

## **Estudo histoquímico do jejuno e do ceco de poedeiras comerciais submetidas a diferentes programas de muda forçada**

**Histochemistry study of the jejunum and the cecum in commercial laying hens submitted to the different forced molting programs**

**Estudio de histoquímica del yeyuno y el ciego en gallinas ponedoras comerciales sometidas a los diferentes programas de muda forzada**

Recebido: 03/09/2021 | Revisado: 09/09/2021 | Aceito: 16/09/2021 | Publicado: 17/09/2021

### **Silvana Martinez Baraldi Artoni**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4428-8838>  
Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", Brasil  
E-mail: [silvana.artoni@unesp.br](mailto:silvana.artoni@unesp.br)

### **Diego Pereira de Araújo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0986-6890>  
Universidade Federal de Goiás, Brasil  
E-mail: [diegoaraujomv@outlook.com](mailto:diegoaraujomv@outlook.com)

### **Leiny Paula de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4728-0674>  
Universidade Federal de Goiás, Brasil  
E-mail: [ly.paula@hotmail.com](mailto:ly.paula@hotmail.com)

### **Guilherme Pinheiro Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0230-0579>  
Universidade Federal de Goiás, Brasil  
E-mail: [santos.gp@outlook.com](mailto:santos.gp@outlook.com)

### **Lucas José Santos Mascarenhas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4683-9376>  
Universidade Federal de Goiás, Brasil  
E-mail: [mascarenhasvet@hotmail.com](mailto:mascarenhasvet@hotmail.com)

### **Vanessa Sobue Franzo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9957-8942>  
Universidade Federal do Mato Grosso, Brasil  
E-mail: [vsfranzo@hotmail.com](mailto:vsfranzo@hotmail.com)

### **Valcinir Aloisio Scalla Vulciani**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5968-330X>  
Universidade Federal de Jataí, Brasil  
E-mail: [aloisiosv@hotmail.com](mailto:aloisiosv@hotmail.com)

### **Resumo**

O objetivo desse estudo foi avaliar as alterações nas glicoproteínas do jejuno e do ceco de galinhas poedeiras comerciais por técnicas histoquímicas após serem submetidas a diferentes programas de muda forçada. O estudo ocorreu no aviário da FCAV-Unesp, campus Jaboticabal. Foram utilizadas 32 galinhas poedeiras da linhagem Hisex Brown com 58 semanas de vida alojadas em gaiolas de postura (duas aves/gaiola) e distribuídas aleatoriamente em quatro programas de muda forçada com dois ciclos de produção, com término em 28 e 140 dias respectivamente. Para cada grupo foram alocadas quatro aves, distribuídas em: Grupo 1 (G1), no qual utilizou-se o método Califórnia como controle; grupo 2 (G2), no qual utilizou-se dieta com baixo nível de cálcio; grupo 3 (G3), no qual forneceu-se ração com alto nível de zinco e para o grupo 4 (G4), com dieta com baixo nível de sódio. Os fragmentos de jejuno e ceco foram corados mediante as técnicas histoquímicas de PAS, PAS + amilase, AB 0,5 e AB 2,5 no qual observou-se a presença de glicoproteínas, glicogênio, polissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados, respectivamente. Os resultados sugerem que os diferentes tratamentos de muda forçada nas condições experimentais não interferiram na integridade das células intestinais dos dois segmentos intestinais analisados. Conclui-se que os quatro tratamentos de muda forçada não interferiram na presença dos polissacarídeos celulares intestinais assim como na integridade da morfologia das células intestinais e do glicocálice.

**Palavras-chave:** Avicultura; Galinhas poedeiras; Glicocálice; Nutrição.

### **Abstract**

The objective of this study was to assess the alterations in the glycoproteins of the jejunum and the cecum of commercial poetry by histochemical techniques, and they will be subjected to different programs of forced molting. The study

occurred in aviary of FCAV-Unesp, Jaboticabal campus. Thirty-two 58-week old Hisex Brown laying hens were used, housed in laying cages (two birds/cage) and randomly distributed in four forced molting programs with two production cycles, ending in 28 and 140 days, respectively. Four birds were allocated to each group, distributed into: Group 1 (G1), in which the California method was used as a control; group 2 (G2), in which a low-calcium diet was used; group 3 (G3), in which a diet with a high level of zinc was provided, and for group 4 (G4), a diet with a low level of sodium. The fragments of jejunum and cecum were submitted to the histochemistry techniques: PAS, PAS + amilase, AB 0,5 and AB 2,5 and were observed the glycoprotein, glycogen, sulfated and carboxylated polysaccharides, respectively. The results suggest that the different treatments of forced molting in the experimental conditions did not interfere in the integrity of intestinal cells of these segments. It is concluded that the four treatments of forced molting did not interfere with the presence of intestinal cellular polysaccharides as well as with the integrity of the morphology of the intestinal cells and the glycocalyx.

