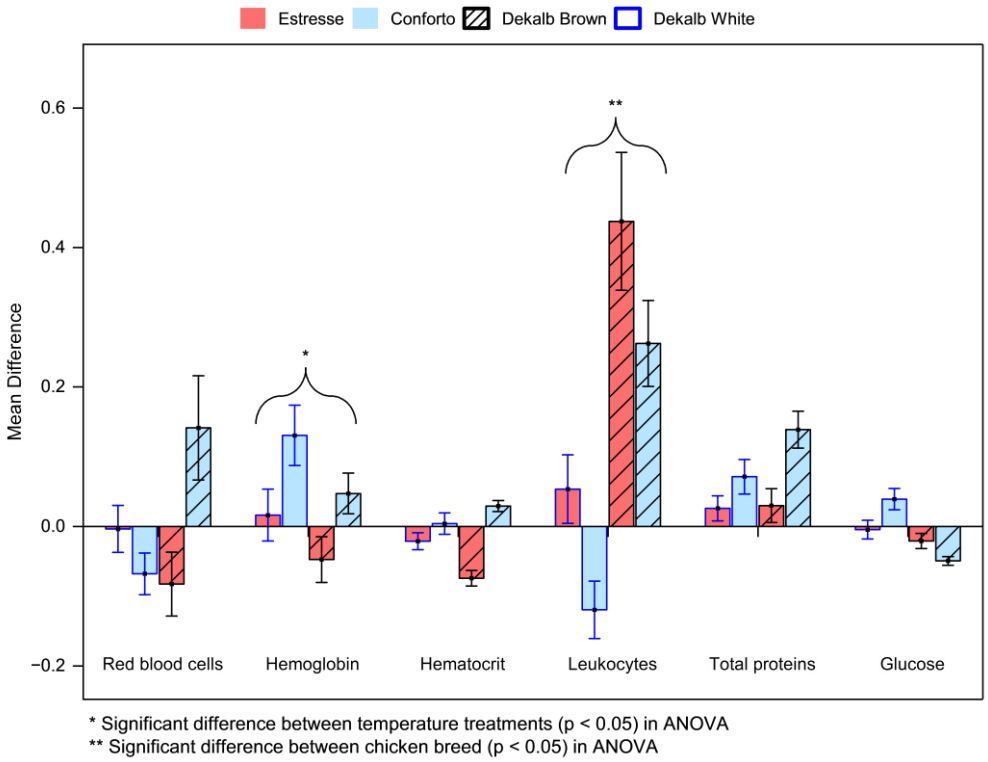


Figura 4.3. Diferenças médias observadas para os parâmetros do hemograma, entre D28 e D1, para cada linhagem e tratamento experimental.

4.3.2 Análise de eletrólitos e pH

A Figura 4.4 mostra a variação média semanal dos eletrólitos e pH sanguíneos avaliados nesse estudo para cada combinação de linhagem e tratamento de temperatura. Observamos uma queda progressiva dos níveis de potássio, tanto no estresse como no conforto, embora esta variação tenha permanecido dentro do intervalo de referência da literatura. Os eletrólitos sódio e cálcio ficaram acima do registrado na literatura, enquanto o cloro ficou abaixo da média.