**Keywords:** Poultry farming; Laying hens; Glycocalyx; Nutrition.

### Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar las alteraciones en las glicoproteínas del jejunum y el ceco de las gallinas ponedoras comerciales mediante técnicas histoquímicas, y serán sometidas a diferentes programas de muda forzada. El estudio se produjo en el aviario de la FCAV-Unesp, campus de Jaboticabal. Se utilizaron 32 gallinas ponedoras Hisex Brown de 58 semanas de edad, alojadas en jaulas de postura (dos aves / jaula) y distribuidas aleatoriamente en cuatro programas de muda forzada con dos ciclos de producción, finalizando en 28 y 140 días, respectivamente. Se asignaron cuatro aves a cada grupo, distribuidas en: Grupo 1 (G1), en el que se utilizó el método de California como control; grupo 2 (G2), en el que se utilizó una dieta baja en calcio; el grupo 3 (G3), en el que se proporcionó una dieta con alto nivel de zinc, y para el grupo 4 (G4), una dieta con bajo nivel de sodio. Los fragmentos de yeyuno y ciego se sometieron a las técnicas de histoquímica: PAS, PAS + amilasa, AB 0,5 y AB 2,5 y se observaron la glucoproteína, glucógeno, polisacáridos sulfatados y carboxilados, respectivamente. Los resultados sugieren que los diferentes tratamientos de muda forzada en las condiciones experimentales no interfirieron en la integridad de las células intestinales de estos segmentos. Se concluye que los cuatro tratamientos de muda forzada no interfirieron con la presencia de polisacáridos celulares intestinales así como con la integridad de la morfología de las células intestinales y el glucocáliz.

**Palabras clave:** Avicultura; Gallinas ponedoras; Glucocáliz; Nutrición.

## 1. Introdução

O consumo de ovos no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos e alcançou 251 ovos/habitante/ano em 2020. A produção de ovos brasileira é destinada quase que exclusivamente para o mercado interno, com 99,69% dos ovos comercializados dentro do Brasil, o que corresponde a 53 bilhões de ovos (ABPA, 2020). Com o mercado de ovos apresentando demanda crescente e necessidade de adequações tecnológicas e de manejo, a avicultura tem se valido de técnicas que aumentem a produção. Neste contexto, a muda forçada é uma prática que tem sido usada pela indústria comercial de ovos para rejuvenescer os rebanhos, estender o ciclo de postura e restaurar a qualidade dos ovos (Aygün, 2013).

A muda forçada consiste em conduzir as aves a um estado não reprodutivo e conseqüentemente à interrupção na produção de ovos (Teixeira & Cardoso, 2011). Existem diversos métodos para que isto ocorra, dentre os quais destacam-se o jejum; a suplementação com zinco em níveis elevados; o fornecimento de dietas com baixo teor de cálcio e o fornecimento de dietas com baixo teor de sódio (Bar et al., 2003; Petek et al., 2008).

O método de jejum nas poedeiras, com suas variações adaptadas do método Califórnia, é o mais convencional pela facilidade de aplicação, mas que tem gerado controvérsias. A privação de alimentos pode provocar depressão do sistema imunológico e aumentar os níveis de salmonela nos ovos destinados ao consumo humano. Além disso, já a mais de uma década tem havido manifestações em todo mundo pela abolição do jejum em poedeiras, em virtude dos efeitos negativos da privação de alimentos sobre o bem-estar dos animais (Alodan & Mashaly, 1999; Aygün, 2003; Teixeira & Cardoso, 2011).

Desta forma, as utilizações de protocolos baseados na alteração de níveis de componentes da dieta são preferíveis em relação ao jejum. No entanto, assim como no jejum, essas dietas restritivas também podem desencadear alterações morfofisiológicas no sistema digestório das aves, assim como interferir na integridade e nas características da mucosa intestinal provocando alterações na digestão e absorção de nutrientes (Kiela & Ghishan 2016; Reece 2017). Além de outros fatores, a

mucosa intestinal é afetada diretamente pela a quantidade e qualidade dos alimentos ingeridos, que podem modificar sua a extensão, dimensões celulares, funcionalidade e capacidade de proteção (Shimizu 2010; Silvus 2014; Zhou et al. 2020; Poloni et al, 2020).

No epitélio da mucosa do intestino delgado das aves são encontradas, além das células absorptivas, células de Paneth, células neuroendócrinas, células M e caliciformes, que são produtoras de glicoproteínas lubrificantes e protetoras do epitélio intestinal (Bacha & Bacha, 2003; Fletcher & Abdul-Aziz, 2016; Junqueira et al. 2017, Lueschow & McElroy 2020).

Em relação a membrana mucinoide e glicídica que cobre a luz intestinal (glicocálice), a literatura é escassa em relação a aves, porém, estudos mostram que essa é composta de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos que regulam a passagem de água e alimentos assim como faz interações com a microbiota intestinal (Park et al., 2009; Pavlova et al., 2013).

Os programas de muda forçada podem afetar as características histológicas do trato intestinal (Yamauchi, 2007; Mert & Yildirim, 2016), porém, os estudos que relacionam diferentes dietas com muda forçada são voltados, principalmente, para alterações histológicas do sistema reprodutivo (Koch et al., 2007; Mert & Yildirim, 2016) ou em dietas oferecidas em períodos não relacionados a muda forçada (Laudadio et al., 2012; Sun et al., 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi de verificar as respostas morfofuncionais da mucosa do jejuno e ceco de poedeiras submetidas a quatro programas de muda forçada, avaliando-se alterações de glicoproteínas celulares e células caliciformes.

## 2. Metodologia

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura do Departamento de Zootecnia da FCAV – Unesp, Campus de Jaboticabal, São Paulo, após aprovação no comitê de ética e bem-estar animal, protocolo n. 19118/15. Essa experimentação foi realizada no período entre 2015 e 2016.

O galpão de postura utilizado foi do tipo convencional, com dois metros de pé-direito, contendo gaiolas de postura confeccionadas em arame galvanizado e divididas internamente em quatro compartimentos de 25x40x40 centímetros, distribuídos lateralmente em dois andares. Trabalhou-se com duas aves por gaiola, que continham comedouro do tipo calha e o bebedouro *nipple* do tipo copo plástico.

Foram utilizadas 32 aves de postura da linhagem comercial Hisex Brown, com aproximadamente 58 semanas de idade, alojadas nas gaiolas de postura. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e dois ciclos de produção (28 e 140 dias). Para cada tratamento foram alocadas, portanto, quatro aves. No início do experimento, as aves foram submetidas à seleção, pesadas e distribuídas aleatoriamente em parcelas experimentais, compondo quatro grupos. Durante o período de indução da muda forçada, as aves receberam somente luz natural (adaptado de Yamauchi, 2007; Mert & Yildirim, 2016). Após esse período, introduziu-se luz artificial progressivamente até que atingisse 17 horas de luz ao dia (luz artificial + luz natural).

Para todos os tratamentos foi fornecida água à vontade e ração própria para ave à base de milho e farelo de soja, entre outros componentes, seguindo as recomendações de exigências nutricionais e de acordo com o National Research Council – NRC (NRC, 2009). A partir desta dieta, foram realizadas modificações, de acordo com o tratamento proposto dos outros grupos. A composição e valores nutricionais da ração e suas modificações estão compiladas nas Tabelas 1 e 2.

O Grupo controle, denominado de G1, empregou-se o método Califórnia no qual preconiza-se jejum alimentar durante 10 dias e, em seguida, o fornecimento da ração do 11º ao 28º dia, de forma escalonada até a quantidade de 100g de ração//ave/dia. No grupo 2 (G2) utilizou-se uma ração com baixo nível de cálcio durante 14 dias e, do 15º ao 28º dia forneceu-se a mesma ração oferecida ao grupo (G1). O grupo 3 (G3) recebeu dieta com alto nível de zinco, com 20.000 ppm, durante 10 dias e, do 11º ao 28º dia forneceu-se a mesma ração padrão oferecida ao grupo (G1). O grupo 4 (G4) recebeu dieta com baixo

nível de sódio (0,05%) durante 14 dias, sendo que o 15° ao 28° dia foram fornecidos a mesma ração padrão oferecida ao grupo G1.

**Tabela 1.** Composição das rações (%) utilizadas nos grupos controle e experimentais em poedeiras comerciais.

Ingredientes (%)	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Milho	65.71	69.94	69.94	69.94
Farelo de Soja	18.87	14.67	14.67	14.67
Farelo de trigo	4.50	10.00	10.00	10.00
Lisina	0.02	0.00	0.00	0.00
Calcário	9.02	0.00	1.31	1.31
Fosfato Bicálcico	1.26	0.15	1.00	1.00
Sal Comum	0.042	0.28	0.28	0.04
Suplemento*	0.20	0.20	0.20	0.20
Óxido de Zinco	0.00	0.00	2.00	0.00
Inerte	0.00	4.76	0.60	2.84
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

\*Níveis de garantia do suplemento vitamínico e mineral por quilograma do produto: vit. A: 5.000.000 mg; vit. D3: 1.100.000 mg; vit. E: 4.000 mg; vit. K3: 1.000 mg; vit. B1: 500 mg; vit. B2: 1.500 mg; vit. B6: 500 mg; vit. B12: 3.000 mcg; biotina: 10 mg; pantotenato: 5.000 mg; niacina: 10.000 mg; ácido fólico: 100 mg; promotor crescimento: 30.000 mg; cloreto de colina 50%: 100.000 mg; cobalto: 50 mg; cobre: 3.000 mg; iodo: 500 mg; selênio: 100 mg; manganês: 25.000 mg; zinco: 25.000 mg; ferro: 25.000 mg; DL-Metionina: 400.000 mg. coccidiostático: 31.250 mg; antioxidante: 2.000 mg; veículo q.s.p: 1.000 g. G1: grupo controle (método Califórnia); G2: dieta com baixo nível de cálcio; G3: dieta com alto nível de zinco; G4: dieta com baixo nível de sódio.  
Fonte: Autores.