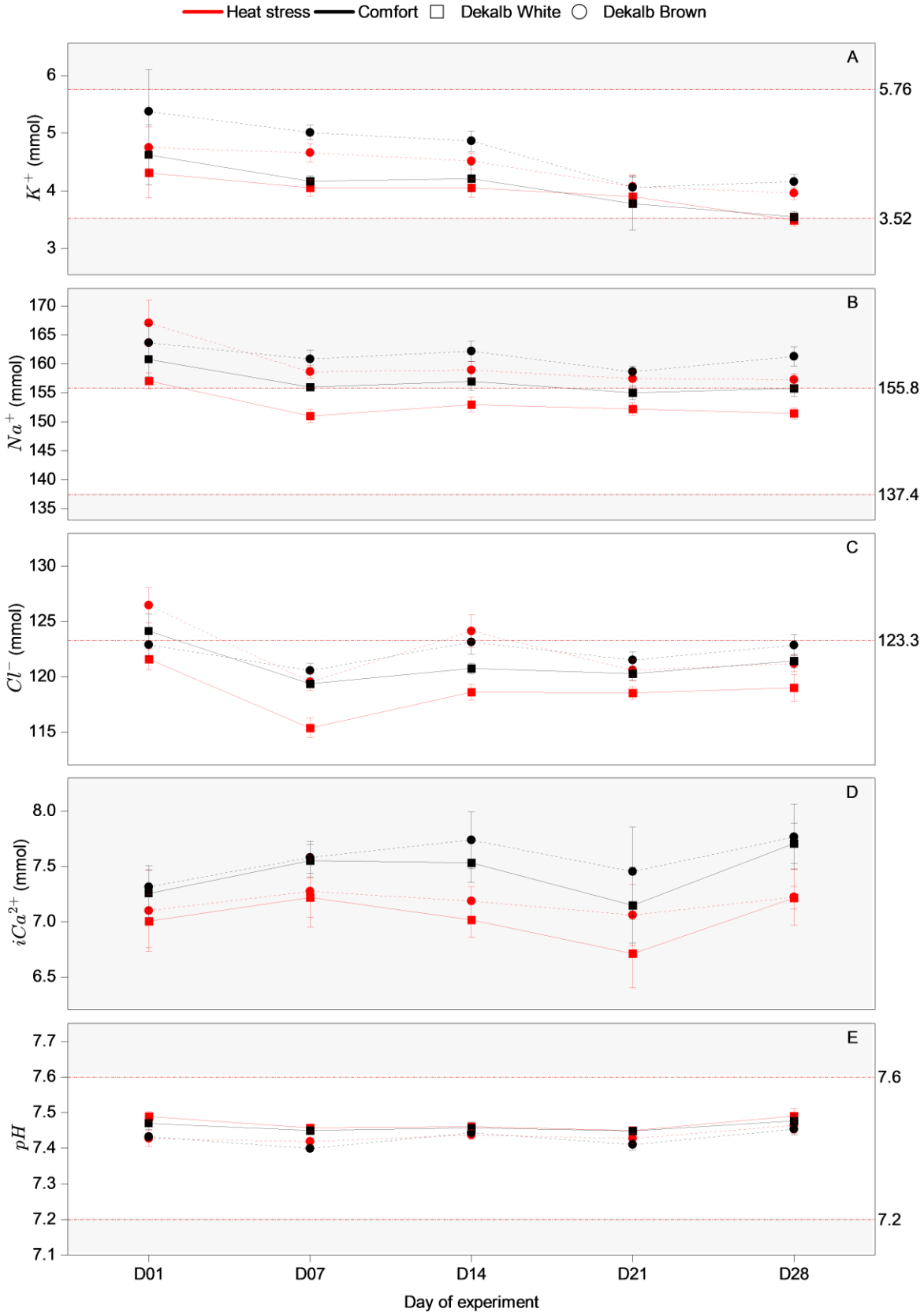


Figura 4.4. Gráficos de variação semanal dos parâmetros A) potássio, B) sódio, C) cloro total, D) cálcio iônico e E) pH, para as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown.

Os resultados da ANOVA (Tabela 4.3) para os eletrólitos mostraram que os parâmetros de sódio e cloro foram maiores para a Dekalb White. Também observamos que o cloro foi maior nos grupos submetidos a estresse por calor. A ANOVA não mostrou diferenças importantes para os tratamentos de temperatura dos demais eletrólitos e para as interações entre os fatores temperatura e linhagem ($p > 0,05$).

Tabela 4.3. Resultado da ANOVA e teste de comparação dos eletrólitos do sangue entre os níveis de cada fator experimental para os dados observados em D28.

Variável	Fator	CV	Nível do fator	Média	Desvio padrão	Teste F
K^+ (mmol)	Tratamento	30,1%	Conforto	3,507	± 1,148	p = 0,34
			Estresse	3,724	± 0,435	
	Linhagem	27,6%	Dekalb Brown	3,713	± 1,184	p = 0,24
			Dekalb White	3,518	± 0,332	
Na^+ (mmol)	Tratamento	4,7%	Conforto	145,07	± 44,22	p = 0,06
			Estresse	154,32	± 4,40	
	Linhagem	9,6%	Dekalb Brown	145,83	± 44,35	**p = 0,04 ***
			Dekalb White	153,56	± 4,61	
Cl^- (mmol)	Tratamento	2,3%	Conforto	111,90	± 33,95	**p = 0,02 ***
			Estresse	120,10	± 5,52	
	Linhagem	3,2%	Dekalb Brown	111,79	± 33,93	**p < 0,01 ****
			Dekalb White	120,21	± 3,40	
iCa^{2+} (mmol)	Tratamento	27,0%	Conforto	7,091	± 2,261	p = 0,67
			Estresse	7,218	± 0,644	
	Linhagem	35,8%	Dekalb Brown	6,847	± 2,247	p = 0,18
			Dekalb White	7,462	± 0,545	
pH	Tratamento	8,5%	Conforto	7,41	± 0,65	p = 0,53
			Estresse	7,48	± 0,07	
	Linhagem	7,3%	Dekalb Brown	7,40	± 0,65	p = 0,33
			Dekalb White	7,48	± 0,07	

* Diferença a 5% de significância no teste F (ANOVA design split-plot) entre os níveis do fator experimental.
** Diferença a 1% de significância no teste F (ANOVA design split-plot) entre os níveis do fator experimental.

Outra observação importante refere-se ao baixo desvio padrão observado em todos os parâmetros para a linhagem Dekalb White, quando comparado à variação individual percebida para a Dekalb Brown. Nesta mesma linha de raciocínio percebe-se maior variação individual dos parâmetros eletrolíticos nas aves em condições de conforto do que nas aves em estresse térmico em D28.

4.3.3 Análise da metilação global do sangue

A Tabela 4.4 mostra os resultados da ANOVA para a metilação global do sangue, considerando o experimento em blocos e parcelas subdivididas, as médias e respectivos desvio-padrão para cada nível de cada fator experimental.

Os resultados mostram que em D0 e D1 não houve diferença entre os valores de metilação global dentro de nenhum fator experimental. Já em D28, observamos que as

poedeiras sob estresse por calor metilaram mais que as do tratamento controle. Com relação às linhagens, em D28 as aves Dekalb Brown metilaram mais que Dekalb White. Em nenhuma das coletas observamos diferenças significativas para a interação dos fatores experimentais ($p > 0,05$).

Tabela 4.4. Resultado da ANOVA para a metilação global do sangue entre os níveis de cada fator experimental para os dados observados em D0, D1 e D28.

Dia do experimento	Fator	CV	Nível do fator	Média	Desvio padrão	Teste F
D0	Tratamento	3,9%	Conforto	3,092	± 0,4400	p = 0,44
			Estresse	3,133	± 0,4315	
	Linhagem	23,2%	Dekalb Brown	3,314	± 0,4522	p = 0,19
			Dekalb White	2,912	± 0,3031	
D1	Tratamento	1,8%	Conforto	2,976	± 0,5037	p = 0,19
			Estresse	2,936	± 0,4544	
	Linhagem	16,3%	Dekalb Brown	3,208	± 0,4273	p = 0,07
			Dekalb White	2,713	± 0,3871	
D28	Tratamento	0,4%	Conforto	2,989	± 0,6764	**p = 0,03 ***
			Estresse	3,053	± 0,7238	
	Linhagem	17,9%	Dekalb Brown	3,623	± 0,1974	**p = 0,02 ***
			Dekalb White	2,471	± 0,4913	

* Diferença a 5% de significância no teste F (ANOVA design split-plot) entre os níveis do fator experimental.