**Tabela 2.** Níveis nutricionais das dietas (%) utilizadas nos grupos controle e experimentais em poedeiras comerciais.

Componentes	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
Proteína Bruta - PB (%)	14.25	14.25	14.25	15.00
Cálcio - Ca (%)	0.10	0.80	0.80	3.80
Metionina (%)	0.23	0.23	0.23	0.40
Metionina + cistina (%)	0.48	0.48	0.48	0.65
Lisina (%)	0.62	0.62	0.62	0.72
Sódio - Na (%)	0.15	0.15	0.05	0.20
Ácido linoléico (%)	1.50	1.50	1.50	1.35
<b>EM, kcal/kg</b>	<b>2.900</b>	<b>2.900</b>	<b>2.900</b>	<b>2.750</b>

G1: grupo controle (método Califórnia); G2: dieta com baixo nível de cálcio; G3: dieta com alto nível de zinco; G4: dieta com baixo nível de sódio.  
Fonte: Autores.

Ao final de cada ciclo de produção, 28 e 140 dias, duas aves de cada grupo foram eutanasiadas por deslocamento cervical, dissecadas para a exposição do aparelho digestório e identificação do jejuno e ceco, dos quais, com auxílio de tesoura e pinças, coletou-se fragmentos de dois centímetros. Os fragmentos intestinais foram seccionados longitudinalmente, lavados em solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) e fixados em solução de Bouin por 24 horas. Posteriormente, banhos sucessivos de álcool 70% foram aplicados sobre as amostras para a retirada do fixador e, em seguida desidratados em concentrações

crescentes de álcool etílico. Após a desidratação do material, as amostras foram recortadas em fragmentos de 0,5 cm de comprimento, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em cada lâmina foram colocados cinco cortes semi-seriados com cinco micrômetros de espessura, sendo que entre um corte e o subsequente foram desprezados 12 cortes. Foram preparadas cinco lâminas por segmento, de cada animal.

As amostras foram submetidas à reações histoquímicas de PAS (detecção de glicoconjugados neutros), PAS+ amilase (detecção de glicogênio), AB pH 0,5 (detecção de glicoconjugados ácidos sulfatados) e AB pH 2,5 (detecção de glicoconjugados ácidos carboxilados) visando a detecção de glicosaminoglicanas, glicogênio, polissacarídeos e polissacarídeos ácidos, respectivamente conforme já demonstrado em outros animais (Pongket et al., 2001; Nonose et al., 2009; Santos et al., 2015; Strobel et al., 2015).

A análise das secções de jejuno e ceco consistiu em observar as colorações propostas e classificá-las de acordo com a intensidade em reação fraca (+); reação moderada (+) e reação forte (+++). Esta análise foi realizada por um único observador em microscópio de luz Olympus B202 e a documentação fotográfica em microscópio de luz Olympus BX41. Para a contagem de células caliciformes foram selecionados, em cada lâmina de jejuno e ceco, cinco campos aleatórios, dois quais quantificou-se as células caliciformes em dois vilos.

Os dados da contagem de células caliciformes foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Cramer Von Mises, submetidos à análise de variância e, em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%) no programa programa SAS (Statistical Analysis System, 2002).

### 3. Resultados

A análise microscópica revelou que em todos os grupos foram mantidas as características da mucosa do jejuno e do ceco das aves, nos dois períodos estudados.

Quanto à coloração do epitélio do jejuno, nos dois períodos, notou-se reação PAS e PAS+ amilase positiva, indicando a existência de mucosubstâncias neutras e glicoproteínas e a presença de glicogênio, respectivamente. Além disso, todos os grupos apresentaram reação moderada ou fraca para AB pH 0.5 constatando-se a presença de mucopolissacarídeos sulfatados. Da mesma forma, para AB pH 2.5, no qual verificou-se intensidades de moderada a forte, revelando a presença de mucopolissacarídeos ácidos carboxilados.

No entanto, a comparação dos diferentes grupos e períodos revelou que em G1 houve aumento da intensidade de coloração de PAS e AB (2,5) aos 140 dias. Em G2 observou-se redução da intensidade de coloração de AB (2,5) aos 140 dias, enquanto que G3 apresentou redução da intensidade para AB (0,5) aos 140 dias. Em G4 observou-se aumento da intensidade de coloração para AB (0,5) aos 140 dias. Todos os resultados de intensidade de coloração dos fragmentos de jejuno estão compilados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Intensidade da coloração por PAS, PAS + amilase, AB pH 2,5 e AB pH 0,5 de fragmentos de jejuno de poedeiras de G1, G2, G3 e G4 aos 28 e 140 dias após tratamento.

Grupos (dias)	Coloração			
	PAS	PAS (amilase)	AB (2,5)	AB (0,5)
G1 (28)	++	++	+	++
G1 (140)	+++	++	++	++
G2 (28)	+++	+++	+++	++
G2 (140)	+++	+++	++	++
G3 (28)	+++	+++	+++	++
G3 (140)	+++	+++	+++	+
G4 (28)	+++	+++	+++	+
G4 (140)	+++	+++	+++	++

+: reação fraca; ++: reação moderada; +++: reação forte.  
 Fonte: Autores.

Em relação à mucosa do ceco das aves, verificou-se integridade morfológica e epitelial em todos os grupos nos dois períodos estudados. Quanto à coloração de PAS e PAS+ amilase, observou-se intensidade moderada em todos os grupos e períodos, indicando a presença de glicosaminoglicanas e glicogênio, respectivamente. As colorações AB pH 0,5 e 2,5 foram fracas para todos os grupos nos dois períodos, indicando discreta presença de polissacarídeos. Todos os resultados de intensidade de coloração dos fragmentos de ceco das aves estudadas estão compilados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Intensidade da coloração por PAS, PAS + amilase, AB pH 2,5 e AB pH 0,5 de fragmentos de ceco de poedeiras de G1, G2, G3 e G4 aos 28 e 140 dias após tratamento.

Grupos (dias)	Coloração			
	PAS	PAS (amilase)	AB (2,5)	AB (0,5)
G1 (28)	++	++	+	+
G1 (140)	++	++	+	+
G2 (28)	++	++	+	+
G2 (140)	++	++	+	+
G3 (28)	++	++	+	+
G3 (140)	++	++	+	+
G4 (28)	++	++	+	+
G4 (140)	++	++	+	+

+: reação fraca; ++: reação moderada; +++: reação forte.  
 Fonte: Autores.

Em relação à contagem de células caliciformes do jejuno, observou-se que aos 28 dias, G4 apresentou a menor média ( $69,33 \pm 1,33$ ), com diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Aos 140 dias G2 e G4 apresentaram as maiores médias ( $196,75 \pm 19,79$  e  $132,00 \pm 3,81$ , respectivamente) com diferença estatística em relação aos outros dois grupos ( $p < 0,05$ ). Comparando os grupos em relação os ciclos de produção, verificou-se que G1 não apresentou diferença significativa entre 28 e 140 dias, enquanto G2, G3 e G4 tiveram aumentos significativos da média de contagem de células caliciformes, apresentando  $196,75 \pm 19,79$ ;  $111,75 \pm 1,43$  e  $132,00 \pm 3,81$  células, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Na contagem de células caliciformes do ceco de notou-se que no primeiro ciclo de produção, a maior média foi de G2 ( $20,00 \pm 1,35$ ), com diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Já, aos 140 dias, não houve diferença

significativa entre os grupos. A comparação dos grupos, em relação aos ciclos de produção, observou-se que G1, G2 tiveram redução do número de células caliciformes ( $p < 0,05$ ) e G4 teve aumento significativo ( $p < 0,05$ ). Os resultados da contagem de células caliciformes do jejuno e ceco das poedeiras estão compilados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Média e erro padrão da média da contagem de células caliciformes do jejuno e ceco de aves poedeiras de G1, G2, G3 e G4 aos 28 e 140 dias após os tratamentos.

Grupo	Células Caliciformes			
	Jejuno		Ceco	
	28 dias	140 dias	28 dias	140 dias
G1	112,50 ± 0,64Aa	108,75 ± 1,49Aa	10,75 ± 1,49Ba	7,25 ± 1,10Ab
G2	119,75 ± 1,18Ab	196,75 ± 19,79Ba	20,00 ± 1,35Aa	7,00 ± 0,80Ab
G3	96,75 ± 1,20Ab	111,75 ± 1,43Aa	6,00 ± 1,65Ba	9,50 ± 1,70Aa
G4	69,33 ± 1,33Bb	132,00 ± 3,81Ba	9,50 ± 1,70Bb	11,75 ± 0,85Ab

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Autores.