A Figura 4.5 mostra a variação percentual de metilação global do sangue entre D28 e D1 para os fatores experimentais combinados de temperatura e linhagem. A linhagem branca metilou menos aos 28 dias, para ambos os tratamentos de temperatura, enquanto a linhagem vermelha metilou mais. Não há diferença entre a interação temperatura e linhagem na diferença da metilação entre D28 e D1 ($p > 0,05$). Confirmamos na ANOVA que a Dekalb Brown metilou mais que a Dekalb White ($p < 0,05$).

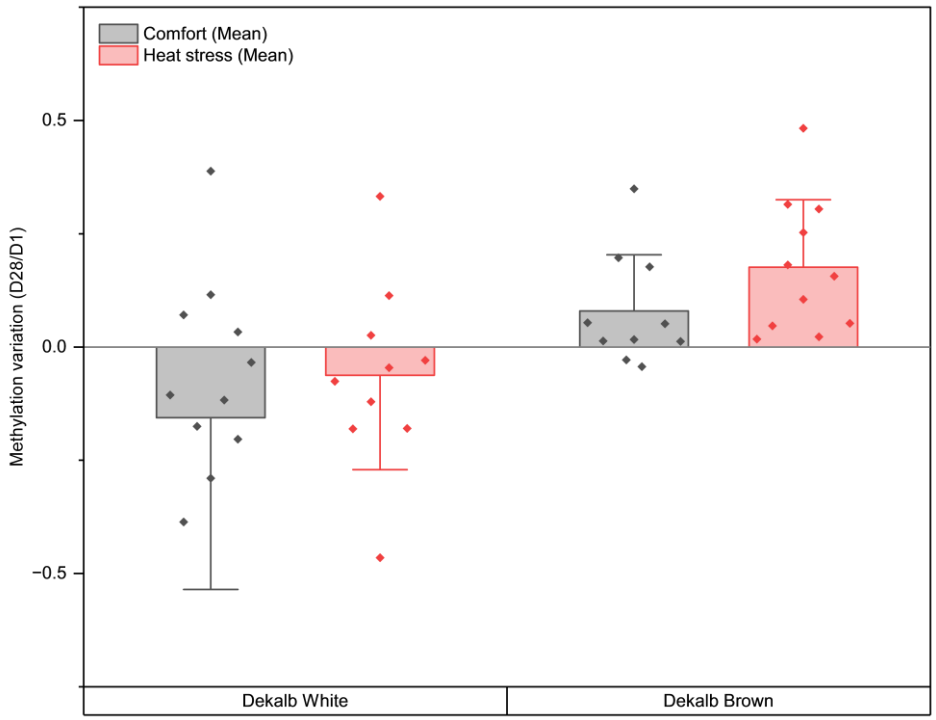


Figura 4.5. Diferença percentual de metilação global do sangue observada entre os dias de coleta D28 e D1 para os fatores experimentais combinados de temperatura e linhagem.

4.4 Discussão

Os resultados de glicose, proteína total, hemoglobina e hemácias não mostraram diferença para a linhagem, enquanto leucócitos e hematócrito mostraram, e nenhum dos parâmetros sanguíneos foram afetados pelo tratamento temperatura. Os valores hematológicos variam em função da espécie, sexo, idade, estado fisiológico e diferenças genéticas (Rezende et al., 2019), possibilitando ampla interpretação dos dados. Estudos relatam efeitos contrários em situações similares, como redução (Ali et al., 2010; Mazzullo et al., 2014; Jaiswal et al., 2017) ou aumento (Habibu et al., 2017; Hassan et al., 2023) dos valores de hematócrito e hemoglobina em aves sob estresse por calor. O comportamento dos níveis de leucócitos e proteína total, acima dos valores referência, sugere desafios infecciosos que não foram considerados em nossas investigações. Afinal, as condições estressantes podem favorecer, o oportunismo de microrganismos até então silenciosos. O estresse prévio dessas poedeiras também pode ter contribuído com o comportamento destas variáveis, levando em conta que o estresse causa desidratação e, consequentemente, aumento de proteínas totais (Schmidt et al., 2007), além de elevar a concentração de leucócitos (Nawab et al., 2018; Wasti et al., 2020).

A linhagem Dekalb White apresentou maiores valores de sódio e cloro, e o cloro foi maior nos grupos submetidos ao estresse por calor, indicando que tanto a linhagem quanto a temperatura influenciam no equilíbrio ácido-básico do organismo. Estes eletrólitos estão

ligados a perda de água, com o sódio indicando perda de líquido intestinal, desidratação e insuficiência renal (Capitelli & Crosta, 2013), e o cloro relacionado a desidratação e acidose metabólica (Harr, 2002). Frangos de corte submetidos ao estresse por calor apresentaram níveis aumentados de cloro e inalterados de sódio (Ward & Peterson, 1973), enquanto galinhas poedeiras apresentaram redução dos níveis de cloro (Pech-Waffenschmidt et al., 1995). Os eletrólitos cálcio, potássio e sódio não foram afetados em poedeiras expostas à estresse por calor agudo (Koelkebeck & Odom, 1995), mas foi relatado diminuição de sódio e inalteração do cloro em frangos de corte sob estresse por calor (Borges, 2004). O pH e o potássio permaneceram no intervalo de referência da literatura, o sódio e o cálcio ficaram acima e o cloro abaixo. Este comportamento, assim como das variáveis do hemograma, pode estar ligado à genética ou à exposição prévia à temperatura (Pech-Waffenschmidt et al., 1995).

O conteúdo da metilação global também pode variar entre indivíduos da mesma espécie (Xu et al., 2007; Husby, 2020). Tal condição foi encontrada neste estudo, onde a linhagem Dekalb Brown apresentou maiores valores de metilação global em relação à Dekalb White, indicando que essas variações podem estar associadas às diferenças genéticas entre as linhagens. Diferenças gerais de metilação foram relatadas entre linhagens de frangos de corte e atribuídas às características heterogêneas genéticas de seus ancentrais, aproximadamente 50%, e apenas 5%adquirido de fatores ambientais (Xu et al., 2005; Xu et al., 2007). O conteúdo da metilação global de galinhas poedeiras da linhagem White também diferiram de seus ancestrais selvagens Red, possivelmente resultado do processo evolutivo vindo da seleção durante a domesticação e adaptação ao ambiente produtivo (Nätt et al., 2012).Considerando que muitas dessas diferenças epigenéticas são transmitidas aos descendentes (Franklin et al., 2012; Hong et al., 2018), as linhagens Dekalb White e Dekalb Brown podem ter herdado mecanismos biológicos distintos para superação de desafios por calor, que também foram expressos na contagem de leucócitos e hematócritos em nossas observações.

Não observamos diferença no conteúdo da metilação global entre as poedeiras no D0 e entre o D0 e D1, indicando que as aves carregavam genética e histórico de exposição ambiental semelhantes. Apesar do teste estatístico indicar diferença significativa ($p < 0,05$) na metilação das aves sob estresse por calor aos 28 dias, a diferença numérica é muito pequena, e não consideramos essa diferença importante. As aves utilizadas nesse estudo eram adultas e vierem de granja comercial. Durante as primeiras semanas de vida ainda na granja foram expostas a altas temperaturas, pois passaram pelo verão local, e provavelmente passaram por um processo de reprogramação biológica, já chegando ao experimento com altos valores de

metilação global do sangue. Pintainhos condicionados ao estresse por calor demonstraram maior capacidade termotolerante na fase adulta, apresentando níveis mais altos de metilação quando comparados com frangos de corte que não passaram pelo estímulo (Kisliouk et al., 2017; Vinoth et al., 2018). A temperatura ambiental afeta o sistema fisiológico durante o desenvolvimento das aves, causando modificações no mecanismo termorregulador e gerando uma memória adaptativa epigenética (Tzschentke, 2007; Kisliouk et al.; 2017; Vinoth et al.; 2018), que afetará o funcionamento dos processos biológicos das poedeiras de forma permanente (Pértille et al., 2017). Mudanças no conteúdo da metilação global foram verificados conforme o envelhecimento de poedeiras (Gryzinska et al., 2013). Além disso, existe uma grande variedade na composição das células sanguíneas, que possuem assinatura epigenética única e podem levar a variações entre os indivíduos e entre os estudos (Willmer et al., 2018), o que condiz com a diferença de metilação encontrada entre as linhagens, resultado das estratégias biológicas adotadas para compensar o efeito do estresse por calor.

4.5 Conclusão

O estresse afetou o equilíbrio ácido-básico do organismo, indicado pelo aumento da concentração de cloro, mas não afetou os demais parâmetros sanguíneos avaliados aos 28 dias. A linhagem Dekalb Brown apresentou contagem de leucócitos e hematócritos maiores, sugerindo uma resposta imunológica associada às células inflamatórias, enquanto a linhagem Dekalb White apresentou maior concentração de cloro e sódio, voltados ao controle eletrolítico do organismo. Essas diferenças refletem variações nos perfis de resposta fisiológica e adaptativa das linhagens.

Não observamos diferenças no conteúdo da metilação global entre os tratamentos de temperatura aplicado às duas linhagens de galinhas adultas, o que reforça a ideia de que as mudanças na metilação relacionadas às condições ambientais podem ser mais pronunciadas em aves jovens. No entanto, verificamos diferenças no conteúdo da metilação global entre as linhagens, com a Dekalb Brown apresentando níveis mais elevados de metilação, confirmando diferenças esperadas entre genéticas diferentes.

Não encontramos correlação dos parâmetros sanguíneos com o conteúdo da metilação global e, então, sugerimos que o conteúdo de metilação pode ser independente dos parâmetros sanguíneos avaliados neste estudo. No entanto, a ausência de correlação não exclui completamente uma relação causal, tornando necessário mais estudos para confirmar e expandir os achados desta pesquisa.

4.6 Referências

Afsal, A., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Devaraj, C., & Bhatta, R. (2018). Heat stress and livestock adaptation: Neuro-endocrine regulation. International Journal of Veterinary and Animal Medicine, 1(2). https://doi.org/10.31021/ijvam.20181108

Ali, M.N., Qota, E.M.A., & Hassan, R.A. 2010. Recovery from adverse effects of heat stress on slow-growing chicks using natural antioxidants without or with sulfate. International Journal of Poultry Science, 9(2), 109-117. https://doi.org/10.3923/ijps.2010.109.117

Almosny, N.R.P., Silva, K.P., Melo, D.L.S., Vasconcelos, T.C., & Monteiro, A.O. (1998). Hematologia de aves: valores normais em hemograma de mutum de Alagoas (*Mitumitu*). Revista Brasileira de Ciência Veterinária, 5 (3),119-122. https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.116

Board, M.M., Crespo, R., Shah, D.H., & Faux, C.M. (2018). Biochemical Reference Intervals for Backyard Hens. JournalofAvian Medicine and Surgery, 32(4*)*, 301–306. https://doi.org/10.1647/2018-301