#### 4. Discussão

Do estudo realizado por meio da imagem microscópica da composição química ou da atividade metabólica dos polissacarídeos em cortes histológicos, verificou-se que a mucosa do jejuno e do ceco é representada pela presença de glicoproteínas e de glicogênio, além de mucopolissacarídeos sulfatados e mucopolissacarídeos carboxilados concordando com análises já realizadas (Alroy et al. 1989; Boonsoongnorn et al. 2007; Pavlova et al. 2013)

Notou-se que o glicogênio estava presente na mucosa do jejuno de aves submetidas aos programas com baixo nível de cálcio, alto nível de zinco e baixo nível de sódio, pois esses métodos são quantitativos (Decuyper & Verheyen, 1986). Aves submetidas ao jejum alimentar apresentaram um menor índice de glicogênio e glicoproteínas, pois os carboidratos presentes nas biomembranas correspondem às porções glicídicas das suas glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídeos e têm como função principal formar o glicocálice (Wu et al, 2018; Carvalho et al., 2019).

Adicionalmente, no período de jejum aos 28 dias constatou-se que na mucosa do jejuno foi quantificado um menor índice de glicogênio, glicoproteínas, mucopolissacarídeos ácidos sulfatados e carboxilados, por meio das técnicas de PAS, PAS + amilase, AB pH 0,5 e AB pH 2,5, respectivamente, indicando que durante esse ciclo de produção nesse método de muda forçada, as aves consumiram a maior quantidade de polissacarídeos existentes na mucosa ou não produziram, pois durante o jejum alimentar por 10 dias há estresse e perda de peso da ave, além de deficiência de sais minerais e proteínas que compõe essas substâncias (Bertechini, 2005).

No entanto as aves submetidas ao tratamento com baixo nível cálcio, e alto nível de zinco, no decorrer do período experimental analisado apresentaram uma queda do nível de mucopolissacarídeos sugerindo que ambos os minerais, pela falta ou pelo excesso, fizeram com que as células jejunais necessitassem de mais energia visando atender a homeostase celular. Sabe-se, por exemplo, que os níveis de Cálcio podem regular a produção de ATP mitocondrial orientando o metabolismo celular (Tarasov et al. 2012, Balabam et al. 2013, Li et al 2018) fatores inclusive que já foram demonstrados em células de glândulas mamárias (Griffiths & Rutter 2009) e pancreáticas (Tarasov et al. 2013), porém, mais estudos nessa área precisam ser feitos em relação as células intestinais. Xing et al, (2020) encontraram correlações positivas com a suplementação de cálcio

e o crescimento de vilosidades intestinais, aumento de enzimas intestino e aumento de órgãos do sistema imune em frangos de corte.

Em relação ao Zinco, ainda são escassas as informações relacionadas sobre suas alterações histomorfométricas e metabólicas em intestino de poedeiras, porém, sabe-se que dietas com alta concentração de Zinco podem aumentar o número e o tamanho das vilosidades intestinais (Li et al. 2019), o consumo de ração em 10 a 15% do peso corporal (Contreras et al. 2010, Park et al. 2004a, Idowu et al. 2011), diminuição dos valores de corticosterona, glicose e colesterol das galinhas (Sahin et al. 2002), sem que isso afete a qualidade e peso dos ovos. Isto se deve, possivelmente, por uma menor necessidade e sensibilidade de Ca nas gônadas e na produção de ovos, o que torna mais eficiente a postura (Park et al. 2004b, d El-Hack et al. 2017). Ainda em relação a disposição metabólica, Feng et al, (2010) mostrou que a alta concentração de Zn pode afetar negativamente a concentração de Ca. Porém Li et al, (2019) não encontraram estes resultados o que demonstra a necessidade de mais estudos.

Já em relação à mucosa do ceco, observou-se reação moderada a fraca para todas as reações histoquímicas analisadas, principalmente em relação a AB pH 0.5 e 2.5 indicando uma menor quantidade de gliconjugados sulfatados e carboxilados de tal forma que isso pode estar ligado as características funcionais do ceco das aves.

## 5. Considerações Finais

Com base nos resultados apresentados e para as condições do experimento realizado, conclui-se por meio das análises histoquímicas efetuadas nos grupos experimentais que não houve diferenças histoquímicas aparentes e significativas nos dois ciclos de produção, evidenciando que os quatro tratamentos de muda forçada não interferiram na presença dos polissacarídeos celulares intestinais assim como na integridade da morfologia das células intestinais e do glicocálice.