Borges, S. A., Fischer da Silva, A. V., Majorka, A., Hooge, D. M., & Cummings, K. R. (2004). Physiological Responses of Broiler Chickens to Heat Stress and Dietary Electrolyte Balance (Sodium Plus Potassium Minus Chloride, Milliequivalents Per Kilogram). Poultry Science, 83(9), 1551–1558. https://doi.org/10.1093/ps/83.9.1551

Bush, E.C., Ray, F., Alvarez, M.J., Realubit, R., Li, H., Karan, C., Califano, A., Sims, P.A., 2017. PLATE-Seq for genome-wide regulatory network analysis of high-throughput screens. Nat. Commun. 8, 1-7. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00136-z

Calder, W., & Schmidt-Nielsen, K. (1968). Panting and blood carbon dioxide in birds. American Journal of Physiology-Legacy Content, 215(2), 477–482. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1968.215.2.477

Capitelli, R., & Crosta, L. (2013). 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, 16(1), 71–120. https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.10.002

Cardoso, A.L.S.P., & Tessari, E.N.C. (2003). Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo, 70(4), 419-424. http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V70_4/cardoso.pdf

Ding, H., Yue, Q., Chang, L., Xi, J., Chen, hui, Li, F., Wang, D., & Zhou, R. (2021). Whole blood gas and biochemical reference intervals for Lohmann Silver layers. Poultry Science, 100(9), 101368–101368. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101368

Epiphanio, T. M. F., Fernandes, N. C. C. de A., de Oliveira, T. F., Lopes, P. A., Réssio, R. A., Gonçalves, S., Scattone, N. V., Tedardi, M. V., Kulikowski, L. D., Damasceno, J., Loureiro, A. P. de M., & Dagli, M. L. Z. (2019). Global DNA methylation of peripheral blood leukocytes from dogs bearing multicentric non-Hodgkin lymphomas and healthy dogs: A comparative study. PloSOne, 14(3), e0211898. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211898

Faria, P.P., Cruz, L.C.F., Sampaio, S.A., Borges, & K.F., Minafra, C.S (2021). Análises bioquímicas para frango de corte – revisão. Nutri-Time, Revista eletrônica, 18(6), 9004-9014. Franklin, T. B., Saab, B. J., & Mansuy, I. M. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. Neuron, 75(5), 747–761. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.016

Guerrero-Bosagna, C., Morisson, M., Liaubet, L., Rodenburg, T.B., Haas, E.N., Kostál, L., Pitel, F., 2018. Transgenerational epigenetic inheritance in birds. Environ. Epigenetics. 4, 1-8. https://doi.org/10.1093/eep/dvy008

Grunitzky, L., Centenaro, J. R., Silva, N. R. da, Paulo, J. de M., Silveira, A. M. da, Lopes, G. V., Félix, G. A., & Braz, P. H. (2020). Thermal stress alters the basal value of serum proteins in laying hens. Revista Brasileira de Saúde E Produção Animal, 21. https://doi.org/10.1590/s1519-99402121062020

Gryzinska, M., Blaszczak, E., Strachecka, A., & Jezewska-Witkowska, G. (2013). Analysis of Age-Related Global DNA Methylation in Chicken. Biochemical Genetics, 51(7), 554–563. https://doi.org/10.1007/s10528-013-9586-9

Habibu, B., Kawu, M.U., Aluwong, T., & Makun, H.J. (2017). Influence of seasonal changes on physiological variables, hematology and serum thyroid hormones profile in male Red Sokoto and Sahel goats. Journal of Applied Animal Research, v.45(1),508-516. https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1220384

Harr, K. E. (2002). Clinical Chemistry of Companion Avian Species: A Review. Veterinary Clinical Pathology, 31(3), 140–151. https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2002.tb00295.x

Hassan, S., Habashy, W., Ghoname, M., & Elnaggar, A. (2023). Blood hematology and biochemical of four laying hen strains exposed to acute heat stress. International Journal of Biometeorology, 67(4), 675–686. https://doi.org/10.1007/s00484-023-02445-z

Hong, Y., Hong, S.H., Oh, Y.M., Shin, S.H., Choi, S.S., & Kim, W. J. (2018). Identification of lung cancer specific differentially methylated regions using genome-wide DNA methylation study. Molecular & Cellular Toxicology, 14(3), 315-32. https://doi.org/10.1007/s13273-018-0034-0

Hopkins, E., Sanvictores, T., & Sharma, S. (2018). Physiology, acid base balance. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507807/

Husby, A. (2020). On the Use of Blood Samples for Measuring DNA Methylation in Ecological Epigenetic Studies. Integrative and Comparative Biology, 60(6), 1558–1566. https://doi.org/10.1093/icb/icaa123

Islam, M. S., Lucky, N., Islam, M. R., & Ahad, A. (2004). Hematological Parameters of Fayoumi, Assil and Local Chickens Reared in Sylhet Region in Bangladesh. International Journal of Poultry Science, 3(2), 144–147. https://doi.org/10.3923/ijps.2004.144.147

Jaiswal, S. K., Raza, M., A. K., & Chaturvedani, A.K. (2017). Effect of Thermal Stress on Serum Biochemical and Hematological Parameters in Broiler Chicken. The Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology, 12 (3): 19-22. https://doi.org/10.21887/ijvsbt.v12i3.7082

Jirtle, R. L., & Skinner, M. K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nature Reviews Genetics, 8(4), 253-262. https://doi.org/10.1038/nrg2045

Garcia-Navarro, C.E.K., & Pachaly, J.R. (1994). Manual de Hematologia Veterinária. (1ªd) São Paulo: Varela (pp.169).

Koelkebeck, K.W. & Odom, T. W. (1995). Laying hen responses to acute heat stress and carbon dioxide supplementation: II. Changes in plasma enzymes, metabolites and electrolytes. Comparative Biochemistry and Physiology. A. Comparative Physiology, 112(1), 119–122. https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)00081-h

Kisliouk, T., Cramer, T., & Meiri, N. (2017). Methyl CpG level at distal part of heat-shock protein promoter HSP70 exhibits epigenetic memory for heat stress by modulating recruitment of POU2F1-associated nucleosome-remodeling deacetylase (NURD) complex. Journal of Neurochemistry, 141(3), 358–372. https://doi.org/10.1111/jnc.14014

Lisbôa, R. S., Junior, D. S. G., Silva, F. J. M., Cunha, N. C., Machado, C. H., & Fonseca, A. H. (2008). Alterações nos parâmetros hematológicos de Gallus gallus domesticus experimentalmente infectados por *Borrelia anserina*. Pesquisa Veterinária Brasileira, 28(10), 527–532. https://doi.org/10.1590/s0100-736x2008001000014

Mazzullo, G., Rifici, C., Caccamo, G., Rizzo, M., & Piccione G. (2014). Effect of different environmental conditions on some haematological parameters in cow. Annals of Animal Science,14(4), 947-954.https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0049

Mehaisen, G. M. K., Desoky, A. A., Sakr, O. G., Sallam, W., & Abass, A. O. (2019). Propolis alleviates the negative effects of heat stress on egg production, egg quality, physiological and immunological aspects of laying Japanese quail. PLOS ONE, 14(4), e0214839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214839

Melillo, A. (2013). Applications of Serum Protein Electrophoresis in Exotic Pet Medicine. The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice, 16(1), 211–225. https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.11.002

Mitchell, E. B., & Johns, J. (2008). Avian hematology and related disorders. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 11(3), 501–522. https://doi.org/10.1016/j.cvex.2008.03.004

Moore, L.D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology, 38, 23-38. https://doi.org/10.1038/npp.2012.112

Mushtaq, M. M. H., & Pasha, T. N. (2013). Electrolytes, dietary electrolyte balance and salts in broilers: an updated review on acid-base balance, blood and carcass characteristics. World's Poultry Science Journal, 69(4), 833–852. https://doi.org/10.1017/s0043933913000846

Nätt, D., Rubin, C. J., Wright, D., Johnsson, M., Beltéky, J., Andersson, L., & Jensen, P. (2012). Heritable genome-wide variation of gene expression and promoter methylation between wild and domesticated chickens. Genomics, 13(59). http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/59

Natt, M.P., & Herrick, C.A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chickens. Poultry Science, 31 (4), 735-738. https://doi.org/10.3382/ps.0310735

Nawab, A., Ibtisham, F., Li, G., Kieser, B., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Nawab, Y., Li, K., Xiao, M., & An, L. (2018). Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. Journal of Thermal Biology, 78, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010

Nawaz, A. H., Amoah, K., Leng, Q. Y., Zheng, J. H., Zhang, W. L., & Zhang, L. (2021). Poultry Response to Heat Stress: Its Physiological, Metabolic, and Genetic Implications on Meat Production and Quality Including Strategies to Improve Broiler Production in a Warming World. Frontiers in Veterinary Science, 8, 699081. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081

Paiva, J.T., Resende, M.D.V., Resende, R.T., Oliveira, H.R., Silva, H.T., Caetano, G.C., Lopes, P.S., Silva, F.F., 2019. Epigenética: mecanismos, herança e implicações no melhoramento animal. Archivos Zootec. 68, 304-311. https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198932/1/2019-M.Deon-AZ-Epi genetica.pdf .

Pech-Waffenschmidt, V., Bogin, E., Avidar, Y., & Horst, P. (1995). Metabolic and biochemical changes during heat stress in relation to the feathering degree of the domestic hen. Avian Pathology, 24(1), 33–44. https://doi.org/10.1080/03079459508419047

Pértille, F., Brantsaeter, M., Nordgreen, J., Coutinho, L.L., Janczak, A.M., Jensen, P., & Guerrero-Bosagna, C. (2017). DNA methylation profiles in red blood cells of adult hens correlate with their rearing conditions. Journal of Experimental Biology, 220, 3579-3587. https://doi.org/10.1242/jeb.157891

Reis, A. P. (2015). Epigenética da asma: Revisão. Brazilian Journal Allergy and Immunology, 3(1), 13–18. http://aaai-asbai.org.br/detalhe_artigo.asp?id=716

Rezende, M. S., Silva, P. L., Guimarães, E. C., Lellis, C. G., & Mundim, A. V. (2019). Variações fisiológicas, influência da idade e sexo no perfil bioquímico sanguíneo de aves da linhagem pesada de frango de corte na fase de recria. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 71, 1649–1658. https://doi.org/10.1590/1678-4162-10661

Schmidt, E.M.S., Paulillo, A.C., Santin,E., Dittrich,R.L., & Oliveira,E.G. (2007). Hematological and serum chemistry values for the ring-necked pheasant (*Phasianuscolchicus*): variation with sex and age. International Journal of Poultry Science, 6(2), 137-139.https://doi.org/10.3923/ijps.2007.137.139

Sobotik, E. B., Nelson, J. R., & Archer, G. S. (2020). How does ultraviolet light affect layer production, fear, and stress. Applied Animal Behaviour Science, 223, 104926. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.104926

Sturkie, P. D., & Newman, H. J. (1951). Plasma Proteins of Chickens as Influenced by Time of Laying, Ovulation, Number of Blood Samples Taken and Plasma Volume. Poultry Science, 30(2), 240–248. https://doi.org/10.3382/ps.0300240

Tzschentke, B. (2007). Obtenção da Termorregulação Afetada por Fatores Ambientais 1. Poultry Science, 86(5), 1025–1036. https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1025