## Referências

- ABPA (2020). Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual da ABPA 2020. ABPA.
- Alodan, M. A., & Mashaly, M. M (1999). Effect of induced molting in laying hens on production and immune parameters. *Poultry Science*. 78 (2), 171-177.
- Alroy, J., Goyal, V., Lukacs, N. W., Taylor, R. L., Strout, R. G., Ward, H. D., & Pereira, M. E (1989). Glycoconjugates of the intestinal epithelium of the domestic fowl (*Gallus domesticus*): a lectin histochemistry study. *The Histochemical Journal*. 21 (4), 187-93.
- Aygun, A (2013). Effects of force molting on eggshell colour, egg production and quality traits in laying hens. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 164 (2), 46-51.
- Bacha, W. J & Bacha, L. M (2003). *Atlas colorido de histologia veterinária*. (2a ed.), Ed. Roca. 456p. Portuguese.
- Balaban, R. S., Bose, S., French, A. S., & Territo, P. R (2003). Role of calcium in metabolic signaling between cardiac sarcoplasmic reticulum and mitochondria in vitro. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 284 (2), C285-93.
- Bar, A., Razaphkovsky, V., Shinder, D & Vax, E (2003). Alternative procedures for molt induction: Practical aspects. *Poultry Science*. 82 (4), 543-550.
- Bertechini, A. G., & Geraldo, A (2005). Conceitos modernos em muda forçada de poedeiras comerciais. In: Simpósio Goiano de Avicultura, 7º, Simpósio Goiano de Suinocultura, 2º, Goiânia. Seminários Técnicos de Avicultura. Goiânia. p. 1-13.
- Boonsoongnem, P., Saengprapaitip, K., Srisai, D., & Suprasert, D. A (2007). Glycoconjugates characterization in jejunal goblet cell of the chicken by means of lectin histochemistry. *Kasetsart Veterinarians* 17 (2), 73-79.
- Carvalho, H. F., & Recco-Pimentel, S. M. A Célula. (4a ed.), Editora Manole: 2019. 672 p. Portuguese.
- Contreras, L., Drago, L., Zampese, E., & Pozzan, T (2010). Mitochondria: The calcium connection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1797 (6-7), 607-618.
- Decuyper, E., & Verheyen, G (1986). Physiological basics of induced molting and tissue regeneration in fowls. *World's Poultry Science Journal*. 42 (1), 56-68.
- El-Hack, M. E. A., Alagawany, M., Amer, S. A., Arif, M., Wahdan, K. M. M., & El-Kholy, M. S (2018). Effect of dietary supplementation of organic zinc on laying performance, egg quality and some biochemical parameters of laying hens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 102 (2), e542–e549.
- Feng, J., Ma, W. Q., Niu, H. H., Wu, X. M., Wang, Y., & Feng, J. (2010). Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. *Biological trace element research*. 133 (2), 203–211.