Vinoth, A., Thirunalasundari, T., Shanmugam, M., Uthrakumar, A., Suji, S., Rajkumar, U., 2018. Evaluation of DNA methylation and mRNA expression of heat shock proteins in thermal

manipulated chicken. Cell Stress Chaperones. 23, 235–252. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0837-2

Wang, Y., Saelao, P., Chanthavixay, K., Gallardo, R., Bunn, D., Lamont, S. J., Dekkers, J. M., Kelly, T., & Zhou, H. (2018). Physiological responses to heat stress in two genetically distinct chicken inbred lines. Poultry Science, 97(3), 770–780. https://doi.org/10.3382/ps/pex363

Ward, M.A. & Peterson, R.A. (1973). The effect of heat exposure on plasma uric acid, lactate dehydrogenase, chloride, total protein and zinc of the broiler. Poultry Science, 52, 1671-1673. https://doi.org/10.3382/ps.0521671

Wasti, S., Sah, N., & Mishra, B. (2020). Impact of Heat Stress on Poultry Health and Performances, and Potential Mitigation Strategies. Animals, 10(8), 1266.https://doi.org/10.3390/ani10081266

Willmer, T., Johnson, R., Louw, J., & Pheiffer, C. (2018). Blood-Based DNA Methylation Biomarkers for Type 2 Diabetes: Potential for Clinical Applications. Frontiers in Endocrinology, 9, 744. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00744

Xu, Q., Sun, D., & Zhang, Y. (2005). F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome. Chinese Science Bulletin, 50(18), 2039-2044. https://doi.org/10.1007/BF03322798

Xu, Q., Zhang, Y., Sun, D., Wang Y., & Yu, Y. (2007). Analysis on DNA methylation of various tissues in chicken. Animal Biotechnology,18(4),231-241. https://doi.org/10.1080/10495390701574838

Xu, Y., Lai, X., Li, Z., Zhang, X., & Luo, Q. (2018) Efect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in diferent breed of broilers. Poultry Science, 97(11), 4073–4082. https://doi.org/10. 3382/ps/pey256

Yahav, S. (2009). Alleviating heat stress in domestic fowl: Different strategies. World's Poultry Science Journal, 65(4), 719–732. https://doi.org/10.1017/s004393390900049x

Youssef, I. M., Khalil, H. A., Shakoori, A. M., Bagadood, R. M., Alyahyawi, A. Y., Alhazzaa, R. A., Fakiha, K. G., Nasr, S., Abo-Samra, M. A., Hassan, M. S., Halim, H. S. A. E., El-Hack, M. E. A., Jaremko, M., Al-Nemi, R., & Youssef, K. M. (2023). Immune response, hematological traits, biochemical blood parameters, and histological status of laying hens influenced by dietary chitosan-oligosaccharides. Poultry Science, 102(9), 102834–102834. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102834

Zaghlool, S. B., Kühnel, B., Elhadad, M. A., Kader, S., Halama, A., Thareja, G., Engelke, R., Sarwath, H., Al-Dous, E. K., Mohamoud, Y. A., Meitinger, T., Wilson, R., Strauch, K., Peters, A., Mook-Kanamori, D. O., Graumann, J., Malek, J. A., Gieger, C., Waldenberger, M., & Suhre, K. (2020). Epigenetics meets proteomics in an epigenome-wide association study with circulating blood plasma protein traits. Nature Communications, 11, 15. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13831-w

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Galinhas poedeiras submetidas a estresse crônico por calor demonstraram, inicialmente, aumento na temperatura corporal, diminuição no consumo de ração e redução na produção de ovos, indicando uma resposta imediata ao ambiente, ocasionado pelo estresse agudo, que é a primeira resposta do organismo frente a uma condição adversa. No entanto, a partir da segunda semana, observamos recuperação progressiva tanto da produção de ovos quanto da temperatura retal, indicando que houve uma adaptação ao estresse por calor.

É interessante notar que, apesar do peso do ovo reduzir para ambas as linhagens sob estresse por calor, a qualidade interna dos ovos não foi afetada pela linhagem ou pela temperatura, mas a qualidade de casca (gravidade específica, resistência de casca e espessura de casca) foi pior para a linhagem Dekalb White sob estresse. Os achados sobre a qualidade do ovo realmente despertam interesse, especialmente considerando os impactos causados pelo estresse por calor. Assim, estes resultados também podem ser explorados no aspecto econômico e de bem-estar do animal, utilizando o método AHP (*Analytic Hierarchy Process*), que auxilia nas tomadas de decisões e no planejamento, considerando múltiplos critérios (Saaty, 1997; Wen et al., 2022). Para além disso, é notável a capacidade de aclimatação demonstrada pelas aves neste estudo, o que refletiu na preservação da qualidade do ovo. No entanto, é importante ressaltar que mais pesquisas são necessárias, envolvendo diferentes linhagens, condições de temperatura, umidade e duração do desafio, para uma conclusão mais abrangente sobre o tema. Nesse sentido, levantamos o questionamento das aves na preservação de gerar descendentes viáveis em condições adversas nessas linhagens. Tal questão pode incentivar mais estudos investigando os mecanismos pelos quais as aves conseguem preservar a qualidade dos ovos sob estresse ambiental, e como isso contribui para a viabilidade da reprodução e, consequentemente, para a sobrevivência da espécie.

Ao analisarmos os eritrócitos, a hemoglobina, o hematócrito, os leucócitos, a proteína plasmática e a glicose, não encontramos efeitos significativos da temperatura, mostrando que o período de 28 dias de estresse crônico por calor com temperaturas a 35 ºC não foi suficiente para alterar o perfil hematológico de poedeiras entre 34 e 49 semanas de idade, o que levanta uma importante consideração sobre a capacidade fisiológicas das aves referentes aos componentes sanguíneos frente a variações de temperatura. A avaliação desses componentes em condições de calor, pode sugerir a resistência do sangue a alterações ao longo

do tempo, especialmente quando exposto a estímulos térmicos por um período prolongado. Essa condição pode indicar uma adaptação eficiente das aves ao ambiente térmico, sugerindo uma alta capacidade de aclimatação e mecanismos regulatórios em seu organismo para manter o funcionamento fisiológico adequado.

O sangue é uma amostra biológica representativa do estado geral do organismo, refletindo o funcionamento dos órgãos. No entanto, é necessário ter cautela ao interpretar esses resultados, uma vez que o estudo não avaliou outros componentes circulantes no sangue que desempenham papéis significativos na resposta ao estresse. Dentre os eletrólitos avaliados, apenas o cloro foi afetado pela temperatura, apresentando aumento em aves sob estresse por calor, enquanto o potássio, o sódio e o cálcio permaneceram inalterados, assim como o pH.

As poedeiras Dekalb White apresentaram maior concentração plasmática de sódio e cloro, indicando resposta ligada ao equilíbrio ácido-base, enquanto as Dekalb Brown apresentaram maior valor de hematócrito e leucócitos, ligados ao sistema imune. Os valores de leucócitos e proteína plasmática excederam os valores de referência, sugerindo desafios infecciosos, que não foram considerados nesta pesquisa e podem ter sido oportunistas frente ao desafio por calor. A exposição prévia a altas temperaturas também pode ter contribuído com esses valores, considerando que a desidratação e a resposta imune elevam os níveis de proteína e leucócitos plasmáticos. Tanto a genética quanto a prévia exposição a altas temperaturas também podem ter interferido nos níveis de sódio e cloro, que ficaram acima dos valores de referência, e do cloro, que permaneceu abaixo.

As poedeiras apresentaram estratégias adaptativas diferentes entre as linhagens. A Dekalb Brown priorizou a manutenção da qualidade da casca dos ovos em detrimento da produção, enquanto a Dekalb White optou por manter a produção, implicando em piora da qualidade da casca. O conteúdo da metilação global também evidenciou diferenças entre as linhagens, com a Dekalb Brown apresentando níveis mais elevados de metilação do que a Dekalb White, confirmando variações biológicas esperadas entre genéticas diferentes. Porém, os tratamentos de temperatura não afetaram o conteúdo da metilação.

Aparentemente, a alteração dos eletrólitos e a redução na qualidade de casca das poedeiras Dekalb White indicam que esta linhagem demanda maior resposta no equilíbrio ácido-base. Já as poedeiras Dekalb Brown demandam maior resposta imune e apresentam maior grau de metilação, priorizando a recuperação do organismo sobre a viabilidade dos ovos.

Neste estudo não encontramos correlação do conteúdo da metilação global com os parâmetros sanguíneos. No entanto, as referências de Wang et al. (2017) e Pejaković et al.

(2020) sugerem uma ligação entre a metilação do DNA e os processos patológicos, como infecções virais e bacterianas, além de uma associação entre níveis mais altos de metilação global do DNA com uma resposta imunológica mais eficiente (Soutello et al., 2022). Tais condições levantam a hipótese de que a metilação global do DNA pode estar relacionada com a demanda imunológica, o que pode explicar os achados para a linhagem Dekalb Brown neste estudo, que apresentaram a metilação e leucócitos mais elevados. Isso levanta a questão se animais com um sistema imunológico mais pronunciado apresentam níveis mais altos de metilação. Além disso, considerando que a metilação pode silenciar a expressão gênica, é possível que algumas proteínas relevantes para a adaptação ao estresse por calor estejam sendo reguladas por esse mecanismo.

Para confirmar essas hipóteses, são necessários estudos mais específicos que analisem em detalhes os mecanismos moleculares da metilação do DNA com a resposta imunológica e adaptação ao estresse por calor em aves de postura. Esses achados são importantes para uma compreensão mais abrangente dos mecanismos de adaptação entre diferentes linhagens de galinhas poedeiras ao estresse por calor e destacam a importância de considerar tanto os aspectos fisiológicos quanto as abordagens biológicas nas pesquisas relacionadas à produção, saúde e bem-estar animal. Este estudo representa um ponto de partida para investigações mais profundas nesse campo, que podem contribuir significativamente para a melhoria da produção avícola e o bem-estar das aves.

5.1 Referências

Pejaković, S., Mbouombouo Mfossa, A. C., Wiggers, L., Kheimar, A., Coupeau, D., Kaufer, B. B., & Muylkens, B. (2020). Role of DNA Methylation and CpG Sites in the Viral Telomerase RNA Promoter during Gallid Herpesvirus 2 Pathogenesis. Journal of Virology, 94(23). 10.1128/jvi.01488-20. https://doi.org/10.1128/jvi.01488-20

Saaty, T. L. (1977). A Scaling Method for Priorities in Hierarchical Structures. Journal of Mathematical Psychology, 15, 234–281.

Soutello, R. V. G., Rodrigues, M. G. F., Gonçalves, J. A., Bello, H. J. S., Pavan, B. E., & Ramos, E. S. (2022). Global genomic methylation related to the degree of parasitism in cattle. Scientific Reports, 12(1), Artigo 1. https://doi.org/10.1038/s41598-022-22753-5

Wang, F., Li, J., Li, Q., Liu, R., Zheng, M., Wang, Q., Wen, J., & Zhao, G. (2017). Changes of host DNA methylation in domestic chickens infected with Salmonella enterica. Journal of Genetics, 96(4), 545–550. https://doi.org/10.1007/s12041-017-0818-3

Wen, P., Li, L., Xue, H., Jia, Y., Gao, L., Li, R., & Huo, L. (2022). Comprehensive evaluation method of the poultry house indoor environment based on gray relation analysis and analytic hierarchy process. Poultry Science, 101(2), 101587. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101587