- Fletcher, O. J., & Abdul-Aziz, T. A (2016). Alimentary System. In: Abdul-Aziz, T. A., Fletcher, O. J., Barnes, H. J. Avian Histopathology. Ed. American Association of Avian Pathologists. 271- 354. English.
- Griffiths, E. J., & Rutter, G. A (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 1787 (11), 1324-33.
- I dowu, O. M. O., Ajuwon, R. O., Oso, A. O., & Akinloye, O. A (2011). Effects of Zinc Supplementation on Laying Performance, Serum Chemistry and Zn Residue in Tibia Bone, Liver, Excreta and Egg Shell of Laying Hens. *International Journal of Poultry Science*. 10 (3), 225-230.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Abrahamsohn, P (2017). *Histologia básica: texto e atlas*. (13a ed.), Guanabara Koogan. 568p. Portuguese.
- Kiela, P. R., & Ghishan, F. K (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. Best practice & research. *Clinical gastroenterology*. 30 (2),145-159.
- Koch, J. M., Moritz, J. S., Lay, J. R., & Wilson, M. E (2007). Effect of melengestrol acetate as an alternative to induce molting in hens on the expression of yolk proteins and turnover of oviductal epithelium. *Animal Reproduction Science*. 102 (1-2), 14–23.
- Laudadio, V., Passantino, L., Perillo, A., Lopresti, G., Passantino, A., Khan, R., U., & Tufarelli, V (2012). Productive performance and histological features of intestinal mucosa of broiler chickens fed different dietary protein levels. *Poultry Science*. 91 (1), 265-70.
- Li, L., Li, H., Zhou, W., Feng, J., & Zou, X (2019). Effects of zinc methionine supplementation on laying performance, zinc status, intestinal morphology, and expressions of zinc transporters' mRNA in laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99 (14), 6582–658.
- Li, W., Angel, R., Kim, S. W., Juménez-Moreno, E., Proszkowiec-Weglarz, M., & Plumstead, P. W (2018). Impacts of age and calcium on Phytase efficacy in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 238. 9-17. 2018.
- Lueschow, S. R., & McElroy, S. J. The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Frontiers in Immunology*. 11. 587. 2020.
- Zhou, C., Xu, P., Huang, C., Liu, G., Chen, S., Hu, G., Li, G., et al (2020). Effects of subchronic exposure of mercuric chloride on intestinal histology and microbiota in the cecum of chicken. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 188 (30), 109920.
- Mert, N., & Yildirim, B. A (2016). Biochemical Parameters and Histopathological Findings in the Forced Molt Laying Hens. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 18 (4), 711-718.
- Nonose, R., Spadarim, A. P. P., Priolli, D. G., Máximo, F. R., Pereira, J. A., & Martinez, C. A. R (2009). Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 24 (4), 267-275.
- NRC (2009). *National Research Council. Nutrients requirements of poultry*. (9a ed.), National Academic Press, 1994. 155 p. English.
- Park, S., Zhen, G., Verhaeghe, C., Nakagami, Y., Nguyevu, L. T., Barczak, A., Kileen, N., et al (2009). The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (17), 6950-6955.
- Park(a), S. Y., Birkhold, G., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C (2004). Review on the Role of Dietary Zinc in Poultry Nutrition, Immunity, and Reproduction. *Biological Trace Element Research*. 101 (2), 147-163.
- Park(b), S. Y., Birkhold, S. G., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S.C (2004). Effects of High Zinc Diets Using Zinc Propionate on Molt Induction, Organs, and Postmolt Egg Production and Quality in Laying Hens. *Poultry Science*. 83 (1), 24–33.
- Pavlova, V., Georgieva, L., Paunova, T., Stoitsova, S., & Nikolova, E (2013). Carbohydrate localization in intestinal glycocalyx. *Science & Technologies*. 3 (1), 17-21.
- Petek, M., Gezen, S. S., Alpaly, F., & Cibik, R (2008). Effects of non-feed removal molting methods on egg quality traits in commercial brown egg laying hens in Turkey. *Tropical Animal Health and Production*. 40 (6), 413-417.
- Poloni, V., Magnoli, A., Fochesato, A., Cristofolini, A., Caverzan, M., Merkis, C., Montenegro, M., et al (2020). A *Saccharomyces cerevisiae* RC016-based feed additive reduces liver toxicity, residual aflatoxin B1 levels and positively influences intestinal morphology in broiler chickens fed chronic aflatoxin B1-contaminated diets. *Animal Nutrition*. 6 (1), 31-38.
- Pongket, P., Romrattanapun, S., Liumsircharoen, M., Srisai, D., & Suprasert, A (2001). Histochemical Detection of Glycoconjugates in Colonic Epithelium of the Goat. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 35 (2), 139-143.
- Reece, W. O (2017). *Dukes fisiologia dos animais domésticos*. (13a ed.), Guanabara Koogan. 740p. Portuguese.
- Sahin, N., Onderci, M., & Sahin, K (2002). Effects of dietary chromium and zinc on egg production, egg quality, and some blood metabolites of laying hens reared under low ambient temperature. *Biological Trace Element Research*. 85 (1), 47–58.
- Santos, M., Arantes, F. P., Pessali, T. C., & Santos, J. E (2015). Morphological, histological and histochemical analysis of the digestive tract of *Trachelyopterus striatulus* (Siluriformes: Auchenipteridae). *Zoologia (Curitiba)*. 32 (4), 296–305.
- Shimizu, M (2010). Interaction between Food Substances and the Intestinal Epithelium. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 74 (2), 232-241.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute (2002) SAS/STAT User's Guide. Version 8, 6th Edition, SAS Institute, Cary, 112.
- Strobel, S., Encarnaçã o, J. A., Becker, N. I & Trenczek, T. E (2015). Histological and Histochemical Analysis of the Gastrointestinal Tract of the Common Pipistrelle Bat (*Pipistrellus Pipistrellus*). *European Journal of Histochemistry*. 59 (2), 2477.

Sun, H., Tang, J., Yao, X., Yao, X., Wu, Y., Wang, X., & Feng, J (2012). Effects of dietary inclusion of fermented cottonseed meal on growth, cecal microbial population, small intestinal morphology, and digestive enzyme activity of broilers. *Tropical Animal Health and Production*. 45 (4), 987–993.

Svihus, B (2014). Function of the digestive system. *The Journal of Applied Poultry Research*. 23 (2), 306-314.

Tarasov, A. I., Semplici, F. L. I. D., Rizzuto, R., Raiver, M. A.; Gilon, P., & Rutter, G.A (2013). Frequency-dependent mitochondrial Ca(2+) accumulation regulates ATP synthesis in pancreatic  $\beta$  cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 465 (4), 543-54.

Teixeira, R. S. C., & Cardoso, W.M (2011). Muda forçada na avicultura moderna. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35 (4), 444-455.

Wu, Q. J., Liu, N., Wu, X.H., Wang, G. Y., & Lin, L (2018). Glutamine alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, intestinal inflammatory response, and barrier integrity in broilers. *Poult Sci*. 97 (8), 2675–2683.

Xing, R., Yang, H., Wang, X., Yu, H., Liu, S., & Li, P (2020). Effects of Calcium Source and Calcium Level on Growth Performance, Immune Organ Indexes, Serum Components, Intestinal Microbiota, and Intestinal Morphology of Broiler Chickens. *Journal of Applied Poultry Research*. 29 (1), 106-120.

Yamauchi, K. (2007) Review of a histological intestinal approach to assessing the intestinal function in chickens and pigs. *Animal Science Journal*. 8 (4), 356-370.